T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMİLOİD BETA TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL ESASLI BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

DİLEK NUR ALTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2021

Dilek Nur ALTAY'ın hazırladığı "Amiloid Beta Tayini İçin Elektrokimyasal Esaslı Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:	İmza
Prof. Dr. Hülya YAĞAR	……
Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR	……
Dr. Öğr. Üyesi Engin ASAV	……

Tez Savunma Tarihi: 19/11/2021

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİMDALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

19 / 11 / 2021

Dilek Nur ALTAY

Yüksek Lisans Tezi
Amiloid Beta Tayini için Elektrokimyasal Esaslı Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Alzheimer hastalığı nöronların ölümüne sebep olan, ölümle sonuçlanan, geri dönüşümsüz bir demans türüdür. Hastalık, hiperfosforile tau proteini ile nörofibriler yumak oluşumu ve amiloid-beta (Aβ) proteini ile amiloid plakların oluşumuyla karakterize edilmektedir. Nörofibriler yumak oluşumu klinik belirtilerin ortaya çıkışı ile eş zamanlı iken amiloid plak oluşumu hastalığın ortaya çıkışından yaklaşık 20-30 yıl öncesinde başlayabilmektedir. Bu nedenle $A\beta_{42}$ analizi Alzheimer hastalığında erken evrede teşhisin yolunu açabilir. Ayrıca hastalığa dair ilaç çalışmalarında ilaç etkinliğinin takibi için de $A\beta_{42}$'nin kan plazması gibi vücut sıvılarında tespiti önem arz etmektedir.

Bu tez kapsamında, Alzheimer hastalığında $A\beta_{42}$ analizi için elektrokimyasal temelli impidimetrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyosensörde maliyeti düşük ve tek kullanımlık indiyum kalay oksit polietilen teraftalat (ITO-PET) tabakalar çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Biyosensör tasarımı, 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan (GPDMMS) ile kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAMs) oluşturulduktan sonra $A\beta_{42}$ proteinine özgü antikor immobilizasyonu ile yapılmıştır. Biyosensör ölçümleri elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri teknikleri ile yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığının 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında ve LOD değerinin 0.37 pg/ml ve LOQ değerinin 1.25 pg/ml olduğu tespit edilmiştir. Bu biyosensörün yaklaşık iki ay süreyle +4 ^{o}C'de depolanabildiği belirlenmiştir. Farklı analit proteinlere karşı seçiciliğini koruduğu tespit edilmiştir. Tek kullanımlık ve maliyeti düşük çalışma elektrotları rejenere edilerek biyosensör maliyetinin 6 kat daha azaltılabileceği gösterilmiştir. $A\beta_{42}$ analizi için geliştirilen bir biyosensörde ilk kez sabit frekansta impedans (SFI) analizi yapılarak antikor-antijen kompleksi oluşumundaki kinetik davranış izlenmiştir. Yapay serum ve

ticari olarak satın alınan insan serumunda $A\beta_{42}$ analizi yapılarak geliştirilen biyosensörün klinik araştırmalarda kullanılmak üzere kanda analiz yapabilme kapasitesi olduğu gösterilmiştir.

Yıl : 2021

Sayfa Sayısı : 120

Anahtar Kelimeler : Amiloid-beta (Aβ) peptidi, Alzheimer hastalığı teşhisi, elektrokimyasal biyosensör, immünosensör, impidimetrik biyosensör

Master Thesis

Development of Electrochemical Based Biosensor System for Amyloid Beta Detection

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

Alzheimer's disease is an irreversible type of dementia that causes the death of neurons, resulting in death. The disease is characterized by the formation of neurofibrillary tangles by the hyperphosphorylated tau protein and the formation of amyloid plaques by the amyloid-beta (Aβ) protein. While neurofibrillary tangle formation is simultaneous with the onset of clinical symptoms, amyloid plaque formation may begin approximately 20-30 years before the onset of the disease. Therefore, $A\beta_{42}$ analysis has the potential to be used for early diagnosis of Alzheimer's disease. In addition, detection of $A\beta_{42}$ in body fluids such as blood plasma is important for monitoring drug efficacy in drug studies on the disease.

In this thesis, an electrochemical based impidimetric biosensor was developed for $A\beta_{42}$ analysis in Alzheimer's disease. In the construction of this biosensor, low cost and disposable indium tin oxide polyethylene terephthalate (ITO-PET) sheets were used as the working electrode. The biosensor design was made by the immobilization of $A\beta_{42}$ protein-specific antibody after self-assembled monolayers (SAMs) were formed with 3-glycidoxypropyldimethoxymethylsilane (GPDMMS) on the ITO-PET electrode surface. Biosensor responses were obtained by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) techniques. It was determined that the linear detection range of the developed biosensor was 1-100 pg/ml, and the LOD value was 0.37 pg/ml and the LOQ value was 1.25 pg/ml. It has been determined that this biosensor can be stored at +4 °C for about two months. It showed selectivity for $A\beta_{42}$ protein when compared with different analyte proteins. It has been shown that the cost of biosensors can be reduced by 6 times by regenerating disposable and cost-effective working electrodes. The

kinetic behavior in the formation of antibody-antigen complex was observed for the first time by performing single frequency impedance (SFI) analysis in a biosensor developed for $A\beta_{42}$ analysis. It has been shown that the biosensor, which was developed by analyzing $A\beta_{42}$ in artificial serum and commercially purchased human serum, has the capacity to be used for blood analysis in clinical studies.

Year : 2021

Number of Pages : 120

Keywords : Amyloid-beta (Aβ) peptide, Alzheimer's disease diagnosis, electrochemical biosensor, immunosensor, impidimetric biosensor

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, danışmanım olarak bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, her sorun ve soruda hoşgörüyle, sabırla yardım eden, yol gösteren Sayın Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a tüm emekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerini paylaşarak destek olan Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN'a (Çanakkale 18 Mart Üniversitesi), Dr. Öğr. Üyesi Engin ASAV'a (Kırklareli Üniversitesi), Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a,

Tez çalışmalarımda destek olan Öğr. Gör. Alp YÜCEL'e ve Gözde SARICAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince, bana kattıkları her şey için Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR'e, Dr. Öğr. Üyesi Didem TUNCAY'a, Arş. Gör. Dr. Birgül KARADAĞ'a ve Laborant Nevin KÜTÜK'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman olduğu gibi, tez çalışmalarım süresince de maddi, manevi desteklerini her zaman hissettiren anneme ve babama, beni kırmayıp vakit ayıran ve yardım eden Aydın ŞENLER'e, her zaman yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Nur ÇİNKOLARDAN ve Oğulcan YENİCE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TÜBAP 2019/167 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Dilek Nur ALTAY

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

TEŞEKKÜR ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiv**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xvii**

BÖLÜM 1 ..... **1**

GİRİŞ **1**

BÖLÜM 2 ..... **3**

GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Alzheimer Hastalığı 3

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Keşfi 4

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi 5

2.1.2.1. Tau Proteini 6

2.1.2.2. Amiloid Beta (Aβ) Proteini 9

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Nedenleri 14

2.1.4. Alzheimer Hastalığının Belirtileri 15

2.1.5. Alzheimer Hastalığının Teşhis Yöntemleri 16

2.1.6. Alzheimer Hastalığında Tedavi Yöntemleri 16

2.2. Biyosensörler 19

2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 22

2.2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler 25
2.2.2.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi 26
2.2.2.2. Voltametrik Yöntemler 31
2.2.2.2.1. Döngüsel Voltametri (CV) 31
2.2.3. Biyosensör Geliştirilmesinde İmmobilizasyon ve Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar 33
2.2.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri 33
2.2.3.2. Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (Self-assembled monolayers-SAMs) 35
2.3. Literatürde $A\beta_{42}$ Analizi İçin Geliştirilmiş Biyosensörler 38
2.4. Tez Kapsamında Geliştirilen $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Kimyası ve Ölçüm Prensibi 43
2.4.1. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Kimyası 43
2.4.2. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Ölçüm Prensibi 45
BÖLÜM 3 48
MATERYAL ve YÖNTEM 48
3.1. Materyal 48
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler 48
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 49
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanışı 50
3.2. Yöntem 51
3.2.1. ITO-PET Elektrot Hazırlığı ve $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Stratejisi 51
3.2.1.1. Elektrot Temizliği 51
3.2.1.2. ITO Elektrot Yüzeyinde Aktif Hidroksil Gruplarının Biriktirilmesi 52
3.2.1.3. GPDMMS ile SAMs Oluşumu 52
3.2.1.4. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Stratejisi 52
3.2.2. Geliştirilen Biyosensörün Ölçüm Prensibi 53

3.2.3. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu 54
3.2.3.1. GPDMMS Konsantrasyonunun Optimizasyonu 55
3.2.3.2. Anti-$A\beta_{42}$ Konsantrasyonunun Optimizasyonu 55
3.2.3.3. Anti-$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu 55
3.2.3.4. $A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu 56
3.2.4. Elektrot Yüzeyindeki Değişikliklerin İncelenmesi 56
3.2.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzeyin Görüntülenmesi 56
3.2.4.2. Fourier-dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) ile Yüzeyin İncelenmesi 56
3.2.6. $A\beta_{42}$ Analizi İçin Tasarlanan Biyosensörün Karakterizasyonu 57
3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı 57
3.2.6.2. Tekrar Üretilebilirlik 57
3.2.6.3. Tekrarlanabilirlik 57
3.2.6.4. Seçicilik 58
3.2.6.5. Sabit Frekansta İmpedans (SFI) Analizi 58
3.2.6.6. Depolama Kararlılığı 58
3.2.6.7. Tekrar Kullanılabilirlik (Rejenerasyon) 59
3.2.6.8. Yapay Serumda Uygulama 59
3.2.6.9. İnsan Serumunda Uygulama 59
BÖLÜM 4 60
SONUÇLAR VE TARTIŞMA 60
4.1. $A\beta_{42}$ Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular 60
4.1.1. Biyosensör Tasarımında Elde Edilen Bulgular 60
4.1.2. İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular 65
4.1.2.1. GPDMMS Molekülünün Optimum Konsantrasyonu 65
4.1.2.2. Anti-$A\beta_{42}$ Optimum Konsantrasyonu 67

4.1.2.3. Optimum Anti-$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi 68
4.1.2.4. Optimum $A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi 70
4.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri 72
4.1.4. Fourier-dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları 73
4.1.5. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Karakterizasyona İlişkin Bulgular 75
4.1.5.1. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı 75
4.1.5.2. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tekrar Üretilebilirliği 77
4.1.5.3. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği 78
4.1.5.4. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Seçiciliği 79
4.1.5.5. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Sabit Frekanstaki İmpedans (SFI) Analizi 80
4.1.5.6. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Depolama Kararlılığı 82
4.1.5.7. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tekrar Kullanılabilirliği (Rejenerasyon) 83
4.1.5.8. Biyosensörün Yapay Serumda $A\beta_{42}$ Analizi 85
4.1.5.9. Biyosensörün İnsan Serumunda $A\beta_{42}$ Analizi 86
KAYNAKLAR 93
ÖZGEÇMİŞ 103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aβ **:** Amiloid Beta

Anti-Aβ **:** Amiloid Beta Antikoru

APP **:** Amiloid Öncü Protein

CV **:** Döngüsel voltametri

DPV **:** Diferansiyel Puls Voltametrisi

EIS **:** Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

GPDMMS **:** 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan

ITO-PET : İndiyum Kalay Oksit- Polietilen Teraftalat

LOD **:** Algılama Limiti-Tespit Sınırı

LOQ **:** Tayin Sınırı

SAMs **:** Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar

SFI **:** Sabit Frekansta İmpedans

SWV **:** Kare Dalga Voltametrisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sağlıklı bir kişinin beyniyle karşılaştırıldığında, Alzheimer hastası bir kişinin beyninde, temporal lobda ve ön loblarda belirgin bir girus (beyin kıvrımlarındaki çıkıntılar) küçülmesi……..6

Şekil 2.2. Tau fosforilasyonu ile mikrotübül yapısının bozulması ve nörofibriler yumak oluşumu…….8

Şekil 2.3. APP'nin sekretaz enzimleri ile kesimi ve Aβ oluşumu……..10

Şekil 2.4. $A\beta_{42}$ dimerlerinin fibril ekseni boyunca hizalanmasını gösteren en düşük enerji yapısının ribbon (şerit) gösterimi……10

Şekil 2.5. $A\beta_{42}$'nin çubuk model gösterimi…….11

Şekil 2.6. Aducanumab kullanımı öncesi ve 54 hafta sonrası PET görüntüleri……..19

Şekil 2.7. Biyosensörü oluşturan bileşenler……20

Şekil 2.8. Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması…….22

Şekil 2.9. Biyosensörlerin kullanılan transdüsere göre sınıflandırılması……23

Şekil 2.10. Tipik bir elektrokimyasal biyosensör sistemi. WE; çalışma elektrodu, CE; karşıt elektrot ve RE; referans elektrot……...26

Şekil 2.11. Randles eşdeğer devre modeli. Cd; çift katmanlı kapasitör, CE; karşı elektrot, Rp; polarizasyon direnci, Rs; çözelti direnci, WE; çalışma elektrodu, Zw; Warburg impedansı…….28

Şekil 2.12. Teorik olarak Nyquist grafiğinin gösterimi……...28

Şekil 2.13. Teorik olarak Bode Grafiği……...29

Şekil 2.14. Elektrokimyasal impedans ölçümü ile elde edilen Bode grafiği……...30

Şekil 2.15. Uygulanan potansiyelin zamanla değişimi……32

Şekil 2.16. Mikro elektrotta döngüsel voltamogram……...32

Şekil 2.17. Makro elektrotta döngüsel voltamogram……..33

Şekil 2.18. Biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılan immobilizasyon yöntemleri…34

Şekli 2.19. SAMs oluşum prensibi……..35

Şekil 2.20. Bir organosilan molekülünün genel yapısı……36

Şekil 2.21. Bir yüzey üzerinde immobilize edilmiş bifonksiyonel organosilan molekülü……..37

Şekil 2.22. Epoksi halkası ve amin grubu içeren iki bileşik arasındaki halka açılımı reaksiyonu……38

Şekil 2.23. Sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör……39

Şekil 2.24. Moreira ve arkadaşları tarafından geliştirilen biyosensörün şematik gösterimi……..40

Şekil 2.25. ICE elektrot yüzeyi……...40

Şekil 2.26. Ngoc Le ve arkadaşları tarafından tasarlanan biyosensörün şematik gösterimi……..41

Şekil 2.27. Özcan ve arkadaşları tarafından geliştirilen biyosensör sisteminin şematik gösterimi……..42

Şekil 2.28. LC bazlı $A\beta_{42}$ biyosensörü……43

Şekil 2.29. ITO tabaka gösterimi……43

Şekil 2.30. 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan molekülü……...44

Şekil 2.31. $A\beta_{42}$ biyosensöründe aktif -OH grupları birikimi ve SAMs oluşumu……..45

Şekil 2.32. $A\beta_{42}$ proteinine özgü Anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonu……45

Şekil 2.33. Nyquist grafiğinde Rct değerinin hesaplanması……...46

Şekil 2.34. Rct değeri hesaplama tablosu……47

Şekil 3.1. $A\beta_{42}$ biyosensörünün tasarım stratejisi……53

Şekil 4.1a. $A\beta_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen impedans spektrumları……61

Şekil 4.1b. $A\beta_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen döngüsel voltamogramları……..61

Şekil 4.1c. $A\beta_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen EIS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerlerine bağlı sütun grafik……62

Şekil 4.2. $A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm eğrileri……..64

Şekil 4.3. GPDMMS optimizasyonuna ait kalibrasyon grafikleri……...65

Şekil 4.4. Anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu optimizasyonuna ait kalibrasyon grafikleri……..67

Şekil 4.5. Anti-$A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmasına ait kalibrasyon grafikleri……..69

Şekil 4.6. $A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonuna ait kalibrasyon grafikleri……...70

Şekil 4.7. $A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri (A) Yalın ITO, (B) ITO-OH, (C) ITO-OH-GPDMMS, (D) ITO-OH-GPDMMS-Anti-$A\beta_{42}$, (E) ITO-OH-GPDMMS-Anti-$A\beta_{42}$-BSA, (F) ITO-OH-GPDMMS-Anti-$A\beta_{42}$-BSA-$A\beta_{42}$.....72

Şekil 4.8. $A\beta_{42}$ biyosensörünün GPDMMS immobilizasyonu sonrası FTIR sonucu.....74

Şekil 4.9. $A\beta_{42}$ biyosensöründe anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonu sonrası FTIR sonucu……74

Şekil 4.10. $A\beta_{42}$'nin 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığındaki Nyquist eğrileri……..75

Şekil 4.11. $A\beta_{42}$'nin 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları……...76

Şekil 4.12. $A\beta_{42}$ biyosensörüne ait 1-100 pg/ml tayin aralığına ait standart grafik…….76

Şekil 4.13. $A\beta_{42}$ biyosensörünün seçicilik çalışmaları grafiği……79

Şekil 4.14. $A\beta_{42}$ biyosensörünün BSA adımına ait Bode grafiği……81

Şekil 4.15. $A\beta_{42}$ biyosensörünün SFI analizine ait grafik……...82

Şekil 4.16. $A\beta_{42}$ biyosensörünün depolama kararlılığına ait grafik……83

Şekil 4.17. $A\beta_{42}$ biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğine ait grafik……84

Şekil 4.18. $A\beta_{42}$ biyosensörünün yapay serumda uygulamasına ait standart grafik……86

Şekil 4.19. $A\beta_{42}$ biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ait standart grafik….87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. $A\beta_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen EIS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleri……...62

Çizelge 4.2. İmmobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri…64

Çizelge 4.3. GPDMMS konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları…….66

Çizelge 4.4. Anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları…….67

Çizelge 4.5. Anti-$A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları…….69

Çizelge 4.6. $A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları…….70

Çizelge 4.7. $A\beta_{42}$ biyosensörünün geliştirilmesinde optimum çalışma koşulları……71

Çizelge 4.8. $A\beta_{42}$ biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik çalışmalarının doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları…….78

Çizelge 4.9. Tekrarlanabilirlik ölçümlerine ilişkin tablo……79

Çizelge 4.10. $A\beta_{42}$ biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğine ait ΔRct değerleri……...85

Çizelge 4.11. Yapay serum uygulamasında ölçülen $A\beta_{42}$ miktarları……...88

Çizelge 4.12. $\beta\beta_{42}$ analizi için geliştirilen biyosensörün literatürdeki diğer biyosensörler ile karşılaştırması…….89

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, demansın en yaygın görülen formudur ve Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre demans vakalarının yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Beyindeki sinir hücreleri yani nöronlarda görülen fonksiyonel kayıplardan kaynaklanan Alzheimer hastalığı, ilerleyici ve ölümle sonuçlanan bir hastalıktır. Hastalığın görülmesinin en önemli nedeni bireylerin ilerleyen yaşıdır. 20. ve 21. yüzyıllarda dünya çapında nüfusun ve yaşam sürelerinin artması sebebiyle Alzheimer vakalarına da daha sık rastlanmaktadır. Günümüzde dünya çapında yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası vardır. Bu rakamın 2050 yılına kadar dört katına çıkacağı tahmin edilmektedir.

Alzheimer hastalığının patofizyolojik gelişimi karmaşık ve çok yönlüdür. Bu yüzden hastalık mekanizması hala daha tam olarak açıklanamamaktır. 1901 yılında, Alois Alzheimer tarafından yapılan otopside beyin yapısında iki belirgin değişiklik tespit edilmiştir. Bunlardan biri nörofibriler yumaklar diğeri ise amiloid plaklardır. Hastalığın ana nedeni olduğu düşünülen bu yapıların oluşumuna neden olan iki protein; hiperfosforile tau proteini ve amiloid beta (Aβ) proteinidir. Tau proteini sinir hücrelerinde mikrotübül yapısının sabit ve kararlı şeklide durmasını sağlar. Hiperfosforile olduğunda ise mikrotübül yapısı bozulur, hiperfosforile tau proteinleri hücre dışında birikerek nörofibriler yumakları oluşturur ve buna bağlı olarak sinir hücreleri arasındaki iletişimde aksaklıklar ortaya çıkar. Aβ, bir transmembran protein olan amiloid öncü proteinin (amyloid precursor protein-APP) β- ve γ-sekretaz enzimleri tarafından ardışık olarak kesilmesiyle oluşmaktadır. 42 amino asitten oluşan bu protein, nöronlarda birikerek (agrege olarak) amiloid plakları oluşturmaktadır.

1992 yılında John Hardy ve Gerald Higgins tarafından önerilen "Amiloid Kaskad" hipotezine göre, protofibriller ve fibriller halinde yeniden düzenlenmiş Aβ oligomer türlerinin oluşumu ile amiloid plakları oluşturan $A\beta_{42}$ agregasyonu başlamaktadır. Yapılan çalışmalar $A\beta_{42}$ agregasyonun, hiperfosforile tau proteinlerinden meydana gelen nörofibriler yumak oluşumunu tetiklediğini göstermektedir. Bu durum Alzheimer hastalığının ana nedeninin $A\beta_{42}$ birikimi olduğunu düşündürmektedir.

Hastalığın klinik seyrine bakıldığında ise hastalarda klinik belirtilerin ortaya çıkışı ile nörofibriler yumak oluşumu eş zamanlıdır. Ancak amiloid plak oluşumu ile klinik belirtiler arasında çok düşük bir bağlantı vardır. Bu durum Amiloid Kaskad hipotezini ve hastalığının ana nedeninin $A\beta_{42}$ birikimi olduğu düşüncesini güçlendirmektedir.

Literatürde yer alan çalışmalara göre, $A\beta_{42}$'nin birikimi ve bunun sonucunda amiloid plakların oluşum süresi hastalar arasında farklılık gösterse de genel olarak bu birikim, klinik belirtilerin ortaya çıkışından yaklaşık 20-30 yıl önce başlamaktadır.

Günümüzde Alzheimer hastalığının etkin bir tedavi yönetimi yoktur. Mevcut tedavi yöntemleri ile sadece hastalığın ilerleyişi yavaşlatılmaktadır. Ancak bu da erken evrede teşhis edilen hastalarda daha etkin bir tedavi yöntemi iken orta ve ileri evre hastalarda pek etkili olmamaktadır. Bu yüzden Alzheimer hastalığının erken evrede teşhisi önem arz etmektedir.

$A\beta_{42}$ proteini, Alzheimer hastalığının erken evrede teşhis edilebilmesi için bir biyobelirteç olarak önerilmektedir. Ayrıca $A\beta_{42}$'nin kan, beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında analizi, hastalığa dair yapılan ilaç geliştirme çalışmalarında, ilaç etkinliğinin takibi için de önemlidir.

Bu tez çalışmasında $A\beta_{42}$'nin kantitatif tayini için alternatif bir yöntem olarak, tek kullanımlık ITO-PET elektrotlar ile maliyeti düşük ve hızlı yanıt alınabilen, elektrokimyasal temelli impidimetrik bir biyosensör geliştirilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Demans, beyindeki sinir hücrelerinin zarar görmesinden kaynaklanan, bir insanın gündelik yaşamındaki aktivitelerini gerçekleştirmesini engelleyecek kadar şiddetli seyreden, düşünme becerilerinin azalması ile ilişkili semptomları tanımlayan genel bir terimdir (Öztürk & Karan, 2009). Alzheimer hastalığı demansın en yaygın görülen formudur ve vakaların %70'inden fazlasını oluşturmaktadır (Chaib, 2012).

20. ve 21. yüzyıllarda dünya çapında nüfusun ve yaşam beklentisinin artmasıyla birlikte yaşlı nüfus da artmıştır. 2018 yılında tarihte ilk kez 65 yaş ve üstü insan sayısı 5 yaş ve altı çocukları geride bırakmıştır. Alzheimer dahil tüm demansların en önemli nedeni bireylerin ilerleyen yaşıdır. Hastalığın görülme sıklığı 65 yaşından itibaren her beş yılda iki kat artmaktadır. 85 yaşının üzerindeki bireylerde görülme sıklığı yaklaşık %30-40'tır. Yaşam süresinin artmasıyla beraber Alzheimer hastalığı giderek önem kazanmaktadır (Mofrad, Lundervold & Lundervold, 2021; Özkay, Öztürk & Can, 2011; Öztürk & Karan, 2009).

Günümüzde dünya çapında yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası vardır ve bu sayının 2050 yılına kadar dört katına çıkacağı tahmin edilmektedir (Arco, Ramírez, Górriz & Ruz, 2021). Alzheimer hastalığı ve diğer demans türleri dünya çapında ilk 10 ölüm nedeni arasında yer almaktadır. 2009'daki verilere göre Avrupa ve Amerika'da 3.

sıradadır ve bu ölümlerin %65'ini kadınlar oluşturmaktadır (Brunier & Muchnik, 2020).

Alzheimer hastalığı, hafıza, düşünce ve davranış problemlerine sebep olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Nörodejenerasyon, nöronal yapının veya fonksiyonun bozulmasına neden olan herhangi bir patolojik durumu ifade eder. Nöronlar yenilenemediği için hastalık geri dönüşümsüzdür ve ölümle sonuçlanmaktadır (Chidambaram & Chinnathambi, 2020; Mofrad vd., 2021; Öztürk & Karan, 2009; van Oostveen & de Lange, 2021).

Alzheimer hastalığı "geç başlangıçlı" ve "erken başlangıçlı" olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı 65 yaşının üzerindeki bireylerde görülmektedir ve vakaların yaklaşık %96'sını oluşturmaktadır. Hastalığın erken başlangıçlı olarak isimlendirilen formu ise genetik mutasyonlar sebebiyle 65 yaşın öncesinde görülmektedir ve vakaların yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır (Brazaca, Sampaio, Zucolotto & Janegitz, 2020).

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Keşfi

Alzheimer hastalığının klinik ve patolojik özellikleri Alman psikiyatrist ve nöropatolog Alois Alzheimer tarafından keşfedilmiştir. 1901 yılında, Alois Alzheimer Frankfurt'ta, yönelim ve bellek bozukluğu ile yazma ve okuma zorluğu yaşayan 51 yaşındaki August Deter isimli hasta ile çalışmaya başlamıştır. Zaman içerisinde August Deter'in hastalığının semptomları ilerlemiş, halüsinasyonlar görmeye başlamış ve diğer bilişsel fonksiyonlarında da bozulmalar görülmüştür. 1906 yılında August Deter hayatını kaybetmiştir (Selekler, 2010).

Hastanın ölümünden sonra, Alois Alzheimer yaptığı otopside hastanın beynini mikroskobik olarak incelediğinde, beyin korteksinin normalden daha ince olduğunu ve anormal iki bulgunun var olduğunu saptamıştır. Bu bulgulardan ilki, ileri yaşlardaki insanların beyinlerinde de bulunan, o zamanlarda hücre dışı plaklar olarak tanımlanan, amiloid plaklardır. Diğeri o dönemde ilk kez kullanılan gümüş boyama yöntemiyle tespit edilen ve sonraki yıllarda nörofibriler yumak olarak adlandırılan hücre içi yumaklardır (Marr, 2016; Selekler, 2010).

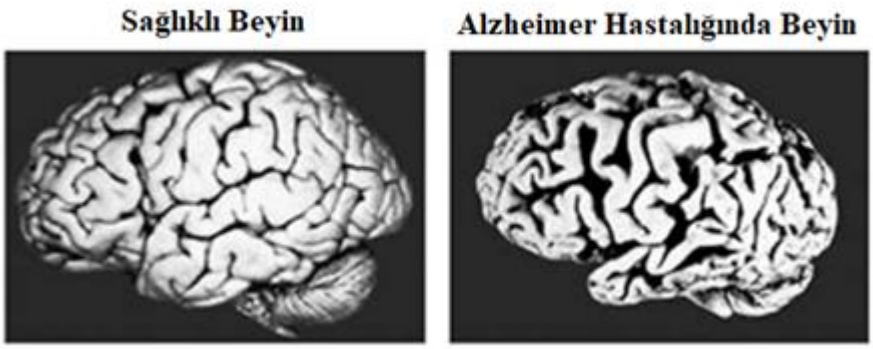
Alois Alzheimer bulduğu sonuçları 1906'da Güney-Batı Alman Akıl Hastalıkları Uzmanları Kongresi'nde serebral korteksin tuhaf bir hastalığı ismiyle sunmuştur. Dr. Alzheimer'ın klinik şefi Dr. Emil Kraepelin, 1910 yılında yayımlanan Klinik Psikiyatri kitabının 8. baskısının 627. sayfasında Senil Beyin Hasarı başlığından sonra Alzheimer hastalığı terimini ilk kullanan kişi olmuştur (Selekler, 2010).

1980'lerde biyokimya alanında yapılan çalışmalarla amiloid plaklarının ana bileşeninin amiloid-beta (Aβ) peptidi, nörofibriler yumakların ana bileşeninin de Tau proteini olduğu keşfedilmiştir (Marr, 2016).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

Alzheimer hastalığında beyindeki değişikliklerin, hastalarda belirtiler ortaya çıkmadan yaklaşık 15-20 yıl öncesinde başladığı düşünülmektedir. Hastalık belirtileri hafıza, düşünme ve öğrenme ile ilgili nöronlarda meydana gelen hasarla ortaya çıkmaktadır. Hafif bilişsel bozukluk, nöronların zarar görmeye başladığı ara geçiş dönemi olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda yaklaşık altı yıl içinde Alzheimer hastalığına dönüşme oranı %80'dir (Mehmood vd., 2021).

Alzheimer hastalığının nöropatolojisinde, sinaps dejenerasyonu ve nöronların ölümü nedeniyle, temporal ve frontal lobların dahil olduğu öğrenme ve hafıza süreçlerinde yer alan beyin bölgelerinde hacimsel olarak küçülme görülmektedir (Şekil 2.1) (Mattson, 2004).



Şekil 2.1. Sağlıklı bir kişinin beyniyle karşılaştırıldığında, Alzheimer hastası bir kişinin beyninde, temporal lobda ve ön loblarda belirgin bir girus (beyin kıvrımlarındaki çıkıntılar) küçülmesi (Mattson, 2004)

Beyinde en büyük değişim hipokampusta görülmektedir. Bunu Meynert'in bazal çekirdeği ve amigdala dahil olmak üzere asosiyasyon korteksleri ve subkortikal yapıların izlediği düşünülmektedir (Götz vd., 2004). Ayrıca Alzheimer hastalığında, beyindeki gri madde kaybı, özellikle medial temporal lobtaki kayıp, yaşı ilerlemiş sağlıklı insanlardakine oranla çok daha hızlı gerçekleşmektedir (Dong vd., 2021).

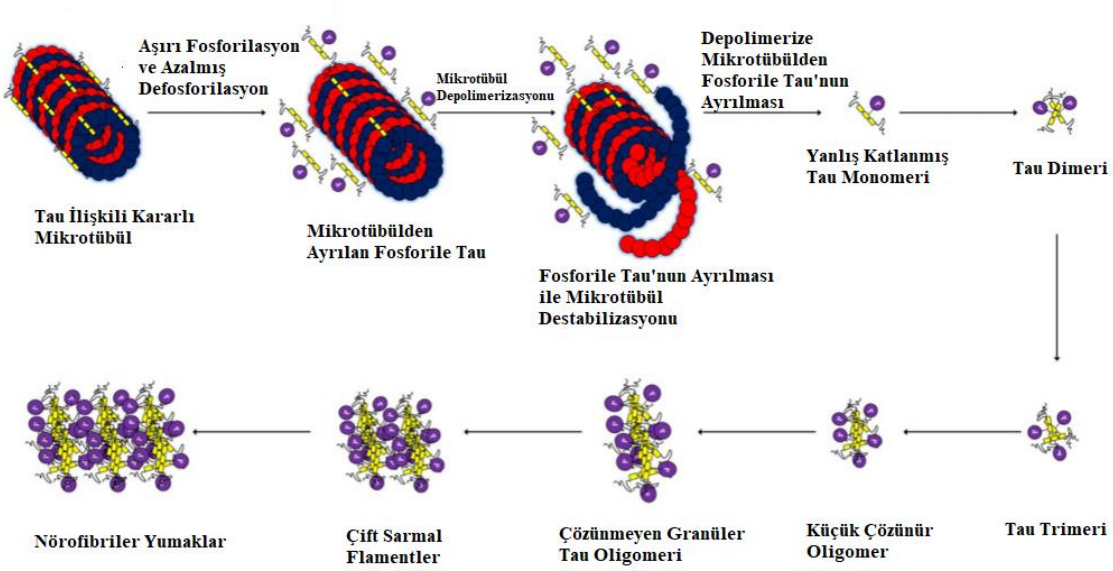
Alzheimer hastalığının patofizyolojik gelişimi karmaşık ve çok faktörlüdür. Bu yüzden hastalık mekanizması hala daha tam olarak açıklanamamaktadır (Yu & Wu, 2021). Ancak hastalık, beyinde görülen iki önemli değişimle karakterize edilebilmektedir. Bunlardan ilki amiloid-beta (Aβ) peptidlerinin birikerek amiloid plakları oluşturmasıdır. İkincisi ise hiperfosforile veya anormal fosforile tau proteininin nörofibriler yumaklar halinde toplanmasıdır (Muralidar, Ambi, Sekaran, Thirumalai & Palaniappan, 2020).

2.1.2.1. Tau Proteini

Tau proteini ilk kez 1975 yılında Weingarten ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, mikrotübüllerin protein saflaştırılması sırasında bir kirletici olarak keşfedilmiştir. Çalışma sonunda Tau'nun miktotübül oluşumunun ana düzenleyicisi olduğu belirlenmiştir (Weingarten, Lockwood, Hwo & Kirschner, 1975).

Mikrotübüller hücre süreçlerinin gelişiminde ve hücre içi sinyal iletiminin başlangıcında hayati rol oynamaktadırlar (Muralidar vd., 2020). Tau proteini 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinden bir proteindir. Tübülinin mikrotübüllere kendiliğinden birleşmesini ve nöronlarda stabilizasyonu sağlayarak hücre iskeletinin bütünlüğünü korumaktadır. Bu proteindeki değişimler Alzheimer hastalığı, progresif supranükleer felç, kortikobazal sendrom, frontotemporal demans ve kromozom-17 ile bağlantılı Parkinsonizm, Pick hastalığı, Parkinson hastalığı gibi 20'den fazla hastalığa neden olmaktadır (Chidambaram & Chinnathambi, 2020).

Alzheimer hastalığında, tau proteininin translasyon sonrası modifikasyonu önemli rol oynamaktadır. Hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar, tau proteininin hiperfosforile olmasına yol açmaktadır. Tau'nun hiperfosforilasyonu, konformasyonunu ve yükünü potansiyel olarak değiştirebilir. Bu durum onu nöron içinde topaklanmaya (agrege olmaya) meyilli hale getirir. Hiperfosforile Tau birikimi, tau oligomerizasyonunu sağlayan mikrotübül bağlama alanının açığa çıkmasına neden olur. Bu durum mikrotübüllerin parçalanmasına ve böylece nörotransmisyonun bozulmasına yol açar. Mikrotübüllerin parçalanması ile tau proteini nöronlardan fibriler türlerin hücre dışı ortama salınmasıyla yayılır. Hiperfosforile Tau nöron dışında çözünmeyen çift sarmal filamentler halinde birikir. Biriken Tau proteinleri nörofibriler yumakları oluşturur. Alzheimer hastalığında nörofibriler yumakların öncelikle entorinal kortekste oluştuğu tespit edilmiştir. Nörofibriler yumak oluşumu sinaptik plastisitede ve aksonal transportta bozulmalara buna bağlı olarak da bilişsel yetersizliklerin ortaya çıkmasına neden olur (Chidambaram & Chinnathambi, 2020; Muralidar vd., 2020; Nisbet, Polanco, Ittner & Götz, 2015; Öztürk & Karan, 2009). Tau'nun hiperfosforile olması ile mikrotübül yapısındaki değişim ve nörofibriler yumak oluşumu süreci Şekil 2.2'de kısaca özetlenmektedir.



Şekil 2.2. Tau fosforilasyonu ile mikrotübül yapısının bozulması ve nörofibriler yumak oluşumu (Muralidar vd., 2020)

Alzheimer hastalarında, sağlıklı insanlara oranla yaklaşık dört kat daha fazla anormal veya hiperfosforile Tau proteini bulunmaktadır (Muralidar vd., 2020). Yapılan çalışmalar, Tau proteinlerinin Alzheimer hastalarında, özellikle bilişsel bozulmaların değerlendirilmesinde iyi bir belirteç olduğunu göstermektedir (Yu & Wu, 2021).

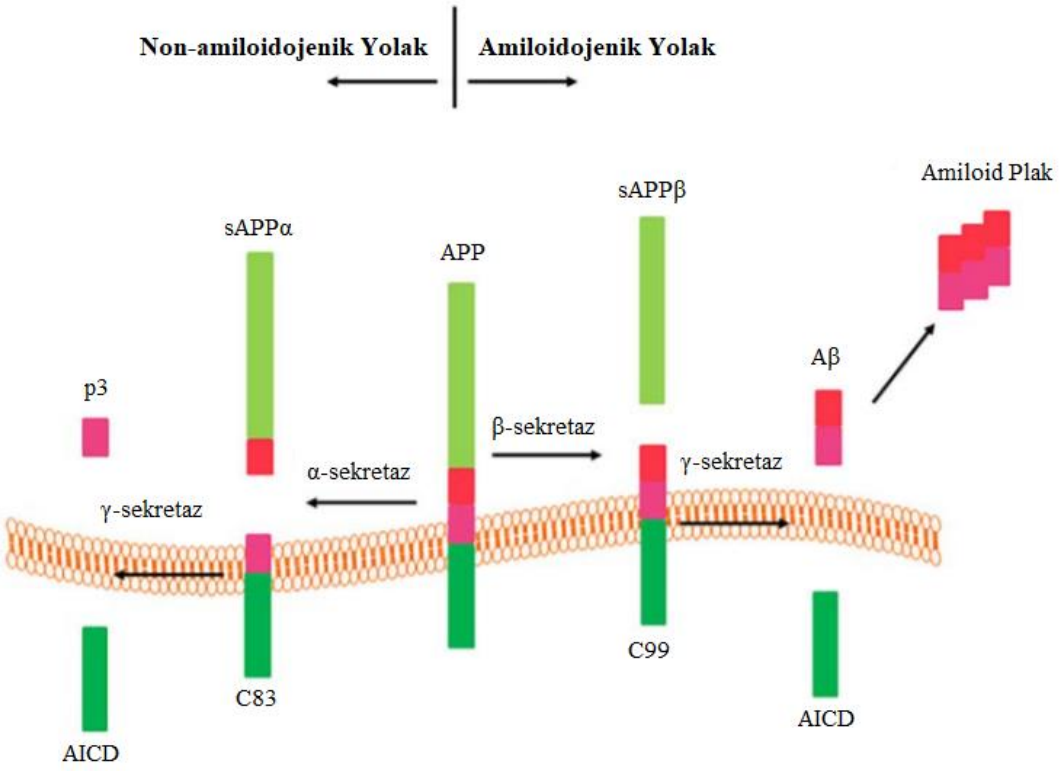
2004 yılında Götz ve arkadaşlarının transgenik farelerle yaptığı çalışmada, Tau'nun beyinde kümelendiği yere bağlı olarak seçici davranışsal bozukluklara neden olduğu tespit edilmiştir (Götz vd., 2004).

Nörofibriler yumaklar, belirli bölgelerde gelişip beyin boyunca öngörülebilir, rastgele olmayan bir şekilde yayılmaktadır. Bu durum bireyler arasında çok az farklılık göstermektedir. Nöronal değişiklikler fosfo-tau'ya özgü antikor AT8 kullanılarak nörofibriler yumak oluşumundan önce tespit edilebilmektedir. Ve bu hastalık ilerlemesinin altı aşamasını ayırt etmek için bir temel sağlar. Bu aşamalar klinik olarak sessiz vakaları temsil eden transentorhinal evreler I-II; yeni başlayan Alzheimer hastalığının limbik evreleri III-IV; ve tam olarak gelişmiş hastalığın neokortikal evreleri V-VI olarak belirtilir (Götz vd., 2004).

2.1.2.2. Amiloid Beta (Aβ) Proteini

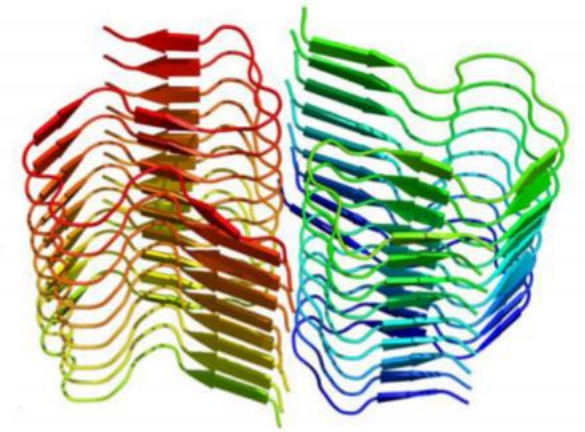
Amiloid-β (Aβ) proteini birikimi Alzheimer hastalığının en önemli ve en yakından ilişkili patolojik özelliği olarak kabul edilir. (Yu & Wu, 2021). Hastalıktaki sinaptik işlev bozukluğunun ve nörodejenerasyonun birincil sebebinin Aβ ile ilişkili toksisite olduğu düşünülmektedir (Sevigny vd., 2016).

Amiloid öncü protein (amyloid precursor protein-APP), beyin de dahil olmak üzere çeşitli insan dokularında eksprese edilen tip I transmembran proteindir. Hücre içi karboksi ucu, membran içinde 28 amino asitlik bölümü ve hücre dışı amino ucu vardır. Alzheimer hastalığına sebep olan Aβ proteini, APP'den proteolitik yolla oluşmaktadır, yani APP'nin bir metabolizma ürünüdür. APP, iki yol ile metabolize edilmektedir. Birincisi non-amiloidojenik yolaktır. Bu metabolik yolakta APP'nin sırasıyla α-sekretaz ve γ-sekretaz enzimleri tarafından kesilmesiyle sAPPα, p3, C83 ve AICD olarak isimlendirilen, çözünebilir fragmentler oluşmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları ile bu yolakla elde edilen sAPPα'nın nöronlar üzerinde olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir. Hastalığa sebep olan amiloid plaklardaki Aβ proteini, APP'nin β- ve γ- sekretaz enzimleri tarafından ardışık olarak kesildiği amiloidojenik yolak ile oluşmaktadır. Aβ'nın yanı sıra çözünebilir türler olan C99 ve AICD fragmentleri de oluşmaktadır. Bu yolakla oluşan Aβ proteini 40 ve 42 amino asit uzunluğundadır. $A\beta_{40}$ formu tüm Aβ proteinlerinin yaklaşık %90 kadarını oluşturmaktadır. Ancak $A\beta_{42}$ daha nörotoksiktir ve çözünmeyen oligomerler şeklinde toplanma olasılığı daha yüksektir (Alsalahat vd., 2021; Cheignon vd., 2018; Öztürk & Karan, 2009; Park vd., 2020; Yu & Wu, 2021; Zhao, Deng, Jiang & Qing, 2016). APP'nin non-amiloidojenik ve amiloidojenik yolak ile kesimi Şekil 2.3'te gösterilmektedir.

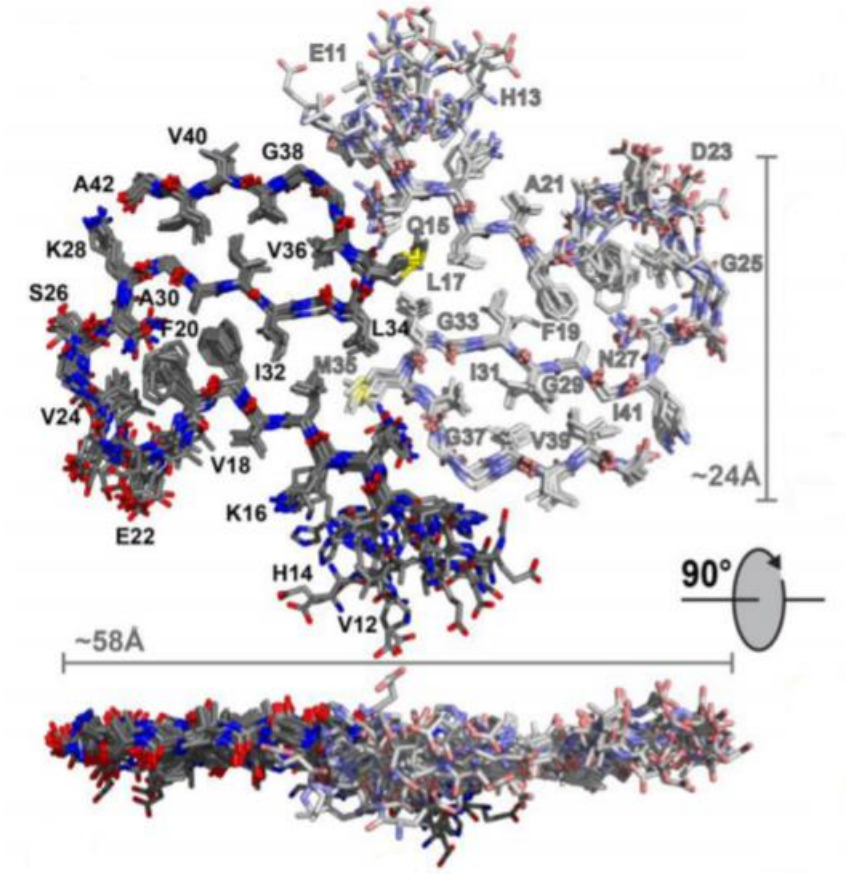


Şekil 2.3. APP'nin sekretaz enzimleri ile kesimi ve Aβ oluşumu (Zhao vd., 2016)

Şekil 2.3'te APP'nin β- ve γ- sekretaz enzimleri tarafından kesimi ile oluşumu gösterilen $A\beta_{42}$'nin moleküler yapısı, 2016 yılında Colvin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada katı hal nükleer manyetik rezonans (solid-state nuclear magnetic resonance) kullanılarak aydınlatılmıştır (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5).



Şekil 2.4. $A\beta_{42}$ dimerlerinin fibril ekseni boyunca hizalanmasını gösteren en düşük enerji yapısının ribbon (şerit) gösterimi (Colvin vd., 2016)



Şekil 2.5. $A\beta_{42}$'nin çubuk model gösterimi (Colvin vd., 2016)

Çoğu Aβ agregatı, tipik olarak 5-10 nanometre çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda olabilen fibriller şeklini alır (Tycko, 2016).

Alzheimer patolojisine yönelik öne sürülen açıklamalardan en iyi bilineni "Amiloid Kaskad" hipotezidir ve yapılan çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir (Yu & Wu, 2021). 1992 yılında John Hardy ve Gerald Higgins tarafından önerilen Amiloid Kaskad hipotezine göre, protofibriller ve fibriller halinde yeniden düzenlenmiş Aβ oligomer türlerinin oluşumu ile amiloid plakları oluşturan $A\beta_{42}$ agregasyonu başlamaktadır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde biriken oligomerlerin, özellikle hücresel zarları geçirgen hale getirebilmeleri sebebiyle hücreler için daha toksik türler olduğu, hücre işlev bozukluğuna sebep olduğu ve ölüme yol açan bir dizi olayı başlattığı düşünülmektedir. Bu hipoteze göre, hücre içi nörofibril yumaklarının oluşumu ve sinaptik fonksiyonların bozulması gibi olaylar bu erken ve kilit olaydan kaynaklanmaktadır (Cheignon vd., 2018; Tan & Gleeson, 2019).

$A\beta_{42}$ proteininin ekstraselüler ortamda birikimi ile oluşan yapılar, amiloid plaklar veya senil plaklar olarak isimlendirilmektedir (Cheignon vd., 2018).

Sağlıklı bireylerde kendi kendini düzenleyen mekanizmalar yoluyla Aβ üretimi ve eliminasyonu arasında bir denge sağlanmaktadır. Ancak bu dengenin çeşitli faktörler nedeniyle bozulması sonucunda Aβ agregasyonu meydana gelir. Bu da amiloid plakların oluşmasına ve bağlı olarak nöronal iletimde aksamalara neden olmaktadır (Yu & Wu, 2021).

Beyinde Aβ birikimi aşamaları Tau'dan farklı olarak evrelendirilmektedir. Buna göre neokortikal bölge evre I, allokortikal bölge evre II, diensefalik çekirdekler, striatum ve bazal önbeyin kolinerjik çekirdekleri evre III, birkaç beyin sapı çekirdeği evre IV ve son olarak evre V serebellar Aβ birikimi olduğu görülmektedir (Götz vd., 2004).

Oksidatif stres, nöroinflamasyon, hiperfosforile tau ve metabolik yolaklardaki düzensizlik gibi bir dizi mekanizmanın Aβ birikimini tetiklemesiyle toksik oligomerlerin üretildiği belirtilmektedir (Yu & Wu, 2021).

Yapılan deneysel çalışmalar nörofibriler yumak oluşumu ile hastalığa dair klinik belirtilerin eşzamanlı olduğunu ancak amiloid plak birikimi ile klinik belirtiler arasında çok düşük bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Özkay vd., 2011). Bu durumda $A\beta_{42}$'nin agregasyonunun, Tau patolojisinden önce gerçekleştiği sonucuna varılmaktadır. Hatta $A\beta_{42}$ birikiminin hastalıkta nedensel bir rol oynadığı düşünülmektedir (Mitsubori vd., 2021; Xiong, Ge & Ma, 2019). Ferrari ve arkadaşları tarafından 2003 yılında fareler üzerinde yapılan çalışmada da bu düşünceyi destekleyen, Aβ'nin nörofibriler yumak oluşumunu indüklediği sonucu çıkmıştır (Ferrari, Hoerndli, Baechi, Nitsch & Götz, 2003).

$A\beta_{42}$'nin birikimi ve bunun sonucunda senil plakların oluşumunun süresi bireyler arasında farklılık gösterse de bu birikimin hastalık belirtilerinin ortaya çıkışından yaklaşık 20-30 yıl önce başladığı literatürde yer almaktadır (Altuna-Azkargorta & Mendioroz-Iriarte, 2020; Özkay vd., 2011; Shaw vd., 2019).

Sağlıklı bireylerde de ilerleyen yaş ile beraber $A\beta_{42}$ birikimine bağlı senil plaklara rastlanmaktadır. Ve bu durum "Bu kişiler sağlıklı mı yoksa klinik öncesi evrede mi?" sorusunu yaratmaktadır (Xiong vd., 2019).

Alzheimer hastalığında $A\beta_{42}$'nin beyin omurilik sıvısındaki miktarlarının sağlıklı bireylerdeki miktarlarına göre farklı olduğu tespit edilmiştir. Buna göre hafif bilişsel bozukluğun görüldüğü evre dahil olmak üzere hastalık boyunca beyin omurilik sıvısındaki $A\beta_{42}$ miktarları sağlıklı kişilerdeki miktarlarına oranla daha düşük bulunmuştur. Bu durum, APP'nin amiloidojenik yolakta β- ve γ-sekretaz enzimleri tarafından kesilmesiyle oluşan $A\beta_{42}$'nin beyinde hızla senil plak oluşumuna katılmasıyla ve buna bağlı olarak da beyin omurilik sıvısındaki miktarlarının azalmasına yol açtığı şeklinde açıklanmaktadır (Mehta, 2007).

Diğer taraftan Alzheimer hastalığında $A\beta_{42}$'nin kan plazmasındaki seviyeleri hakkında çeşitli tartışmalar mevcuttur. Bu yönde yapılan çalışmalarda "erken başlangıçlı Alzheimer" hastalarında kan plazmasındaki $A\beta_{42}$ miktarlarının sağlıklı bireylerdeki miktarlarına oranla 2-3 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fakat "geç başlangıçlı Alzheimer" hastaları arasında kan plazmasındaki $A\beta_{42}$ miktarları farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların; $A\beta_{42}$'nin albümin, eritrosit ve bunun gibi moleküllere değişen oranlarda bağlanması ve böylece fibril yapısı oluşturamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı bağlanma ve fibril yapısı oluşturma oranlarının hastalar arasında benzer sonuçların gözlenmesine engel oluşturabildiği görüşü vardır. Ancak bu konudaki tartışmalara rağmen yapılan araştırmalar göstermektedir ki; sağlıklı bireylere göre daha yüksek $A\beta_{42}$ seviyeleri tespit edilen kişilerde, yüksek $A\beta_{42}$ seviyesi ile hastalığın ilerleyen dönemlerindeki bilişsel becerilerde azalma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır. Bu durum kan plazmasında yüksek $A\beta_{42}$ miktarının Alzheimer hastalığına yakalanma ihtimalini arttırdığını düşündürmektedir. Ayrıca hastalığın farklı dönemlerinde $A\beta_{42}$ miktarının arttığı da gösterilmiş olup aynı hastalardan belirli sürelerle alınan örneklerde plazma $A\beta_{42}$ seviyesinin giderek arttığı da gözlemlenmiştir (Mehta, 2007; Roher vd., 2009; Song vd., 2011; Xia vd., 2009). Kan plazmasındaki $A\beta_{42}$ miktarları, hastalar arasında bu değişiklikleri göstermesine rağmen, Ulusal Yaşlanma Enstitüsü-Alzheimer Derneği ve Uluslararası Çalışma Grubu 2, Alzheimer hastalığının

teşhisinde Aβ peptidini belirteç biyomolekül olarak önermektedir (Carneiro, Morais & Pereira, 2020).

Alzheimer hastalığına dair önemli bir biyobelirteç olan $A\beta_{42}$'nin kan plazması, beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarındaki tayini, hem hastalığın klinik öncesi tespite imkan vermesi hem de hastalık mekanizmasının açıklanmasına katkı sağlaması ve ilaç geliştirme çalışmalarında ilaçların etkinliğinin takibi için önem arz etmektedir (Xing & Xia, 2015).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Nedenleri

Alzheimer hastalığının oluşumunda hem genetik hem de çevresel faktörler rol oynamaktadır. Ancak en önemli neden tüm demans türlerinde olduğu gibi Alzheimer hastalığında da bireylerin ilerleyen yaşıdır. Yapılan çalışmalar Alzheimer hastalığında genetik etkenin yaklaşık %70-80 oranında olduğunu göstermektedir. Ancak bu doğrultuda yapılan çalışmalarda yalnızca APOE'nin risk geni olduğu doğrulanmaktadır (Götz vd., 2004; Özkay vd., 2011).

Alzheimer hastalığının gelişiminde düşük eğitim seviyesi, bilinç kaybına neden olan kafa travmaları, Down sendromu, aterosklerotik karotid hastalığı, miyokard infarktüsü, atriyal fibrilasyon gibi etkenlerden de söz edilmektedir (Özkay vd., 2011).

Alzheimer hastalığı erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olarak sınıflandırılabilmektedir. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığının üç gende gerçekleşen mutasyonla yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlar amiloid beta öncü proteini (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genleridir. Hastalığın erken başlangıçlı formu genellikle 65 yaşın altındaki bireylerde görülür ve Alzheimer hastalarının yaklaşık %4-5'ini oluşturur. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ise daha sık görülen formdur, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında Apolipoprotein E (APOE) Є4 allelinin varlığı, aşırı Aβ agregasyonuna sebep olduğu için geç başlangıçlı hastalık riskini artırdığı düşünülmektedir. Ek olarak, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, TREM2, TYROBP ve CD33 gibi bağışıklık sistemi yolakları ve epizodik bellek ile ilgili olanlar

da dahil olmak üzere birçok genin geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına yatkınlıkla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Özkay, vd., 2011; Yu & Wu, 2021).

Kadınların, daha uzun yaşam süreleri ve menopoz sonrası östrojen seviyelerindeki azalma nedeniyle Alzheimer hastalığına yakalanma riski erkeklerden daha fazladır (Cheignon vd., 2018).

2.1.4. Alzheimer Hastalığının Belirtileri

Alzheimer hastalarında ilk olarak bellek sorunları bunu takiben muhakeme, çevreye uyum ve sözel becerilerde problemler ortaya çıkmaktadır (Götz vd., 2004). Hafif bilişsel bozukluklarla başlayan hastalık sürecinde ilerleyen safhalarda plan yapma ve organizasyon becerilerinde zayıflıklar, yer ve zaman kavramları ile ilgili zihinsel karışıklıklar, sonradan öğrenilen ve motor beceri gerektiren işleri yapmada güçlük görülmektedir. Hastalığın son dönemlerinde ise konuşma becerilerinde kayıplar, yürümede bozulmalar, yutmada zorluk meydana gelir. Alzheimer hastalığı teşhisi konulan hastaların çoğunda tüm bu zihinsel ve bilişsel değişikliklerin yanında psikiyatrik belirtilerin de olduğu görülmektedir. Bunlar; depresyon, anksiyete, apati (çevre ile ilgisizlik), yalnız kalma fobisi, amaçsız dolaşmalar, ajitasyon, saldırganlık ve sanrılardır.

Hastaların ortalama yaşam süresi tanı konulduktan sonra 5-20 yıldır. En sık ölüm nedeni brokopnömani yani bronş ve akciğer iltihabıdır (Keleş & Özalevli, 2018; Özkay vd., 2011; Selekler, 2010).

Alzheimer's Disease International (ADI), demanslı kişileri ve ailelerini desteklemek üzere, 78 Alzheimer derneğinin uluslararası federasyonu olarak 1984 yılında kurulmuştur. ADI'nin vizyonu; demans hastaları ve aileleri için daha iyi bir yaşam kalitesidir. ADI, Londra merkezlidir ve ABD'nin Illinois eyaletinde kâr amacı gütmeyen bir kuruluş olarak kayıtlıdır (Chaib, 2012).

2.1.5. Alzheimer Hastalığının Teşhis Yöntemleri

Alzheimer hastalığı genellikle ileri yaşlarda ortaya çıktığı için erken evrelerdeki semptomlar yaşlanmaya bağlı bilişsel bozukluklarla benzerdir. Bu durum hastalığın erken evrede teşhis edilmesinde zorluğa sebep olmaktadır (Arco, Ramírez, Górriz & Ruz, 2021). Ayrıca hafıza problemlerinin altında yatan pek çok neden olabileceğinden, kesin Alzheimer tanısı ancak hastanın ölümünden sonra yapılan beyin otopsisi ile konulabilmektedir. Buradaki ana kriter ise amiloid plakların ve nörofibriler yumakların bölgesel dağılımı ve miktarıdır. Günümüzde kullanılan klinik kriterlere göre hastalık ancak geç evrede teşhis edilebilmektedir ve diğer hastalık ihtimalleri elenerek olası Alzheimer tanısı konulabilmektedir (Ma vd., 2020; Mattson, 2004).

Beyin görüntüleme teknikleri, klinik değerlendirmeleri tamamlayıcı önemli bilgiler elde edilmesine imkân sağlamaktadır. Bu amaçla tek foton emisyon tomografisi (SPECT, Single Photon Emission Tomography), pozitron emisyon tomografisi (PET, Positron Emission Tomography), fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI, functional Magnetic Resonance Imaging) teknikleri kullanılmaktadır (Arco vd., 2021).

İlerleyen yaş ile birlikte beyin hacminde küçülme (atrofi) görülmektedir. Sağlıklı yaşlanma ile Alzheimer hastalığından kaynaklanan nörodejeneratif değişimler arasındaki fark çok belirgin olmasa da beynin belirli bölgelerindeki küçülmelerin, sağlıklı yaşlanmaya kıyasla Alzheimer hastalığında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Örneğin hipokampal hacimdeki azalma sağlıklı bireyler ile demanslı bireyler arasında farklılık göstermektedir ve beyin bozulma oranını araştırmak için belirteç olarak kabul edilmektedir (Mofrad vd., 2021).

Beyindeki değişim, beyin bölgelerindeki nöronal hücre kaybının sayılması ve beyin bölgelerinin hacmindeki değişikliklerin nörogörüntüleme verilerinden hesaplanması gibi farklı yöntem ve tekniklerle incelenmektedir (Mofrad vd., 2021).

2.1.6. Alzheimer Hastalığında Tedavi Yöntemleri

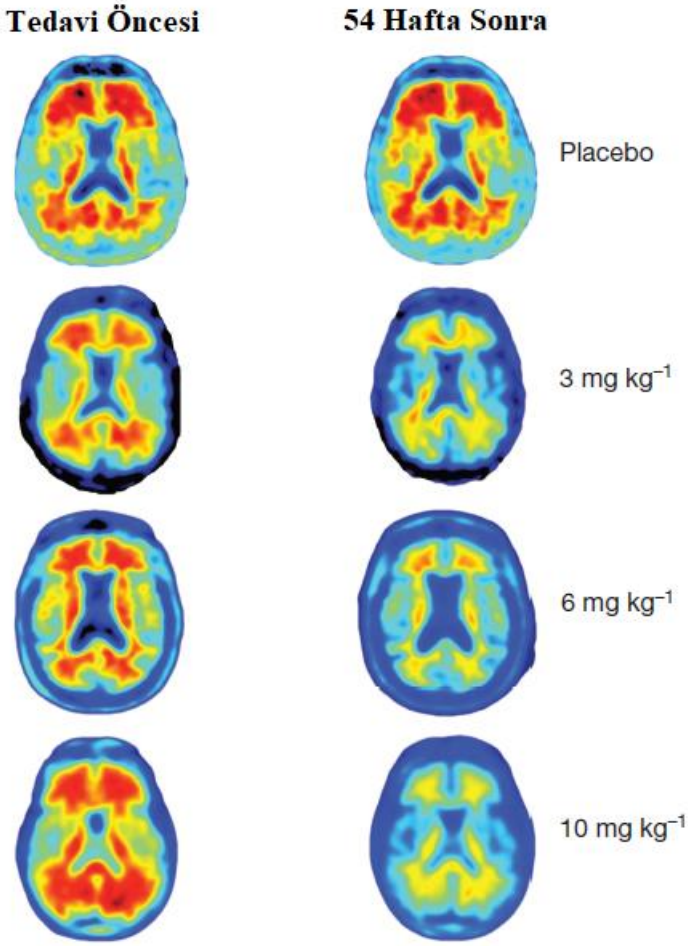
Tüm hastalıkların tedavisinde amaç; patolojik durumun ortadan kaldırılması, hastalığın ilerlemesinin durdurulması ve hastanın normal yaşamına döndürülmesidir. Günümüzde Alzheimer hastalığı için bu koşulları sağlayan bir tedavi yöntemi maalesef

bulunmamaktadır. Ancak mevcut tedavi yöntemleriyle hastalığın ilerleyişi yavaşlatılıp hastaların günlük aktivitelerini gerçekleştirmeleri kolaylaştırılabilmektedir (Selekler, 2010; Yu & Wu, 2021). Kullanılan tedavi yöntemleri orta ve ileri derecedeki hastalarda çok fazla etkili olmamaktadır. Fakat erken evrede hastalığın ilerlemesi yavaşlatılabilmektedir. Bu noktada hem nörodejenerasyonun yavaşlatılması hem de yeni ilaçların geliştirilebilmesi ve geliştirilen ilaçların etkinliğinin ölçülebilmesi için erken teşhis önem kazanmaktadır (Arco vd., 2021; Ma vd., 2020; Mofrad vd., 2021).

1998'den beri büyük ilaç şirketleri Alzheimer hastalığının tedavisi için ilaç geliştirme çalışmaları yürütmektedir. Bugüne kadar yalnızca beş tanesi Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bu ilaçlar Kolinesteraz inhibitörleri (ChEI'ler) ve NMDAR antagonistleri olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. ChEI'ler donepezil (Aricept), rivastigmin (Exelon), galantamin (Razadyne) ve takrindir. Ancak hepatotoksisite nedeniyle takrin artık kullanılmamaktadır. Bu tip ilaçlar sinapslardaki asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe ederler. Böylece nöronlar arasında normal sinir iletimini destekleyen, hastaların bilişsel performansını ve hafızasını geliştiren endojen asetilkolin varlığını arttırmaktadırlar. NMDAR antagonisti memantin ise aşırı glutamat salınımını önleyerek glutamat kaynaklı eksitotoksisitenin neden olduğu nöronal işlev bozukluğunu ve beyin hücresi hasarını azaltmaktadır. Maalesef her iki ilaç sınıfı da sadece klinik semptomları kısa süreler için inhibe etmektedir, ancak hastalığın ilerlemesini durduramamaktadır (Yu & Wu, 2021).

İlaç çalışmalarında ana hedef moleküller genellikle Aβ ve Tau proteinidir (Nisbet vd., 2015). Ancak genetik, nöropatolojik ve hücre biyolojisi alanında yapılan çalışmalar göstermektedir ki, Aβ molekülü, Alzheimer hastalığının tedavisi için daha iyi bir hedef proteindir (Sevigny vd., 2016). Ancak Aβ'yi hedef alan, araştırması devam edenler de dahil olmak üzere, bir dizi tedavi yöntemi, faz III klinik denemelerinde başarısız olmaktadır. Ve sonuç olarak bu durum amiloid kaskad hipotezinin güvenilirliği hakkında şüpheler uyandırmaktadır. Yine de tedavide hasta seçimi, sonuç ölçütlerinin seçimi, ilaçların tasarımı ve etki mekanizmaları ile ilgili mevcut sorunların varlığı hipotezin çürütülmesine engel olmaktadır. Hatta Aducanumab ile yapılan çalışmanın başarısı, amiloid hipotezi için güçlü bir destek sağlamaktadır (Yu & Wu, 2021).

Alzheimer hastalığına yönelik, Sevigny ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmalar sonunda antikor bazlı bir immünoterapi ilacı geliştirilmiştir (Sevigny vd., 2016). Aduhelm isimli bu ilaç 2021 yılında FDA tarafından, bir takım klinik belirsizlikleri olduğu kabul edilerek, hızlandırılmış onay yolu kapsamında onaylanmıştır (Food and Drug Administration, 2021). Bu ilaç için yapılan klinik öncesi çalışmalarda bir aducanumab analoğunun kan-beyin bariyerini geçerek hedefe bağlanıp transgenik farelerin beyinlerindeki plaklarda bulunan Aβ'yı temizleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Daha sonra bu çalışma kapsamında, insan B-hücresi klonları kullanılarak Aβ agregatlarında bulunan neo-epitoplar tarafından tetiklenen antikor geliştirilmiştir. B-hücreleri çözünür oligomerler ve çözünmeyen fibriller de dahil olmak üzere Aβ agregatları ile seçici olarak reaksiyona giren, bir insan monoklonal antikoru olan, Aducanumab'ın (BIIB037) moleküler klonlanmasına, dizilenmesine ve rekombinant ekspresyonuna izin vermektedir. Çalışmanın devamında Aducanumab ile klinik denemelere geçilmiştir. Tedavi öncesi alınan pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntüleri ile ilaç kullanımından 54 hafta sonra alınan PET görüntüleri karşılaştırıldığında, hastaların beyinlerindeki amiloid plaklardaki belirgin azalma görülmektedir (Şekil 2.6) (Sevigny vd., 2016).



Şekil 2.6. Aducanumab kullanımı öncesi ve 54 hafta sonrası PET görüntüleri (Sevigny vd., 2016)

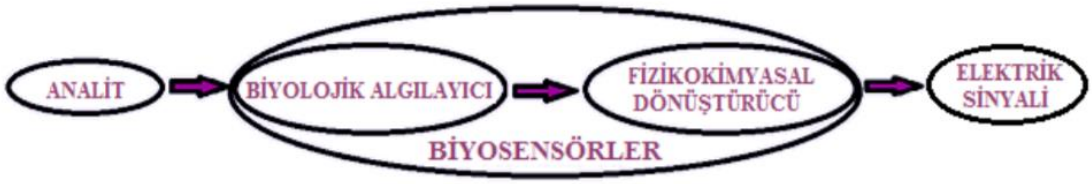
Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından diyabet, sigara, kötü beslenme ve fiziksel hareketsizlik gibi faktörlerin elimine edilmesinin hastalığı önlemede etkili olabileceği açıklanmıştır. Ayrıca oksidatif stres, nörodejenerasyonda önemli bir rol oynadığı için hastalığa yakalanma riski yüksek veya hastalığın erken evresindeki bireylerde antioksidanların kullanımını tavsiye etmektedir (Yu & Wu, 2021).

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik ve sentetik süreçlerin sürekli izlenmesi ve bu süreçlerin anlaşılmasında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Zhang, Wright & Yang, 2000). Biyosensörler, çevresel, klinik, tarım, gıda ve savunma uygulamalarında çeşitli analitlerin kalitatif ve kantitatif tayini için bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Malhotra & Pandey, 2017). Son yıllarda dünya çapında biyobelirteçler ile yapılan tayinlerde, biyosensörler en

güvenilir, hızlı ve kesin analitik yöntemler olarak yaygın kullanım alanına sahiptir (Hasan vd., 2021). Biyosensörlerin kullanımının giderek yaygınlaşmasında farklı analitlere uyum sağlama ve yüksek seçicilik gibi özelliklere de sahip olmaları etkendir. Ayrıca biyosensörlerin minyatürleştirmeye uygun olmaları, onları saha ve yerinde ölçümler için gerekli araçlar haline getirmektedir (Sezgintürk, 2020).

Biyosensörlerin çıkış noktası, canlıların algılama ve tepki mekanizmalarıdır. Biyosensörler, bir transdüsere yakından bağlı veya entegre edilmiş bir biyolojik algılama elemanı (biyoreseptör) içeren cihazlardır. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tarafından yapılan tanıma göre ise biyosensörler; biyolojik yanıtı optik, termal veya elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Bu cihazların kullanım amacı belirli bir kimyasalın veya bir dizi kimyasalın konsantrasyonuyla orantılı olan bir dijital elektronik sinyal üretmektir (Sezgintürk, 2020; Turner, Karube & Wilson, 1987).



Şekil 2.7. Biyosensörü oluşturan bileşenler (Tüylek, 2017)

Biyoreseptör olarak kullanılan moleküller, ilgilenilen analit ile spesifik olarak etkileşime giren ve yüksek bağlanma kapasitesi gösterebilen moleküllerdir. Böylece bir biyosensör sisteminde, biyoreseptör yardımı ile analit konsanstrasyonuyla orantılı kimyasal veya fiziksel çıkış sinyali elde edilir. Biyoreseptörler, hedef analitleri tanımadaki rolleri nedeniyle biyosensörlerin önemli bileşenleridir. Bu yüzden biyoreseptör seçimi hedef analite bağlıdır (Sezgintürk, 2020; Thévenot, Toth, Durst & Wilson, 2001).

Biyosensörlerde transdüser yani dönüştürücü kısım, biyoreseptör ve analit arasında gerçekleşen biyokimyasal tanıma olayını, çift yönlü, ölçülebilir bir sinyale dönüştüren elektronik cihazlardan meydana gelmektedir. Burada biyoreseptör ve analit arasındaki tanıma olayı yeni bir ürün oluşumu, ısı salınımı, elektron akışı, pH değişimi gibi çeşitli dönüşümlerle gerçekleşmektedir. Transdüserdeki sinyal dönüşümü elektriksel olmayandan elektriğe veya tam tersi şekilde de olabilir (Sezgintürk, 2020; Thévenot vd., 2001).

Biyosensörler ilk kez 1950'lerin ortalarında, L. C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat esnasında, kanda O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesi ile keşfedilmiştir. 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından, bir oksido-redüktaz enzimi olan glukozoksidaz enziminin platin elektrot yüzeyine immobilize edilmesi ile kan glukozunun ölçümü yapılmıştır. Bu biyosensör sistemi, enzim elektrodu olarak bilinen bir elektrotla tasarlanan elektrokimyasal temelli bir biyosensördür. Oluşturulan bu analiz yoluyla, biyolojik sistemin (enzim) yüksek spesifikliği ve fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığı birleştirilmiştir (Bulut, 2011; Clark & Lyons, 1962; Wang, Xu, Zhang, & Li, 2008).

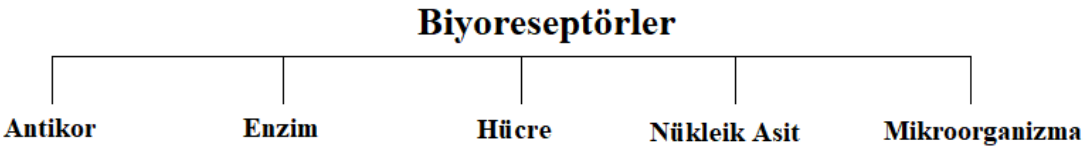
İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler;

1. Biyoreseptör, analizin amacı için oldukça spesifik olmalı, normal saklama koşulları altında stabil olmalı ve testler arasında düşük bir varyasyon göstermelidir.
2. Yapılan analiz karıştırma, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden mümkün olduğunca az etkilenmelidir.
3. Biyosensör cevapları, seyreltme veya mevcut konsantrasyondan bağımsız olarak, ilgili konsantrasyon aralığında doğru, kesin, tekrarlanabilir ve lineer olmalıdır.
4. Biyosensör cevapları elektriksel veya diğer dönüştürücü kaynaklı gürültülerden arındırılmış olmalıdır.
5. Tasarlanan biyosensör sistemi eğer invaziv klinik uygulamalarda izleme için kullanılacaksa, prob küçük ve biyouyumlu olmalı, toksik veya antijenik etkileri olmamalıdır. Ayrıca, biyosensör inaktivasyona veya proteolize eğilimli olmamalıdır.
6. Tasarlanan biyosensör ucuz, küçük, taşınabilir ve uzman kullanıcılar olmaksızın kullanılabilecek nitelikte olmalıdır (Grieshaber, MacKenzie, Vörös & Reimhult, 2008).

2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörlere ait farklı sınıflandırmalar olsa da temel olarak biyoreseptör ve transduser kısımlarına göre sınıflandırılmaktadır.

Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması

Şekil 2.8'de verildiği üzere antikorlar biyosensörlerde biyoreseptör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Antikorlar, iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşan "Y" şeklinde immünoglobulin proteinleridir. *In vitro* üretimleri sonucunda poliklonal ve monoklonal olarak sınıflandırılabilmektedir. Poliklonal antikorlar bir dizi bağışıklık hücresi tarafından üretilir ve antijenlere çeşitli bölgelerden ve farklı afinitelerle bağlanırlar. Monoklonal antikorlar ise tek bir hücrenin benzer klonları tarafından üretilir ve antijende epitop adı verilen aynı hedef bölgeye eşit afinite ile bağlanırlar. Antikorlar analite spesifik, kararlı ve çok yönlüdür (Malhotra & Pandey, 2017; Sezgintürk, 2020).

Biyoreseptör olarak enzim kullanılan biyosensörlerde, enzimin substrat ile spesifik bir etkileşime girmesiyle, enzimin katalizi ve/veya inhibisyonu ölçülebilmektedir. Burada enzim, analiti metabolize edebilir ve bu sayede analitin konsantrasyonu, analitin katalitik dönüşümü ile ölçülebilir. Veya enzim, analit tarafından inhibe edilebilir, analit konsantrasyonunun azalması takip edilebilir. Bu tip biyosensörlerde enzimler adsorpsiyon, kovalent bağlanma, çapraz bağlanma ve jeller veya polimer matrislerde tutuklama ile bir biyoaktif tabaka üzerinde immobilize edilebilmektedir. Ölçüm sisteminde meydana gelen kataliz veya inhibisyon temelli

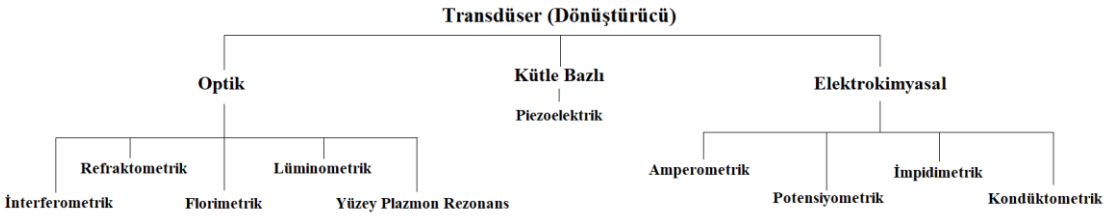
reaksiyonlarda konsantrasyonların hızlı bir şekilde dengeye ulaşması için difüzyonu azaltmak amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olan en ince hale getirilmesi önemlidir. Pratikte enzim elektrotlarının kullanım alanı oldukça geniştir. Böyle olmasının en önemli nedeni, canlı sistemler sayesinde her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analiz işleminde kullanılacak kadar bol enziminin bulunmasıdır (Sezgintürk, 2020; Tüylek, 2017; Wang vd., 2008).

Bakteri, mantar, maya, alg ve doku kültürü hücreleri gibi canlı organizmalar biyoreseptör olarak kullanılabilmektedir. Burada ölçüm canlı organizmanın genel metabolik durumunun takip edilmesiyle yapılmaktadır. Hücre kullanımından kaynaklanan azaltılmış saflaştırma adımları gereksinimi önemli avantajlarındandır (Sezgintürk, 2020).

Biyoreseptör olarak nükleik asitlerin (DNA ve RNA) kullanıldığı biyosensörlerde meydana gelen hibridizasyona dayalı ölçüm yapılmaktadır. Bu tip biyosensörlerin avantajı biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşimin kararlılığıdır (Sezgintürk, 2020).

Bir biyosensörde mikroorganizmalar biyoreseptör olarak kullanıldığında ölçüm, mikroorganizmalar tarafından organik bileşiklerin asimilasyonu, solunum aktivitesindeki değişim veya elektroaktif metabolitlerin üretimine dayalı olarak yapılmaktadır (Turner vd., 1987).

Biyosensörlerin transdüsere göre sınıflandırılması Şekil 2.9'da görülmektedir.



Şekil 2.9. Biyosensörlerin kullanılan transdüsere göre sınıflandırılması

Biyosensörde kullanılan transdüsere göre yapılan sınıflandırma ayrıntılanacak olursa; optik biyosensörler klinik, gıda güvenliği ve çevre kirliliği analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sensörler, analit moleküllerinin veya bir kemo-optik dönüştürücü ortamın kırılma indeksi, absorbans ve floresan özelliklerindeki değişikliğin ölçümüne dayanır. Optik biyosensörler kapsamında refraktometri, interferometri, spektroskopik

(lüminesans, fosforesans, floresan, Raman) ve yüzey plazmon rezonans (SPR) kullanılan farklı biyosensör sistemleri vardır. En yaygın kullanılan biyosensörler, fiber optik entegre SPR ve floresan tabanlı biyosensörlerdir (Malhotra & Pandey, 2017; Sezgintürk, 2020).

Piezoelektrik temelli biyosensörler ise analitik kimyadaki potansiyel uygulamalar için hassas kütle-frekans dönüştürücülerdir. Bir piezoelektrik cihaz, aktif yüzeyi ile temas halinde olan numunelerin kütlesi, yoğunluğu veya viskozitesindeki değişiklikleri takip etmektedir. Bu yöntemde piezoelektrik kristale alternatif bir voltaj uygulanır ve daha sonra öncekinin neden olduğu mekanik salınım analiz edilir. Salınımların frekansı ölçülür ve buradaki değişim hedef analitin konsantrasyonu ile orantılıdır. Piezoelektrik etki, bir dielektrik malzemeye uygulanan basınç, kristal kafesini deforme ettiğinde gözlenir. Piezoelektrik transdüksiyon, biyolojik bir ortama genellikle farklı tiplerde olabilen ilerleyici veya duran akustik dalgalar biçiminde mekanik ve elektriksel kuvvetler sağlar. Piezoelektrik tabanlı biyosensörlerde bu prensip kullanılarak birçok farklı proteinin tayini için etiketsiz ölçüm sistemleri geliştirilmiştir (Malhotra & Pandey, 2017; Sezgintürk, 2020).

Elektrokimyasal biyosensörler, transduser olarak bir elektrokimyasal sinyal dönüştürücü elemanı ile doğrudan temasta tutulan bir biyolojik tanıma elemanı (biyokimyasal reseptör) kullanarak, nicel veya yarı nicel analitik bilgi sağlayabilen bağımsız entegre cihazlardır (Thévenot vd., 2001). Elektrokimyasal biyosensörlerde, biyoreseptörde gerçekleşen reaksiyonun ölçümü akım temelli ise amperometrik, potansiyel ya da yük temelli ise potansiyometrik, elektrotlar arasındaki iletkenliğin ölçümüne dayanıyorsa kondüktometrik biyosensör sınıfına dahildir (Grieshaber vd., 2008). Eğer biyosensör sisteminin elektrik akımına karşı direnci ölçülüyorsa impidimetrik biyosensör sınıfına dahildir (Malhotra & Pandey, 2017).

Bu tez kapsamında elektrokimyasal impedans esaslı bir amiloid beta biyosensörü geliştirildiği için elektrokimyasal esaslı biyosensörler daha ayrıntılı olarak incelenecektir.

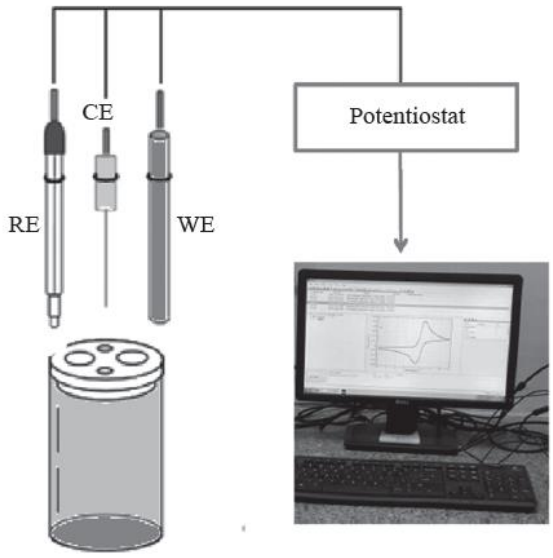
2.2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyoalgılama elemanının analit ile etkileşimi sonucu elektrokimyasal türlerin üretimi veya tüketiminin, transduser ile bir elektrokimyasal sinyale dönüştürüldüğü, analitik ölçüm yapabilen cihazlardır (Kuralay, 2019; Thévenot vd., 2001). Elektrokimyasal biyosensörler, yüksek özgüllük, duyarlılık ve seçicilikle biyomoleküllerin analizine izin vermeleri, düşük tepki süresine sahip olmaları ve uygun maliyetli olmaları nedeniyle geniş çapta araştırma alanına sahiptir. Ve bu avantajları sebebiyle geleneksel analitik araçların yerini almaya başlamıştır. (Malhotra & Pandey, 2017; Wang vd., 2008). Elektrokimyasal biyosensörler klinik analizlerde, endüstri için çevrimiçi kontrol süreçlerinde, çevre ile ilgili araştırmalarda ve hatta in vivo çalışmalarda kullanılabilmektedir (Malhotra & Pandey, 2017).

Elektrokimyasal biyosensörlerdeki reaksiyonlar kullanılan elektrot yüzeyinde gerçekleştiği için bu ölçüm prensibinde elektrotlar önemli bir rol oynamaktadır. Seçilen elektrodun kullanım amacına bağlı olarak elektrot malzemesi, yüzey modifikasyonu veya boyutları, algılama kabiliyetini büyük ölçüde etkilemektedir (Grieshaber vd., 2008).

Elektrokimyasal biyosensörlerde ölçüm sistemi genellikle bir referans elektrot, bir yardımcı (karşıt) elektrot ve çalışma (redoks, algılama) elektrotu olarak da bilinen üçlü elektrot sistemi ile yapılmaktadır (Grieshaber vd., 2008).

Tipik bir elektrokimyasal biyosensör sistemi Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Tipik bir elektrokimyasal biyosensör sistemi. WE; çalışma elektrodu, CE; karşıt elektrot ve RE; referans elektrot (Malhotra & Pandey, 2017)

Şekil 2.10'da gösterilen biyosensör sisteminde referans elektrot olarak genellikle Ag/AgCl elektrot kullanılır, bilinen ve kararlı bir potansiyeli korumak için reaksiyon bölgesinden belirli bir mesafede tutulur. Çalışma elektrotu, yüzeyinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonda transdüksiyon elemanı olarak görev yapmaktadır. Karşıt elektrot ise çalışma elektrotuna bir akım uygulanabilmesi için elektrolitik çözeltiyle bir bağlantı kurar. Bu sistemdeki tüm elektrotlar hem iletken hem de kimyasal olarak kararlı olmalıdır (Grieshaber vd., 2008).

Ayrıca elektrokimyasal biyosensörlerde hassas ve kararlı bir cevap elde etmek için, ölçüm hücresinde, elektron aracısı olarak redoks probu kullanılır (Shahdost-fard & Roushani, 2017).

2.2.2.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

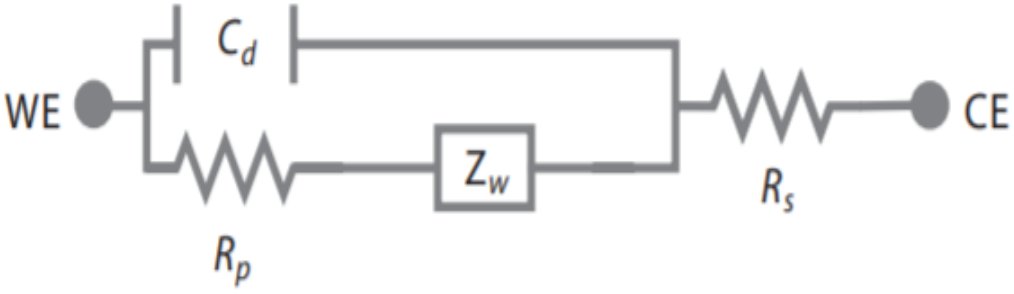
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), eşdeğer devrelerin model olarak kullanıldığı, heterojen sistemlerin (membran/elektrolit sistemleri) elektriksel özelliklerinin belirlenmesini sağlayan, malzemeleri ve arayüzleri karakterize etmek için kullanılan bir tekniktir (Benavente, 2005).

İmpedans, bir devreden geçen elektrik akımına karşı gösterilen dirençtir. Çözeltiler, arayüzler ve yapılan kaplamalar ile iyon akışı engellenebilir. Bu durumda impedans, engelenen iyon akışının bir ölçüsü olmaktadır (Malhotra & Pandey, 2017).

Bir sinüzoidal potansiyel uygulandığında, bu potansiyele verilen yanıt, sinüzoidal fonksiyonların toplamı olarak kabul edilebilecek bir alternatif akım (AC) sinyalinin üretilmesiyle sonuçlanır. Elektrokimyasal impedans spektroskopsinde (EIS) bir ölçüm hücresine giden, farklı frekanslarda (genellikle 10^{-6}-10^{9} Hz aralığında), genliği küçük alternatif akıma karşı, ölçüm sisteminin gösterdiği direnç tespit edilir (Benavente, 2005; Lasia, 2014; Malhotra & Pandey, 2017).

İmpedans ölçümleri, elektrokimyasal bir reaksiyondan kaynaklanan akımın, elektrikli bir arayüzde aktığı açık devre potansiyelinde yapılır. Buradaki yük aktarımı Faradaik ve Faradaik olmayan bileşenler içerir. Faradaik bileşenler, uygun bir aktivasyon bariyerini, yani polarizasyon direncini (Rp) ve kompanse edilmemiş çözelti direncini (Rs) aşarak arayüz boyunca o elektrokimyasal reaksiyon yoluyla gerçekleşen elektron transferinden kaynaklanır. Faradaik olmayan bileşen ise çift katmanlı kapasitörün (Cdl) şarj edilmesinden kaynaklanır. Belirli bir potansiyeldeki aktivasyon bariyeri olan Rp değeri, standart (formal) elektrot potansiyelinde yük transfer direnci (Rct) haline gelir (Chang & Park, 2010; Malhotra & Pandey, 2017).

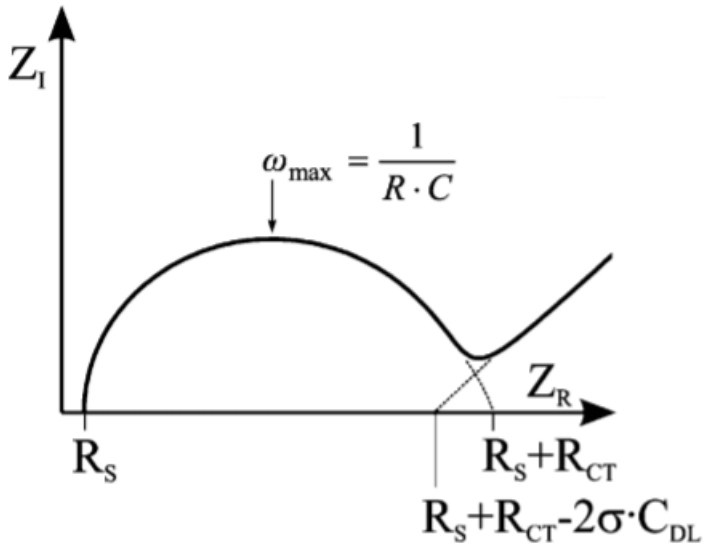
Bir elektrolit çözeltisi ile bir elektrodun temasta olduğu bir sistemde yapılan elektrokimyasal impedans ölçümü Randles eşdeğer devre modeli ile belirlenir (Chang & Park, 2010; Lisdat & Schäfer, 2008) ve Randles eşdeğer devre modeli Şekil 2.11'de gösterilmektedir.



Şekil 2.11. Randles eşdeğer devre modeli. Cd; çift katmanlı kapasitör, CE; karşı elektrot, Rp; polarizasyon direnci, Rs; çözelti direnci, WE; çalışma elektrodu, Zw; Warburg impedansı (Chang & Park, 2010)

Buradaki Warburg impedansı (Zw), elektrolit çözeltisinden arayüze difüzyon yoluyla iletilen akımın impedansıdır (Lisdat & Schäfer, 2008).

İmpedans ölçümünde elde edilen verilerin analizi genellikle Nyquist grafiği (Şekil 2.12) kullanılarak yapılır (Benavente, 2005).

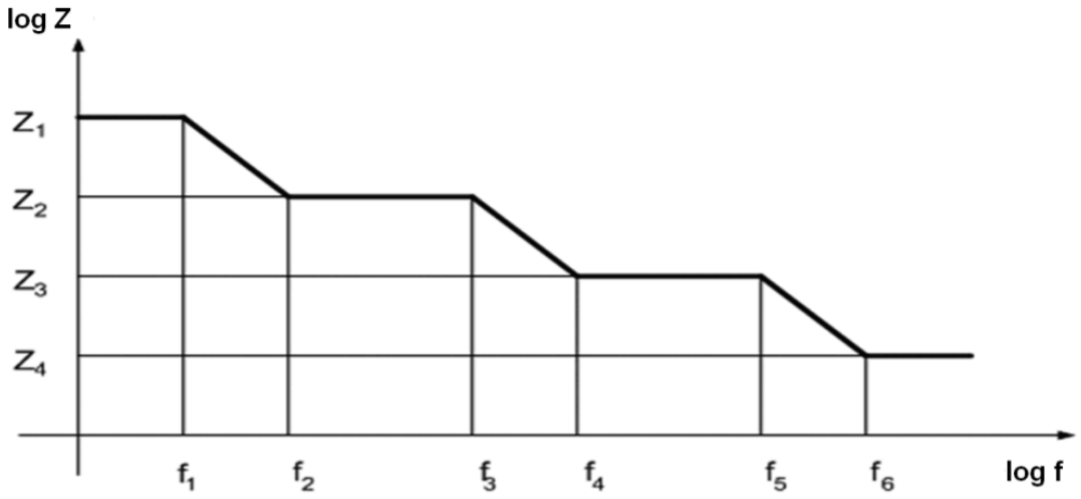


Şekil 2.12. Teorik olarak Nyquist grafiğinin gösterimi (Lisdat & Schäfer, 2008)

Şekil 2.12'deki Nyquist grafiği, dirençten ve kapasitanstan kaynaklanan gerçek (Z_R) ve hayali (Z_I) bileşenlerin bir toplamı olarak düşünülebilir. Grafikte sınırlı bir sürede, yüksek frekansta akım uygulandığında gerçekleşen elektron transferi yarım daire bölgesi ile, daha düşük frekanslarda gerçekleşen elektron transferi Z_R ekseni ile 45^o açı yapan doğrusal çizgi ile gösterilmektedir (Malhotra & Pandey, 2017). Çift katmanlı kapasitans

değeri, grafikteki yarım dairenin maksimum noktasındaki frekanstan, ω=2πf=1/Rct x Cdl eşitliği ile hesaplanabilir (Lisdat & Schäfer, 2008).

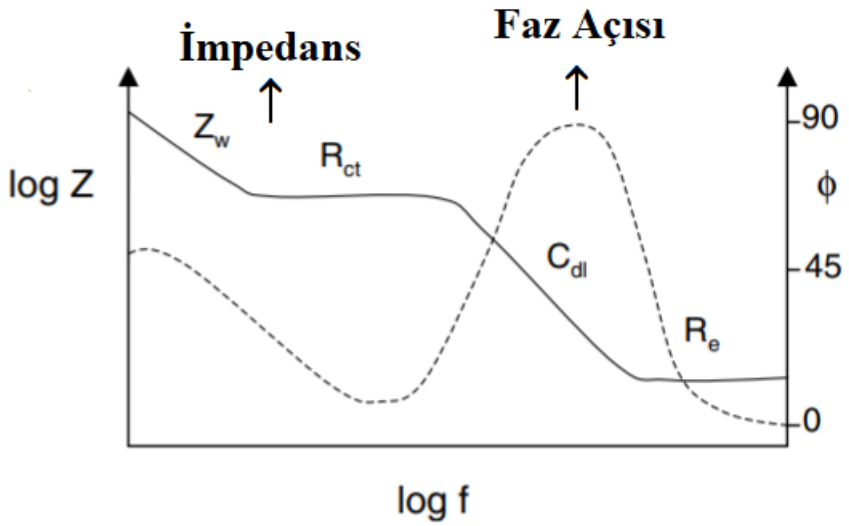
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile elde edilen verileri sunmanın bir başka yolu da Bode grafikleridir. Bode grafikleri farklı frekanslarda elde edilen akımların genliğini ve faz açısını gösterir. İmpedans modülü olan Z değerine karşılık frekansın logaritmik grafiği çizilir (Fernández-Sánchez, McNeil & Rawson, 2005; Stević, Vujasinović & Radunović, 2009).



Şekil 2.13. Teorik olarak Bode Grafiği (Stević, Vujasinović & Radunović, 2009)

Şekil 2.13'teki grafikte yatay çizgiler, sistemin gösterdiği direnç davranışının baskın olduğu frekans bölgelerini göstermektedir (Fernández-Sánchez vd., 2005).

Elektrokimyasal impedans ölçümü ile elde edilen Bode grafiği Şekil 2.14'te verilmiştir.



Şekil 2.14. Elektrokimyasal impedans ölçümü ile elde edilen Bode grafiği (Fernández-Sánchez vd., 2005).

Şekil 2.14'teki Bode grafiği yardımı ile Randles eşdeğer devre modeline ait tüm parametreler hesaplanabilir. Ancak Nyquist grafiklerinden farklı olarak, biyosensör sisteminin inşasındaki aşamaları daha kolay analiz etmeyi sağlayan frekans ve faz açısı değerlerini doğrudan vermesidir (Fernández-Sánchez vd., 2005; Stević, Vujasinović & Radunović, 2009).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde kullanılan ölçüm tekniklerinden biri de sabit frekansta impedans analizidir. Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde farklı frekanslardaki akıma karşı biyosensörün direnci ölçülmektedir. Bundan farklı olarak sabit frekansta impedans analizinde, impedans ölçümü zamana karşı sabit bir frekansta yapılmaktadır. Böylece biyosensörün çalışma elektrodunda antikor-antijen kompleksi oluşumu esnasında meydana gelen direncin zamanla artışı tek bir frekans değerinde gözlenir. Bu teknik sayesinde çalışma elektrodunda gerçekleşen immünoreaksiyon süresinin gerçek zamanlı ölçümü de yapılmış olur. İmpedansın ölçüleceği sabit frekans, Bode grafiğindeki verilerden yararlanılarak bulunmaktadır. Bu amaçla elektrokimyasal impedans ölçümü yapılmış biyosensörün Bode grafiğinde elde edilen faz açısının en yüksek kayma gösterdiği frekans değeri belirlenir ve sabit frekans analizinde bu değer kullanılır (Benavente, 2005; Lasia, 2014; Malhotra & Pandey, 2017; Özcan, Demirbakan, Yeşiller & Sezgintürk, 2014; Singal, Srivastava, Kotnala & Rajesh, 2018).

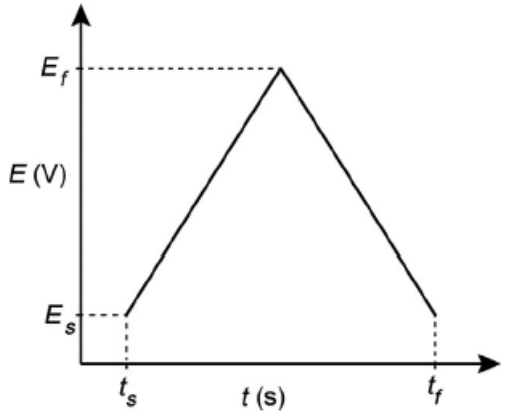
2.2.2.2. Voltametrik Yöntemler

Voltametri terimi, bir elektrokimyasal hücreden akan akımın (amper), hücredeki elektrotlara uygulanan potansiyelin (volt) değişmesiyle ölçüldüğü elektroanalitik bir teknik anlamında kullanılmaktadır. Voltametrik yöntemler, polarografi, amperometri, linear sweep ve döngüsel voltametri, puls teknikleri (diferansiyel puls ve kare dalga), kronopotansiyometri gibi alt sınıflara ayrılmaktadır (Thomas & Henze, 2001).

2.2.2.2.1. Döngüsel Voltametri (CV)

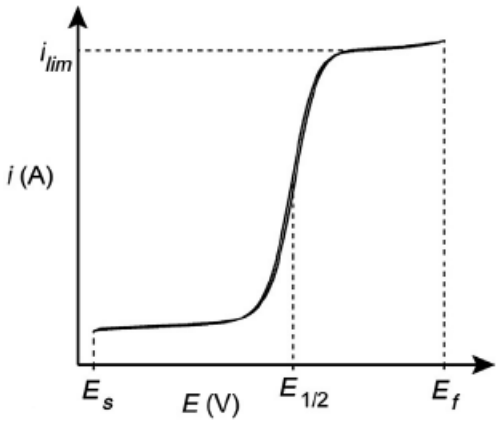
Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde, üçlü elektrot sistemi kullanılarak yapılan döngüsel voltametri (CV) ölçümlerinde çalışma elektrodunda, belirli potansiyel aralığında ve belirli bir tarama hızında ortaya çıkan akım zamana karşı kaydedilir. CV, bilinen bir redoks potansiyeline sahip elektroaktif türlerin elektrokimyasal reaksiyonları hakkında bilgi edinmek için kullanılır. Böylece çalışma elektrodunda meydana gelen süreçler karakterize edilebilir, elektrottaki elektrokimyasal reaksiyonun tersine çevrilebilirliğini (reversibility) değerlendirilebilir. Bu yöntem sayesinde çalışma elektrodundaki konsantrasyon, difüzyon katsayısı, oksitlenen veya indirgenen analit molekülü başına elektron sayısı ve analitin redoks potansiyeli hakkında bilgi edinilebilir (Malhotra & Pandey, 2017).

Döngüsel voltametride ölçüm hücresindeki çözelti, elektrotlara iyon sağlamak amacıyla kullanılır. Karşıt elektrot, çalışma elektroduna sinyal kaynağından elektrik iletir. Sabit bir referans elektrot potansiyeline karşı çalışma elektrodunda potansiyel bir tarama sırasında oluşan akım takip edilir. Özetle CV ölçümlerinde çalışma elektroduna uygulanan iki potansiyel arasında (Es ve Ef) tarama yapılır, potansiyeldeki bu değişim Şekil 2.15'te gösterilmektedir (Islam & Channon, 2020; Malhotra & Pandey, 2017).



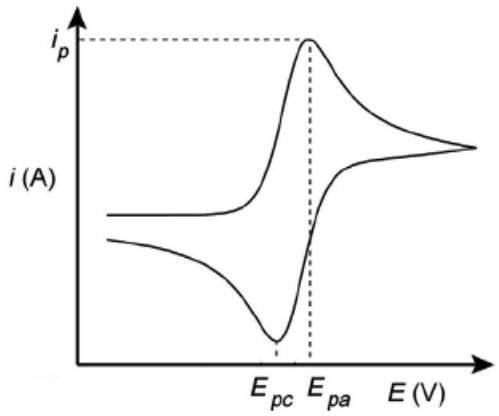
Şekil 2.15. Uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (Islam & Channon, 2020)

Uygulanan potansiyel daha pozitif hale geldikçe, hedef analitin çalışma elektrodu tarafından oksitlenmesine neden olarak akımda bir artışa yol açmaktadır. Bir mikro elektrot ile çalışıldığında, yüksek oksitleyici potansiyellerde, akım, kütle aktarımının hızlı olduğu ve akımın elektrot yüzeyinin analiti ne kadar hızlı çevirebileceğiyle sınırlı olduğu sabit bir duruma ulaşır (Şekil 2.16) (Islam & Channon, 2020).



Şekil 2.16. Mikro elektrotta döngüsel voltamogram. $İ_{lim}$ sınırlayıcı akımdır (Islam & Channon, 2020)

Bir makroelektrot kullanıldığında ise kütle aktarımı daha yavaştır (1 boyutlu) ve sınırlayıcıdır. Bu yüzden akım, analitin elektrot yüzeyine ne kadar hızlı taşındığı ile sınırlı olduğu bir kararlı durum değerine dönüşmeden önce akım maksimuma ulaşır (Şekil 2.17) (Islam & Channon, 2020).



Şekil 2.17. Makro elektrotta döngüsel voltamogram (Islam & Channon, 2020)

Şekil 2.17'de görülen grafikte E_{pa} ve E_{pc} ifadeleri sırasıyla anodik ve katodik tepe potansiyelleridir. $İ_p$ ise tepe akımıdır (Islam & Channon, 2020).

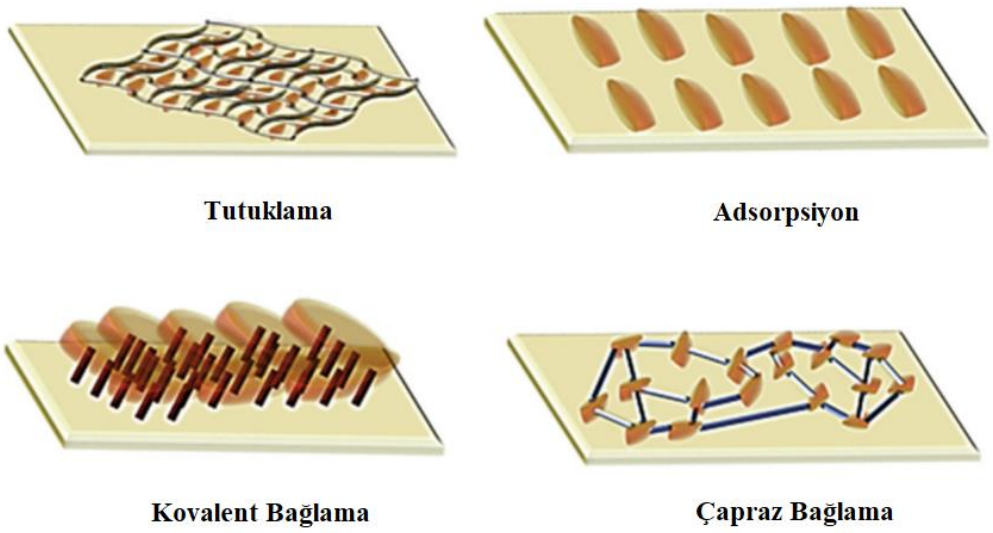
Eğer dalga formu ilk taramadan sonra durdurulursa, bu yönteme lineer tarama voltametrisi (Linear Sweep Voltammetry) denir (Islam & Channon, 2020).

2.2.3. Biyosensör Geliştirilmesinde İmmobilizasyon ve Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar

2.2.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Kelime anlamı hareketsizleştirme olan immobilizasyon, herhangi bir molekülü, enzimi, mikroorganizmaları, hücreyi veya partikülü, fiziksel veya kimyasal yöntemlerle antijenik, katalitik veya diğer özelliklerinin korunarak tekrar veya sürekli kullanım amacı ile herhangi bir organik ya da inorganik yüzeyde tutunmasıdır (Cammack, 2007; Kurnaz Yetim, Hasanoğlu Özkan & Sarı, 2019). Biyosensör geliştirilirken bir biyosensörün iyi bir ölçüm performansı sergilemesi için kullanılan biyoreseptörün transdüsere immobilizasyonunun da iyi olması yani uygun şekilde bağlanması gerekir (Malhotra & Pandey, 2017).

Bu amaçla, bilinen dört yöntemden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler; adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve tutuklamadır (Malhotra & Pandey, 2017).



Şekil 2.18. Biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılan immobilizasyon yöntemleri (Sandhyarani, 2019)

Adsorpsiyon yöntemi, biyoreseptör immobilizasyonu için en basit yöntemdir. Ve bu yöntemin en büyük avantajı, genellikle hiçbir reaktif gerekmemesi ve yalnızca minimum aktivasyon veya "temizleme" adımlarının olmasıdır. Adsorpsiyon işlemi fiziksel ve kimyasal olarak iki sınıfa ayrılabilir. Fiziksel adsorpsiyon zayıftır ve esas olarak van der Waals kuvvetleri yoluyla gerçekleşmektedir. Kimyasal adsorpsiyon daha güçlüdür ve hidrojen bağları, çoklu tuz bağları ve uygun olan yerlerde elektron geçiş komplekslerinin oluşumundan kaynaklanır. Ancak bağlama kuvvetleri, pH, sıcaklık, iyonik kuvvet ve hatta enzim substratının varlığındaki değişime daha duyarlıdır ve elektrodun ömrü kısadır.

Kovalent bağlama, biyoreseptördeki fonksiyonel bir grup ile destekleyici matrisler arasındaki bağlanmayı içerir. Bu bağlanma amino, karboksilik asit, hidroksil, fenolik, imidazol ve tiyol grupları gibi fonksiyonel gruplarla gerçekleşmektedir. Kovalent immobilizasyon yönteminde düşük sıcaklık, düşük iyonik kuvvet ve pH gibi yumuşak koşullar gerekebilmektedir.

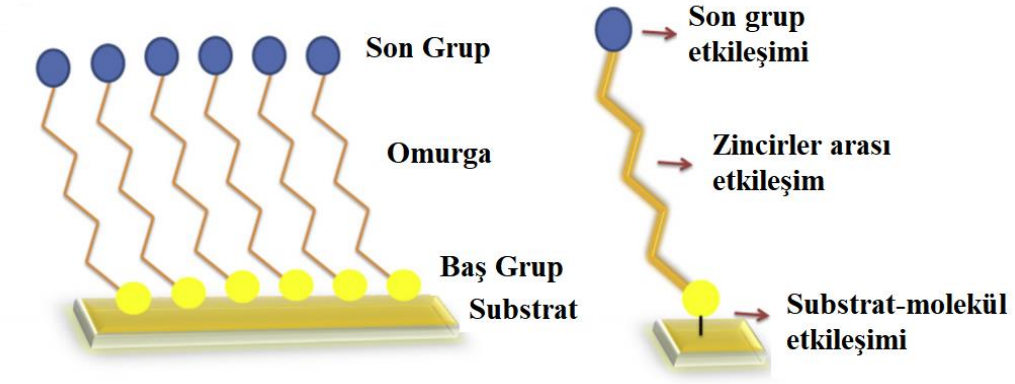
Çapraz bağlama, iki veya daha fazla molekülün kovalent bağlarla bağlanmasıdır. Bu yöntemde genellikle biyoreseptör, tutunmayı önemli ölçüde artırmak için katı desteklere veya çapraz bağlama maddesi gibi başka bir destekleyici malzemeye

kimyasal olarak bağlanır. Çapraz bağlama işleminde, biyolojik materyalleri bağlamak için glutaraldehit gibi bifonksiyonel ajanlar kullanılır. Ayrıca bifonksiyonel ajanlar, fiziksel olarak adsorbe edilmiş enzimlerin çapraz bağlanma yoluyla stabilize edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tutuklama yönteminde; tutuklanacak biyolojik malzemeleri içerecek şekilde polimerik malzemelerin çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan çözelti çalışma elektrodu üzerine çeşitli yöntemlerle kaplanır. Böylece biyolojik molekül üç boyutlu jeller içinde tutuklanmış olur. Yaygın olarak kullanılan jeller arasında nişasta jelleri, naylon ve polianilin (PANI) veya nafyon gibi iletken polimerler bulunur. Bu yöntemin dezavantajı gözenekler sebebiyle biyoaktivite kaybının olma ihtimalidir (Malhotra & Pandey, 2017; Turner vd., 1987).

2.2.3.2. Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (Self-assembled monolayers-SAMs)

Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAMs), bir molekülün baş grubunun güçlü kemisorpsiyonu ile katı yüzeyde oluşturulan moleküllerin sıralı topluluklarıdır. Böylece çalışılacak yüzey üzerinde istenen özelliklere sahip, kontrollü kalınlıkta, ultra ince organik filmler yapmak mümkün olabilmektedir. SAMs oluşumunun kolay bir prosedür ile gerçekleştirilebilmesi ve iyi stabilite gibi özellikleri, onları biyosensör gelişimi için çekici bir hale getirmektedir (Sandhyarani, 2019).



Şekli 2.19. SAMs oluşum prensibi (Sandhyarani, 2019)

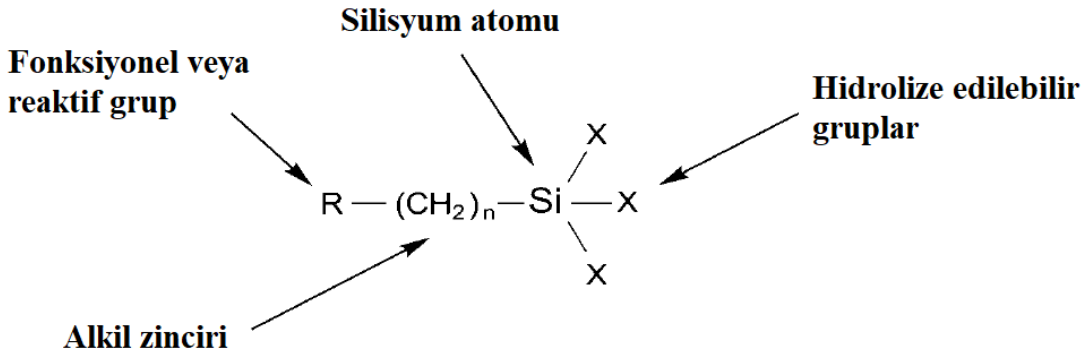
Oksit yüzeylerde karboksilat SAM'leri, cam/silikon yüzeylerde silan SAM'leri ve soy metaller (altın, gümüş, platin veya bakır) üzerinde alkan tiyol SAM'leri içeren,

rapor edilmiş ve kapsamlı bir şekilde çalışılmış farklı SAM türleri vardır (Sandhyarani, 2019).

Bu tez kapsamında bir hidroksil grubu ile önceden oksitlenmiş yüzeyde, kovalent olarak bağlı bir organosilan tabakası ile SAMs oluşturulmuştur.

Silan bileşikleri monomerik silikon bazlı moleküllerdir. En az bir bağlı karbon atomu içeren silanlar organosilan olarak isimlendirilmektedir.

Silisyum, periyodik tabloda karbon ile aynı grupta olduğu için, dört kovalent bağ oluşumuna izin verir. Ayrıca silan, karbondan daha az elektronegatiftir ve silanlı bileşikler tipik organik bileşiklere kıyasla benzersiz reaksiyonlara girer (Hermanson, 2008; Higson, 2012).



Şekil 2.20. Bir organosilan molekülünün genel yapısı (Hermanson, 2008)

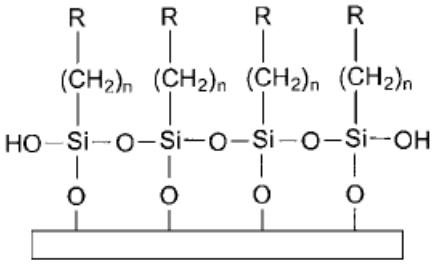
Organosilanların bazı türevleri oldukça reaktiftir ve başka moleküller ya da herhangi bir yüzeyle kovalent bağlar oluşturabilir.

Doğrudan silan atomuna bağlı çeşitli tipte reaktif gruplar olabilir. Bu gruplar sadece -H atomu, -Cl atomu ve -OH grubu veya metil/etil eter (-metoksi/-etoksi) gibi gruplar da olabilir. Silanlı bileşiklerdeki bu gruplar tipik olarak organik moleküllere karşı reaktif değildir, ancak belirli inorganik substratlara kovalent olarak bağlanabilir. Bu özellikleri sayesinde belirli yüzeylerde immobilize edilebilirler (Hermanson, 2008; Higson, 2012). Böylece hidroksil grupları ile önceden oksitlenmiş bir yüzeyde, kovalent

olarak bağlı bir organosilan tabakası ile SAMs oluşturulabilir. Diğer tek tabakalı kimyalarda olduğu gibi burada da, uzak uçtaki reaktif gruplar, biyomoleküller için bağlanma noktaları sağlar (Gooding & Zhu, 2014; Sandhyarani, 2019).

Şekil 2.20'de görüldüğü gibi organosilan molekülleri, diğer organik bileşiklere bağlanmasına izin veren fonksiyonel bir grupla sonlanmaktadır. Bu sayede SAMs olarak kullanıldığında başka moleküllerin immobilizasyonuna imkân sağlar.

Doğrudan silan atomuna bağlı alkoksi grupları bulunan organosilanlar, çözelti içinde, kendiliğinden konjuge olarak, silanol türevlerinin kararsızlığı nedeniyle yüzeylerin modifiye edilmesi için kullanılır. Metoksisilanlar, substrat -OH gruplarına en reaktif olanlardır, ancak oda sıcaklığında çok yavaş reaksiyona girerler. Metoksisilanlar su olmadan organik bir çözücü (THF, toluen, etanol veya hidrokarbon çözücüler) içinde reaksiyona sokulabilir. Böylece her organosilanın bir siloksan bağı (-O-Si-O-) yoluyla doğrudan substrata bağlandığı bir tek tabaka ortaya çıkar. Moleküldeki fonksiyonel gruplar, biyomoleküller veya diğer moleküller ile bağlanma için bu tek tabakadan dışarı doğru çıkar (Hermanson, 2008; Higson, 2012).

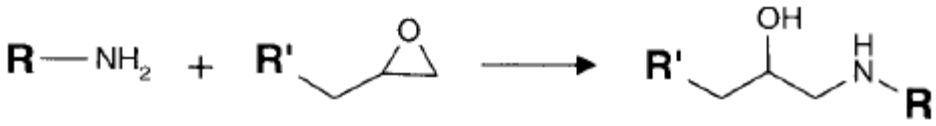


Şekil 2.21. Bir yüzey üzerinde immobilize edilmiş bifonksiyonel organosilan molekülü (Hermanson, 2008)

Hidroksil-reaktif kimyasal bileşikler, yalnızca bir -OH grubu ile doğrudan stabil bir bağlantı oluşturabilen modifikasyon ajanlarını değil, aynı zamanda grubu ikincil bir fonksiyonel grupla birleştirmek üzere geçici olarak aktive etmek üzere tasarlanmış geniş bir reaktif yelpazesini de içerir (Hermanson, 2008).

Bu tez kapsamında epoksi halkası içeren reaktif gruba sahip bir organosilan olan 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan (GPDMMS) ile SAMs oluşumu sağlanmıştır.

Bir epoksit veya oksiran grubu, bir halka açma işleminde nükleofillerle reaksiyona girer (Şekil 2.22). Reaksiyon, sırasıyla ikincil amin, tiyoeter veya eter bağları oluşturmak için birincil aminler, sülfhidriller veya hidroksil grupları ile gerçekleşebilir. Birleştirme işlemi sırasında halka açılması, epoksi bileşiği üzerinde bir hidroksi grubu oluşturur (Hermanson, 2008).



Şekil 2.22. Epoksi halkası ve amin grubu içeren iki bileşik arasındaki halka açılımı reaksiyonu (Hermanson, 2008)

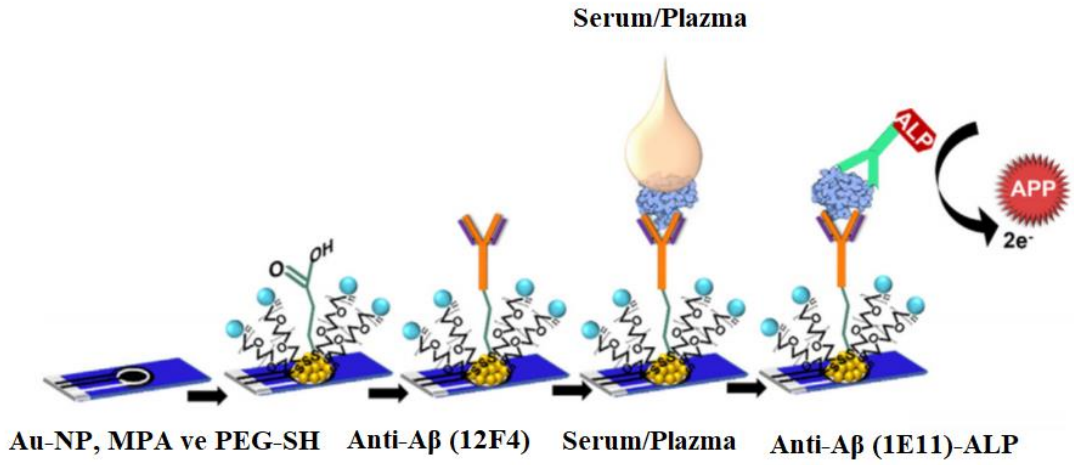
2.3. Literatürde $A\beta_{42}$ Analizi İçin Geliştirilmiş Biyosensörler

Literatürde $A\beta_{42}$ analizi için geliştirilmiş pek çok farklı biyosensör mevcuttur. Örneğin 2014 yılında Rama, González-García ve Costa-García tarafından yapılan çalışmada $A\beta_{42}$ analizi için, tek kullanımlık screen-printed karbon elektrotlar ile elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada screen-printed karbon elektrotlar üzerinde altın nano-parçacıklar biriktirilmiş, ardından elektrotlar streptavidin ile modifiye edilmiştir. Biotin ile işaretlenmiş $A\beta_{42}$ immobilizasyonu da gerçekleştirildikten sonra screen-printed elektrotlar $A\beta_{42}$ ve anti-$A\beta_{42}$ karışımı ile muamele edilmiştir. Anti-$A\beta_{42}$'nin sınırlı bağlanma bölgeleri için $A\beta_{42}$ ve daha önce immobilize edilmiş biotin ile işaretli $A\beta_{42}$ arasındaki yarışmalı bağlanmaya dayalı bir biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensör yanıtları döngüsel voltametri (CV) kullanılarak alınmıştır. Yapılan bu çalışma doğrusal tayin aralığı 0.5-500 ng/ml olarak belirlenmiştir (Rama, González-García & Costa-García, 2014).

Dai, Molazemhosseini ve Liu tarafından 2017 yılında yapılan bir başka biyosensör çalışmasında ise; fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) ve seyreltilmiş insan serumunda, diferansiyel puls voltametrisi (DPV) kullanılarak $A\beta_{42}$ analizi yapılmıştır. Bu biyosensörde çalışma elektrodu olarak polietilen teraftalat (PET) tabaka üzerinde 50 nm kalınlığında ince altın film oluşturulmuştur. 3-Merkaptopropiyonik asit (MPA) ile SAMs

oluşumu gerçekleştrildikten sonra anti-$A\beta_{42}$'nin bağlanması için MPA'nın karboksil uçlarını aktifleştirmek amacıyla elektrot EDC/NHS (1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimit/ N-Hidroksisüksinimit) ile muamele edilmiştir. Anti-$A\beta_{42}$-$A\beta_{42}$ kompleksinin oluşumuna dayalı ölçüm yapılan bu biyosensörde $A\beta_{42}$'nin doğrusal tayin aralığı 0.0675- 0.5 µg/ml'dir (Dai, Molazemhosseini & Liu, 2017).

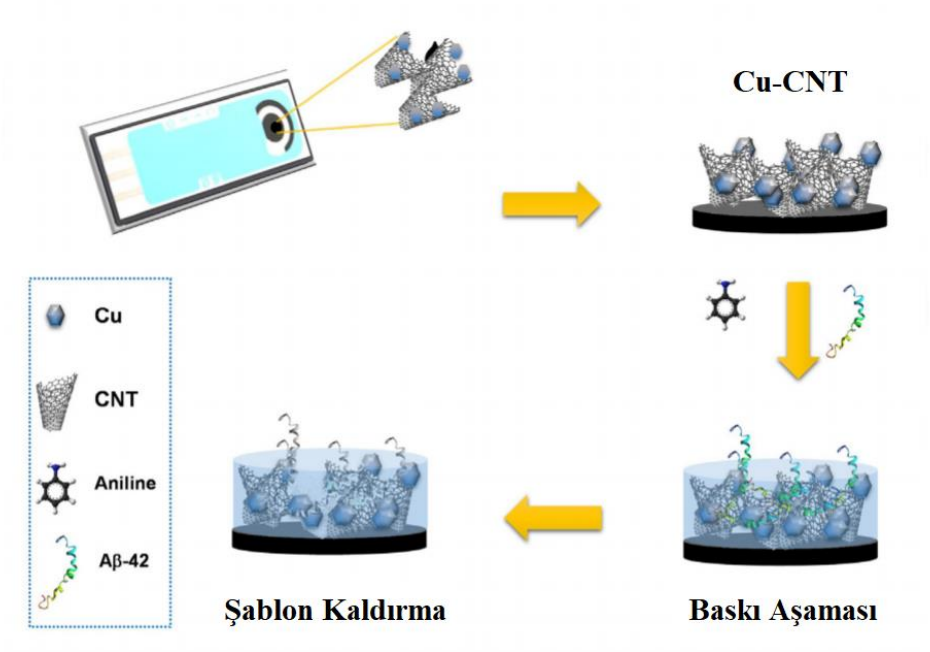
2017 yılında yapılan bir diğer çalışmada Diba, Kim ve Lee tarafından screen-printed karbon elektrotlar kullanılarak hem kan serumu hem de kan plazmasında ölçüm yapabilen sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada ilk olarak screen-printed elektrotlar üzerinde elektrokimyasal biriktirme yöntemi ile altın nanopartiküller biriktilmiş ardından tiyol ile modifiye edilmiş polietilen glikol (PEG-SH) ve merkaptopropiyonik asit (MPA) ile SAMs oluşturulmuştur. Ardından anti-Aβ ve $A\beta_{42}$ bağlanması gerçekleştirilmiş, son olarak anti-Aβ-ALP (alkalin fosfataz) konjugatı ile sandviç oluşturulmuştur (Şekil 2.23). Biyosensör yanıtları döngüsel voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile alınmıştır. Geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığı 100 fM -5 pM'dır (Diba, Kim & Lee, 2017).



Şekil 2.23. Sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör (Diba vd., 2017)

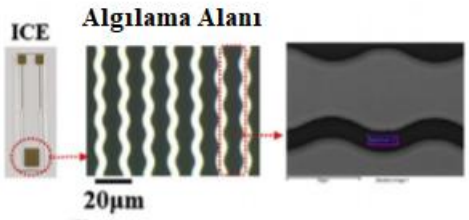
Literatürde yer alan $A\beta_{42}$ analizine yönelik diğer çalışma 2018 yılında Moreira, Rodriguez, Dutra ve Sales tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada screen-printed karbon elektrot karbon nanotüp (CNT) ile modifiye edilmiş bakır nanopartiküller ile kaplanmıştır. Ardından nötr pH'ta, $A\beta_{42}$ varlığında anilin (ANI) elektropolimerizasyonu

ile elektrot yüzeyinde plastik antikor elde edilmiştir. Asit ile muamele edilerek $A\beta_{42}$ molekülleri uzaklaştırılmış ve elde edilen boş alanlara yeniden $A\beta_{42}$ peptidi bağlanmıştır (Şekil 2.24). Biyosensör ölçümleri kare dalga voltametrisi (SWV) ile yapılmıştır. 1-66 ng/ml konsantrasyon aralığında $A\beta_{42}$ eklenmiş serum numunelerinde analiz yapılmıştır (Moreira, Rodriguez, Dutra & Sales, 2018).



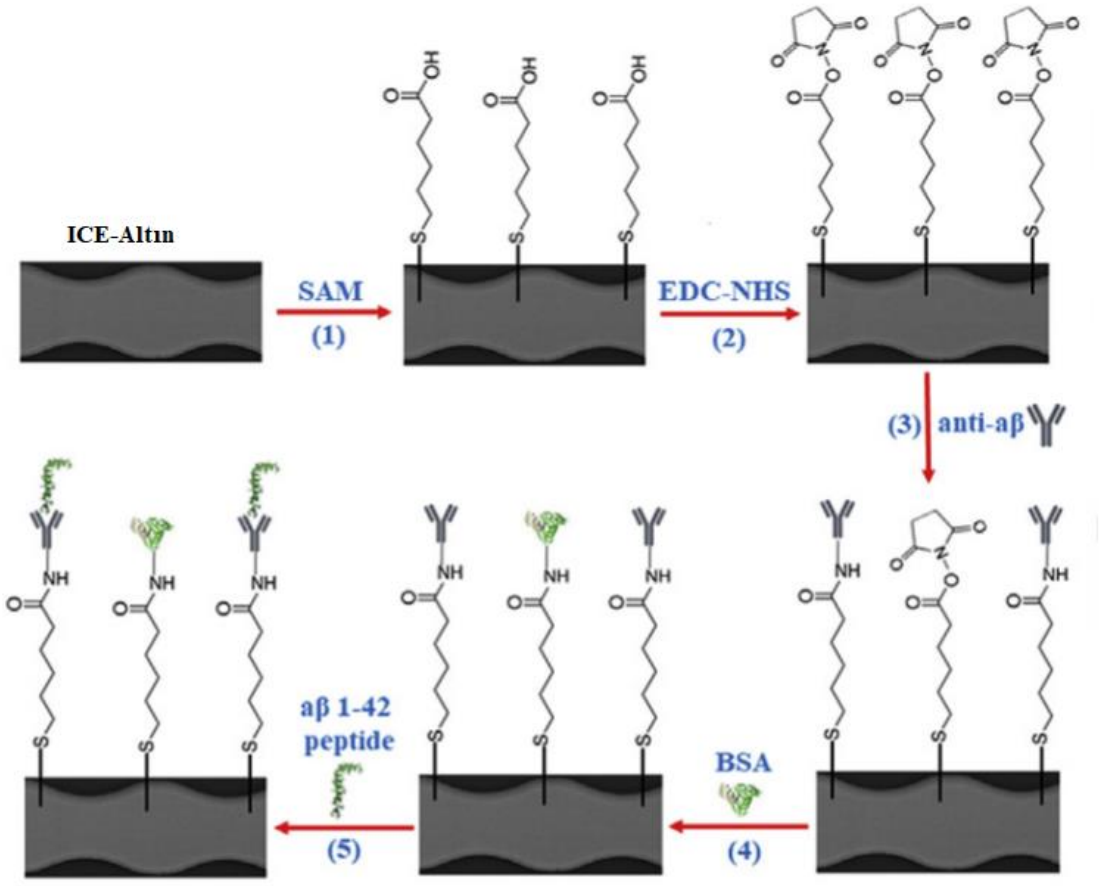
Şekil 2.24. Moreira ve arkadaşları tarafından geliştirilen biyosensörün şematik gösterimi (Moreira vd., 2018)

2019 yılında Ngoc Le, Park, Chinnadayyala ve Cho tarafından $A\beta_{42}$ analizine yönelik elektrokimyasal impedans spektroskopisi kullanılarak bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada cam slayt üzerinde birbirine bağlı zincir şeklinde elektrot (ICE) üretilmiştir (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. ICE elektrot yüzeyi (Ngoc Le, Park, Chinnadayyala & Cho, 2019)

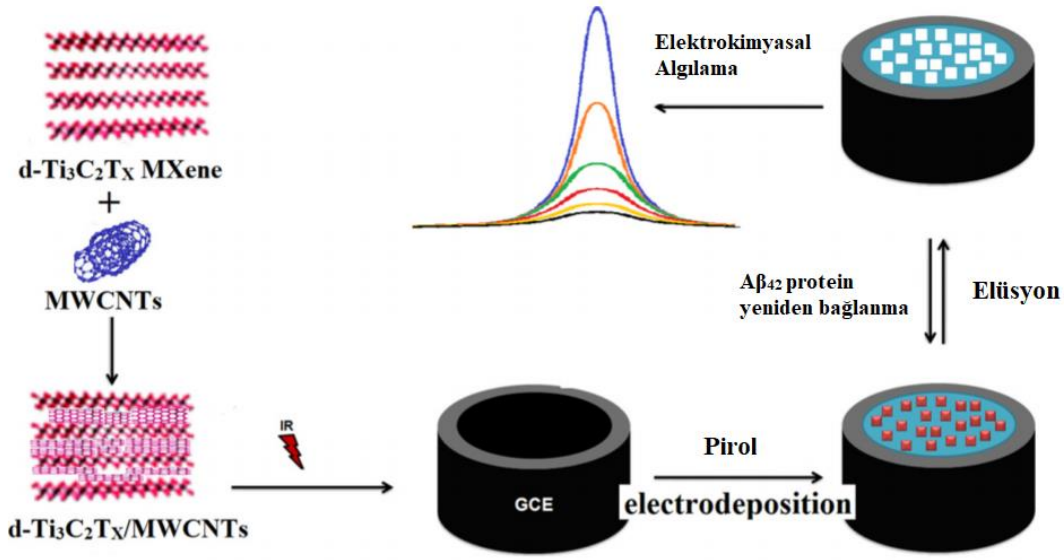
Şekil 2.25'teki elektrot yüzeyinde 6-merkaptohekzanoik asit (MHA) ile SAMs oluşturulduktan sonra karboksil uçları EDC/NHS (1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimit/ N-Hidroksisüksinimit) ile aktive edilmiş ve anti-Aβ immobilizasyonu yapılarak biyosensör tasarımı tamamlanmıştır (Şekil 2.26). Geliştirilen biyosensörün tayin aralığı 10^{-3}-10^{4} ng/ml'dir (Ngoc Le vd., 2019).



Şekil 2.26. Ngoc Le ve arkadaşları tarafından tasarlanan biyosensörün şematik gösterimi (Ngoc Le vd., 2019)

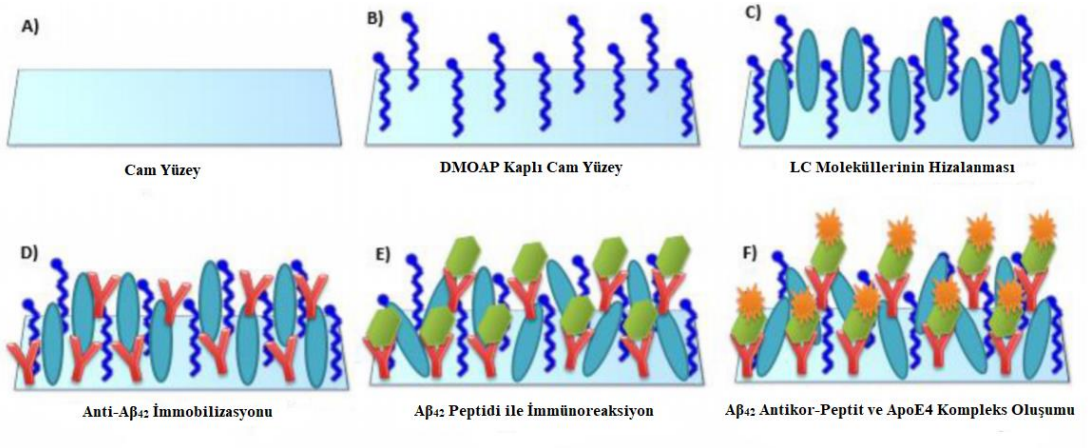
$A\beta_{42}$ analizine yönelik bir diğer biyosensör çalışması 2020 yılında Özcan, Medetalibeyoglu, Akyıldırım, Atar ve Yola tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde delamin titanyum karbür MXene (d-Ti_3C_2TX MXene) ve moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) içeren çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs) kompoziti kullanılarak elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiştir. $A\beta_{42}$ molekülü içeren pirolün (monomer), hazırlanan elektrot yüzeyinde döngüsel voltametri ile elektropolimerizasyonu yapılmıştır (Şekil 2.27). Bu çalışmada tasarlanan biyosensör

ölçümleri döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile yapılmıştır. Biyosensörün doğrusal tayin aralığı 1-100 fg/ml olarak belirlenmiştir (Özcan, Medetalibeyoglu, Akyıldırım, Atar & Yola, 2020).



Şekil 2.27. Özcan ve arkadaşları tarafından geliştirilen biyosensör sisteminin şematik gösterimi (Özcan vd., 2020)

2021 yılında Kemikoğlu, Tunçgövde ve Özsarlak-Sözer tarafından sıvı kristallere (liquid crystal-LC) dayalı $A\beta_{42}$ biyosensörü geliştirilmiştir (Şekil 2.28). Mikroskop camı Dimetiloktadesil [3-(trimetoksisilil)propil] amomyum klorür (DMOAP) ile kaplanmıştır. Ardından LC moleküllerinin cam üzerinde homeotropik hizalanması ile ince bir LC filmi oluşturulmuştur. Anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonundan sonra $A\beta_{42}$ molekülleri ile gerçekleşen immünoreaksiyon sonucu LC film yapısında meydana gelen değişiklikler polarize optik mikroskop ile belirlenmiştir. Sonrasında ise ApoE4, $A\beta_{42}$'nin antikor-antijen kompleksinde $A\beta_{42}$ peptidine spesifik olarak bağlanmıştır. Oluşan immünokomplekslerin yansıma spektrumları, dik açıda (90º) bir Ocean Optics spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir ve $A\beta_{42}$ için doğrusal tayin aralığı 1-1000 pg/ml'dir (Kemiklioğlu, Tunçgövde & Özsarlak-Sözer, 2021).

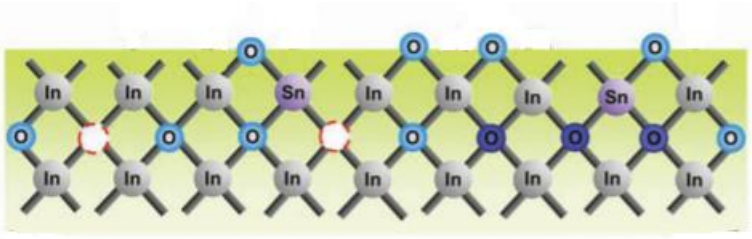


Şekil 2.28. LC bazlı $A\beta_{42}$ biyosensörü (Kemiklioğlu vd., 2021)

2.4. Tez Kapsamında Geliştirilen $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Kimyası ve Ölçüm Prensibi

2.4.1. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Kimyası

Tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensöründe çalışma elektrodu olarak kullanılan indiyum kalay oksit polietilen teraftalat (ITO-PET) tabakalar, polietilen teraftalat (PET) üzerine kaplanmış metal oksit yüzeye sahip bir filmdir (Şekil 2.29) (Çakır, Çalışkan, Bütün & Özbay 2016; Forget, Tucker, Brett, Limoges & Balland, 2015). Modifiye edilebilir, maliyeti düşük ve tek kullanımlık olmaları gibi özellikleri sebebiyle biyosensör üretiminde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Demirbakan & Sezgintürk, 2019; Özcan & Sezgintürk, 2017; Özcan & Sezgintürk, 2019).

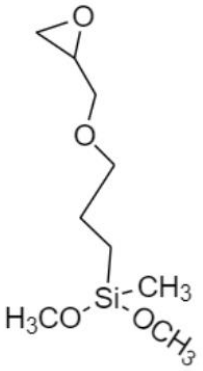


Şekil 2.29. ITO tabaka gösterimi (Wang vd., 2011)

$A\beta_{42}$ biyosensöründe SAMs oluşumunu sağlamak için öncelikle ITO-PET elektrot yüzeyinde aktif hidroksil grupları (-OH) biriktirilmiştir. Elektrot yüzeyinde var olan kafes metal iyonları güçlü Lewis asitleri olduğu için metal iyon bölgelerinde hidroksilasyon gerçekleştirilebilmektedir (Tamura, Mita, Tanaka & Ito, 2001).Bu amaçla NH_4OH, H_2O_2

ve ultra saf su (1:1:5) (v/v/v) karışımı kullanılarak elektrot yüzeyinde aktif -OH grupları biriktirilmiştir.

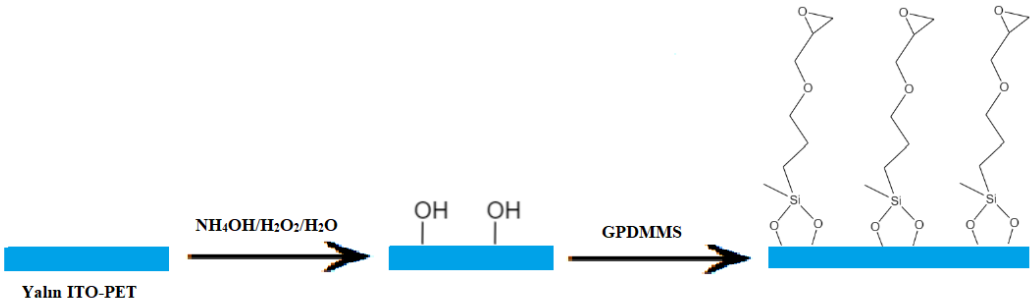
Metal oksit yüzeylerde bulunan hidroksil grupları, organosilan moleküllerindeki alkoksi gruplarına saldırarak kovalent Si-O (siloksan) bağı oluşturmaktadır. Bu bağ kimyasal olarak kararlıdır (Boccafoschi vd., 2018; Brehm vd., 2020; Fadeev vd., 2002; Godoy-Gallardo vd., 2015). $A\beta_{42}$ biyosensöründe SAMs oluşturmak için bir ucunda iki metoksi grubu diğer ucunda epoksi halkası bulunan bir organosilan molekülü olan 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan (GPDMMS) kullanılmıştır (Şekil 2.30).



Şekil 2.30. 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan molekülü

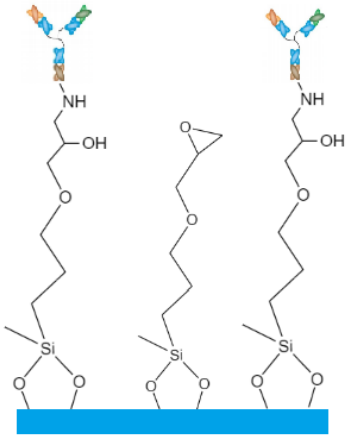
GPDMMS molekülünün SAMs oluşumunda kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan biri 2018 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan ITO yüzey üzerinde GPDMMS ile SAMs oluşturulduktan sonra kitosandan elde edilen karbon dots (CDs) ile gerçekleştirilen fotoelektrokimyasal reaksiyondur (Zhang vd., 2018). Santos ve arkadaşları tarafından *Escherichia coli* (*E. coli*) analizi için geliştirilen ITO bazlı immünosensör de GPDMMS kullanılan bir diğer çalışmadır (Barreiros dos Santos vd., 2015). Lin, Harris, Chan ve Jemere tarafından da 2018 yılında patojenlerle ilişkili moleküllerin tespiti için ITO kaplı cam substrat üzerinde GPDMMS ile SAMs oluşumu gerçekleştirilen bir biyosensör geliştirilmiştir (Lin, Harris, Chan & Jemere, 2018).

Tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensöründe, elektrot yüzeyinde biriktirilen aktif -OH grupları ile GPDMMS molekülüne ait metoksi grupları arasında kurulan siloksan bağı ile SAMs oluşumu sağlanmıştır (Şekil 2.31).



Şekil 2.31. $A\beta_{42}$ biyosensöründe aktif -OH grupları birikimi ve SAMs oluşumu

SAMs oluşumunda kullanılan bifonksiyonel GPDMMS molekülünün epoksi ucu nükleofilik saldırıya ve halka açılımına yatkındır (Connell vd., 2017; Hermanson, 2008). Böylece $A\beta_{42}$ proteinine özgü antikorun (Anti-$A\beta_{42}$) amin grupları ile GPDMMS'nin epoksi halkası arasında oluşan kovalent bağlar sayesinde Anti-$A\beta_{42}$ molekülü, SAMs oluşturulmuş ITO elektrot yüzeyinde immobilize edilmiştir (Şekil 2.32).



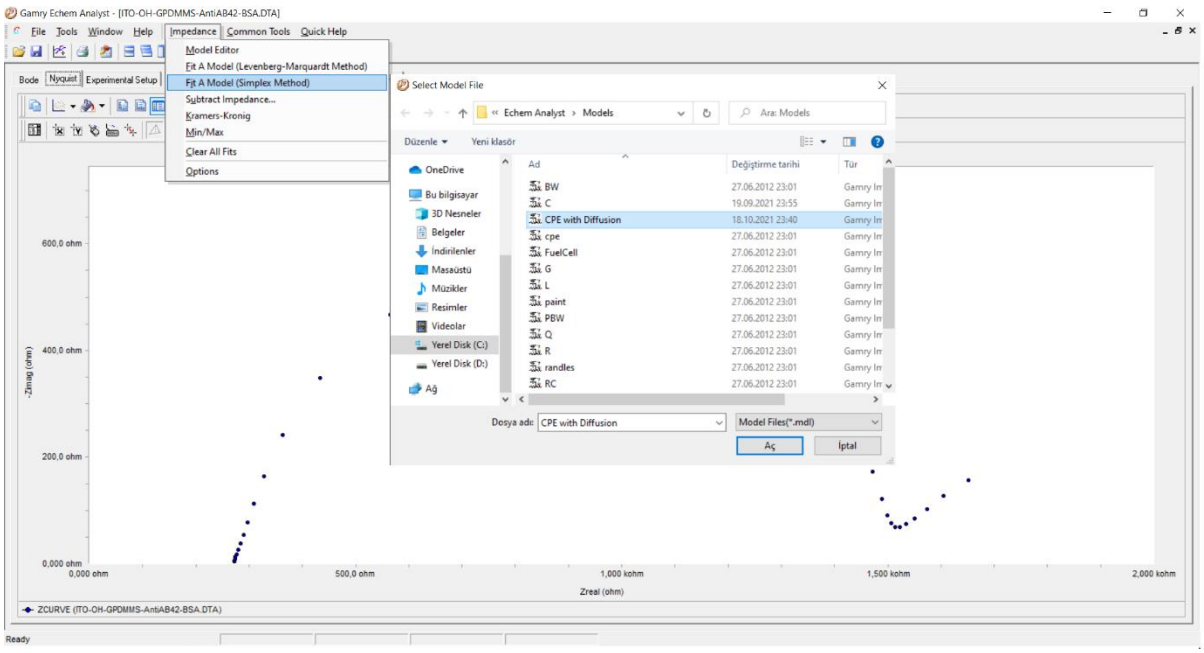
Şekil 2.32. $A\beta_{42}$ proteinine özgü Anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonu

2.4.2. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Ölçüm Prensibi

Tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensöründe her bir immobilizasyon basamağının kontrolünde, $A\beta_{42}$ tayininde ve biyosensörün analitik karakteristik özelliklerinin değerlendirilmesinde elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanıldı. EIS ölçümlerinde FRA modüllü potanstiyostat/galvanostat cihazı kullanıldı ve ölçümlerden elde edilen veriler EChem Analyst yazılım programı ile kaydedildi.

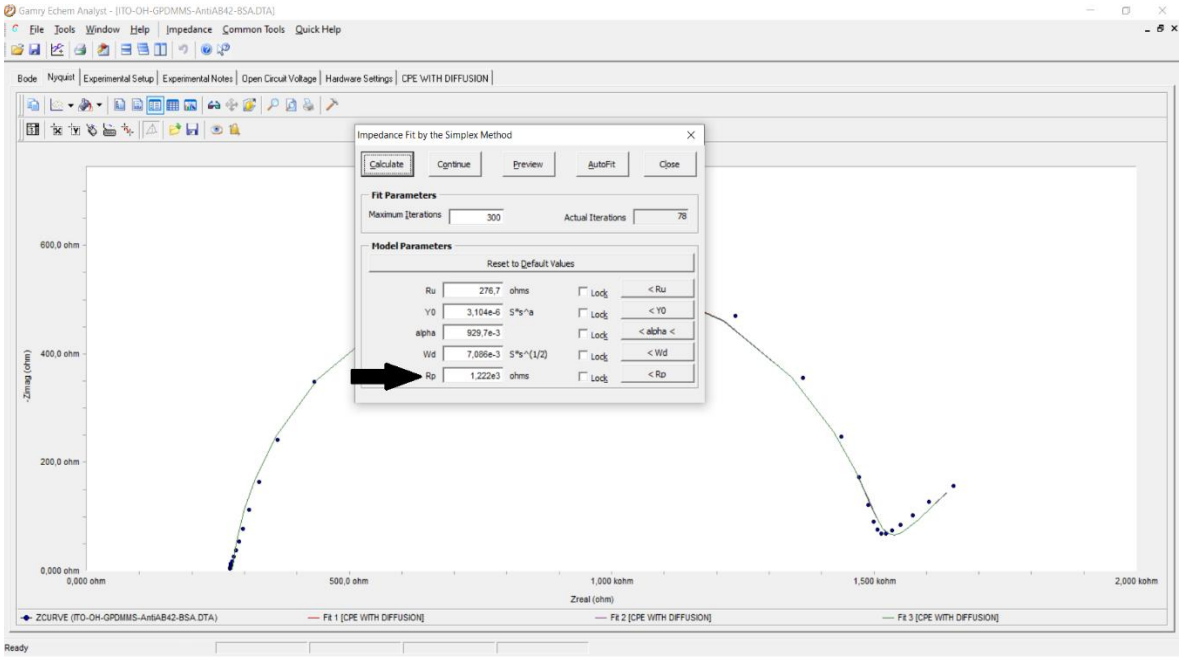
EIS ölçümlerinde elde edilen Nyquist eğerilerinin anlamlı bir sayısal değere dönüştürülmesi için Randles eşdeğer devre modeli (Şekil 2.11) kullanıldı.

Biyosensörün impedansı, EChem Analyst yazılım programı yardımı ile Nyquist eğerilerinin yarım daire çapına karşılık gelen "Yük transfer direnci (Rct)" ile belirlendi. Bu amaçla EChem Analyst programında, hesaplanacak olan Nyquist grafiği açıldı ve üst menüde Impedance sekmesinden 'Fit A Model (Simplex Method)' kısmı seçildi. Ardından açılan pencereden 'CPE with Diffusion' kısmı seçildi (Şekil 2.33).



Şekil 2.33. Nyquist grafiğinde Rct değerinin hesaplanması

CPE with Diffusion, Nyquist grafiğine ait Rct değerinin hesaplanacağı yeni bir pencere açar. Bu pencerede "Reset to Default Values" kısmı ile hesaplama tablosundaki değerler sıfırlandı. Ardından "Calculate" kısmı ile seçilen Nyquist grafiğine ait, yük transfer direncinin (Rct) de dahil olduğu, çeşitli değerler hesaplandı (Şekil 2.34).



Şekil 2.34. Rct değeri hesaplama tablosu

Şekil 2.34'te verilen hesaplama tablosundaki Rp değeri, çalışma elektroduna ait belirli bir potansiyeldeki aktivasyon bariyeridir. Bu değer standart (formal) elektrot potansiyelinde yük (elektron) transfer direnci (Rct) haline gelmektedir (Chang & Park, 2010; Malhotra & Pandey, 2017).

$A\beta_{42}$ biyosensörünün tasarım aşamasındaki immobilizasyon basamaklarında elektrot yüzeyinde meydana gelen değişimler, her basamağa ait Nyquist eğerisindeki Rct değeri hesaplanarak takip edildi.

Biyosensör tasarımı tamamlandıktan sonra $A\beta_{42}$'nin 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında değişen derişimlerindeki biyosensör yanıtları da aynı şekilde, her konsantrasyona ait Nyquist eğerisindeki Rct değerleri hesaplanarak takip edildi.

$A\beta_{42}$'nin artan konsantrasyonları ile beraber Rct değerindeki artışın takibi ise $\Delta Rct = Rct\ (A\beta_{42}) - Rct\ (BSA)$ eşitliği kullanılarak yapıldı. Bu eşitlik ile hesaplanan ΔRct değerleri ile $A\beta_{42}$ konsantrasyonları ile standart grafikler çizildi.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Hazırlanan bu tez kapsamında Alzheimer hastalığının teşhisine yönelik olarak $A\beta_{42}$ protein analizi için elektrokimyasal temelli impidimetrik bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Biyosensör sisteminin ölçümü, redoks probu olarak kullanılan $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içeren reaksiyon hücresinde, çalışma elektrodu olarak iletkenliği 550 nm (>%79) ve yüzey direnci 60Ω/sq olan, tek kullanımlık indiyum kalay oksit kaplı polietilen teraftalat (ITO-PET) tabakalar, referans elektrot olarak KCl ile doygunlaştırılmış 3M Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak da 10 cm uzunluğunda Platin tel kullanılarak üçlü elektrot sistemi ile yapıldı. Deneylerde kullanılan ITO-PET tabakalar Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA'dan, KCl ile doygunlaştırılmış 3M Ag/AgCl elektrot ve Platin tel BASi, Warwickshire, UK firmasından temin edildi.

Biyosensör yanıtları döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak elde edildi. Ölçümler CV ve EIS yazılımları ve analiz programı (Echem Analyst) içeren bir bilgisayara bağlı FRA modüllü potanstiyostat/galvanostat cihazı (Gamry Potentiostate/Galvanostate, Reference 600 Gamry Instruments Warminster, USA) ile yapıldı.

Deneysel çalışmalar esnasında Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda mevcut olan ultrasonik su banyosu (Wise Clean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Biosan magnetc stirrer MSH 300), hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland), pH metre (6173 pH, made in China for USA), farklı hacimlerde mikro pipetler (Eppendorff, Middle East & Africa) kullanıldı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ tayinine yönelik biyosensör çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler aşağıda sıralanmıştır.

- Analit olarak kullanılan $A\beta_{42}$ proteini (sentetik olarak elde edilen Amyloid β Protein Fragment 1-42, 0.1 mg) ve bu proteine özgü olan antikor Anti-$A\beta_{42}$ (tavşandan elde edilen poliklonal Anti-Beta-Amyloid 1-42 Antibody, 50 µg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ITO-PET tabaka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ITO elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen hidroksilleme modifikasyonunda kullanılan %35'lik hidrojen peroksit (H_2O_2) (Isolab)
- ITO elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen hidroksilleme modifikasyonunda kullanılan %25-30'luk amonyum hidroksit (NH_4OH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- SAMs oluşumunda kullanılan 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan (GPDMMS, %97) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Antikor immobilizasyonundan sonra elektrot yüzeyinde GPDMMS molekülünün reaktif olmayan epoksi uçlarının bloke edilmesi için Sığır Serum Albümin (Bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Redoks probunda kullanılan potasyum ferrisiyanat ($K_3[Fe(CN)_6]$), potasyum ferrosiyanat ($K_4[Fe(CN)_6]3H_2O$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Tampon çözeltilerde kullanılan potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), disodyum monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- Etanol (Absolute %99.9) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- Aseton (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- Sabun çözeltisi (Honeywell Fluka)
- Serum replacement 3 (50x) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İnsan serumu (Normal Human Serum) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- İnsan serum albümini (Human Serum Albumin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Luteinleştirici Hormon (Luteinizing Hormone from human pituitary ≥8500 IU/mg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Alfa-1 Antitripsin (A1AT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Osteokalsin (osteocalcin fragment (1-49) human) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kemik siyaloprotein (Bone Sialoprotein, BSP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Büyüme-Farklılaşma Faktörü (Growth-differentiation Factor-15, GDF-15) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Biyosensör geliştirilirken kullanılan tüm çözeltiler taze hazırlandı ve günlük olarak tüketildi. Anti-$A\beta_{42}$ ve $A\beta_{42}$ proteinleri deneysel çalışmalarda kullanılacak konsantrasyonlarda seyreltilerek porsiyonlandı ve derin dondurucuda (-20 ^oC) saklandı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanışı

50 mM Fosfat tamponu (pH 7.0): 3.549 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 500 ml saf su içerisinde çözüldü. 3.4015 g KH_2PO_4 tartıldı ve 500 ml saf su içerisinde çözüldü. Her iki çözelti pH 7.0 olacak şekilde karıştırılarak tampon çözelti hazırlandı.

1X Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (pH 7.4): 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1.44 g Na_2HPO_4, 245 mg KH_2PO_4 tartıldı ve saf su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen çözelti saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

5.0 mM $K_3[Fe(CN)_6]$: 0.8231 g $K_3[Fe(CN)_6]$ tartıldı ve 500 ml 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu içinde çözüldü.

5.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$: 1.0560 g $K_4[Fe(CN)_6]$ tartıldı ve 500 ml 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu içinde çözüldü.

Redoks prob çözeltisi: 5.0 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 5.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltileri 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı. 3.72 g KCl tartıldı ve $K_3[Fe(CN)_6]$/ $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisine eklendi.

Hidroksilleme çözeltisi: Sırasıyla NH_4OH, H_2O_2 ve ultra saf su karışımı 1:1:5 (v/v) oranında olacak şekilde her ITO-PET elektrot için ayrı ayrı hazırlandı.

%0.5 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan: Ana stoktan (%97) 51.54 µL çekildi ve %99.9 etanol ile 10 ml'ye tamamlandı.

%0.5 BSA: 125 mg BSA tartıldı ve 25 ml ultra saf su içerisinde çözüldü.

Yapay Serum Çözeltisi: 25 ml Sigma Aldrich firmasından satın alınan serum replacement 3(50x) içine 8.37 mg KCl, 13.80 mg $CaCl_2$, 211.71 mg NaCl, 3.68 mg üre ve 21.04 mg D(+)-glukoz eklenerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. ITO-PET Elektrot Hazırlığı ve $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Stratejisi

3.2.1.1. Elektrot Temizliği

ITO-PET tabakadan 2 cm x 3 mm boyutlarında elektrotlar kesilerek $A\beta_{42}$ biyosensörünün inşa edileceği ITO-PET elektrotlar elde edildi.

ITO-PET elektrotların yüzeylerinin temizlenmesi biyosensör hazırlığının ilk adımını oluşturmaktadır. Bu temizlik adımı, elektrot yüzeyinde gerçekleştirilecek

immobilizasyonlarda ve elektrokimyasal ölçümler esnasında, yüzeyde bulunan organik safsızlıklardan kaynaklı oluşabilecek hataların önlenmesi için gereklidir.

Yüzey temizliği için; 2 cm x 3 mm boyutlarında kesilen ITO-PET elektrotlar sırasıyla aseton, sabun çözeltisi ve ultra saf su içerisine daldırıldı ve ağızları kapalı olacak şekilde, oda sıcaklığında, 10'ar dakika süreyle sonike edildi. Bu işlemlerin tamamlanmasının ardından elektrotlar argon gazı ile kurutuldu.

3.2.1.2. ITO Elektrot Yüzeyinde Aktif Hidroksil Gruplarının Biriktirilmesi

ITO elektrot yüzeyinde SAMs oluşumunun sağlanabilmesi için öncelikle aktif hidroksil gruplarının biriktirilmesi gereklidir. Bu amaçla bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı şekilde temizlenen elektrotlar, 1:1:5 (v/v/v) oranında NH_4OH, H_2O_2 ve ultra saf su karışımı içeren çözeltilere daldırılarak 90 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından elektrotlar ultra saf su içerisinde daldırma yapılarak yıkandı ve argon gazı ile kurutuldu.

3.2.1.3. GPDMMS ile SAMs Oluşumu

Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde hidroksillenen elektrotlar SAMs oluşumu için %99.9'luk etanol içerisinde hazırlanan 3-glisidoksipropildimetoksimetilsilan (GPDMMS) çözeltilerine daldırılarak 16 saat süreyle karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından çözeltilerden alınan elektrotlar, bağlanmamış veya fiziksel olarak adsorbe olmuş halde bulunan GPDMMS moleküllerinin uzaklaştırılması için ilk olarak etanol sonrasında saf su ile daldırma yapılarak yıkandı. Argon gazı ile kurutuldu.

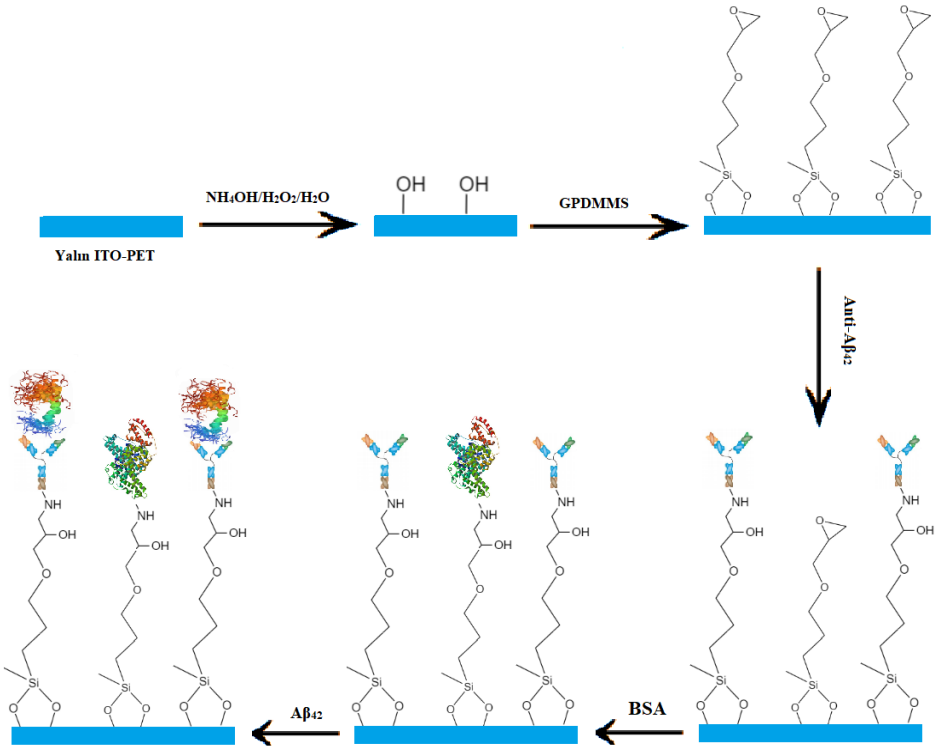
3.2.1.4. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tasarım Stratejisi

ITO-PET çalışma elektrotları yukarıda belirtildiği şekilde aktif hidroksil grupları biriktirilip silanlama ajanı olarak kullanılan GPDMMS molekülü ile modifiye edildikten sonra 1X PBS tamponu (pH 7.4) içerisinde hazırlanan 200 µL'lik Anti-$A\beta_{42}$ porsiyonlarında 1 saat süreyle, karanlık ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından elektrot yüzeyinde bağlanmamış halde

bulunan Anti-Aβ$_{42}$ moleküllerinin uzaklaştırılması için ultra saf su ile daldırma yapılarak yıkandı ve argon gazı ile kurutuldu.

Anti-Aβ$_{42}$ immobilizasyonu gerçekleştirilen elektrotlar, GPDMMS molekülünün açıkta kalan epoksi uçlarının kapatılması ve böylece spesifik olmayan etkileşimlerin önlenmesi amacıyla %0.5'lik BSA çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında BSA çözeltilerinden alınan elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp argon gazı ile kurutularak biyosensör tasarımı tamamlandı.

Geliştirilen biyosensörün tasarım stratejisi Şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Aβ$_{42}$ biyosensörünün tasarım stratejisi

3.2.2. Geliştirilen Biyosensörün Ölçüm Prensibi

Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde tasarlanan biyosensörün elektrokimyasal ölçümleri, prob çözeltisinin elektrik direncini azaltması için 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ redoks probunun kullanıldığı reaksiyon hücresinde, üçlü elektrot sistemi ile gerçekleştirildi. Bu ölçüm sisteminde ITO-PET elektrotlar çalışma

elektrodu, KCl ile doygunlaştırılmış 3M Ag/AgCl referans elektrot ve 10 cm uzunluğundaki Platin tel karşıt elektrot olarak kullanıldı.

Analizi yapılacak $A\beta_{42}$ proteinine spesifik Anti-$A\beta_{42}$ antikorunun immobilizasyonu tamamlandıktan sonra, ITO-PET çalışma elektrotları, 1X PBS tamponunda (pH 7.4) hazırlanan 200 µL'lik $A\beta_{42}$ protein porsiyonlarında 1 saat boyunca karanlık ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında bağlanmamış halde bulunan $A\beta_{42}$ moleküllerinin uzaklaştırılması için elektrotlar ultra saf su içerisinde daldırma yapılarak yıkandı. Son olarak, elektrotlar redoks probu içeren ölçüm hücresine yerleştirilerek elektrokimyasal ölçümleri yapıldı.

Elektrokimyasal ölçümler FRA modüllü potanstiyostat/galvanostat cihazı ile elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) teknikleri ile gerçekleştirildi. Elde edilen veriler EChem Analyst yazılım programı ile kaydedildi.

Elektrokimyasal impedans ölçümlerinde çalışma elektroduna 50 000 – 0.05 Hz frekans aralığında 10 mV'luk alternatif akım uygulandı. Döngüsel voltametri ölçümlerinde ise tarama hızı 100 mV/s, adım büyüklüğü 10 mV ve optimum potansiyel çalışma aralığı -0.5 - 1 V olarak seçildi.

3.2.3. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

Biyosensör tasarımında her bir immobilizasyon adımı için optimum koşulların belirlenerek biyosensör yanıtının ve hassasiyetinin arttırılması amacıyla optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, SAMs oluşumunda kullanılan GPDMMS konsantrasyonu, anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu ve inkübasyon süresi ve biyosensör yanıtları için ölçüm alınırken $A\beta_{42}$ proteini için inkübasyon süresi optimize edildi.

Bu çalışmalarda optimum koşulların belirlenebilmesi için farklı $A\beta_{42}$ konsantrasyonlarında alınan impedans ölçümlerinden Bölüm 2.4.2'de anlatıldığı gibi elde edilen yük transfer direnci (Rct) değerleri kullanıldı.

Her bir optimizasyon parametresi için $A\beta_{42}$ derişimine karşı ΔRct değerleri arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. ΔRct değerleri; $\Delta Rct = Rct\ (A\beta_{42}) - Rct\ (BSA)$ eşitliği kullanılarak hesaplandı.

3.2.3.1. GPDMMS Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Aktif hidroksil grupları oluşturulmuş ITO-PET elektrot yüzeyinde, kararlı ve dayanıklı SAMs oluşturabilmek; hazırlanan biyosensörde biyoalgılama elementinin bağlanma kapasitesini etkileyeceği için öncelikle GPDMMS molekülünün optimum konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla %99.9'luk etanolde %0.1, %0.25, %0.5 ve %1'lik GPDMMS çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.2.1.2'de belirtildiği gibi yüzeyleri hidroksillenen elektrotlar yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki GPDMMS çözeltilerine daldırılarak oda koşullarında ve karanlık ortamda 16 saat süreyle inkübe edildi. GPDMMS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisinin incelenebilmesi için anti-$A\beta_{42}$ ve $A\beta_{42}$ konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri sabit tutuldu. Dört farklı GPDMMS konsantrasyonunda hazırlanan biyosensörlerin impedans ölçümleri ile elde edilen verilerden yararlanarak optimum GPDMMS konsantrasyonu belirlendi ve sonraki çalışmalarda bu konsantrasyonla devam edildi.

3.2.3.2. Anti-$A\beta_{42}$ Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Tez kapsamında $A\beta_{42}$ analizi için hazırlanan biyosensörün biyoalgılama elementi olan anti-$A\beta_{42}$'nin konsantrasyonu, daha duyarlı ve tekrarlanabilir biyosensör cevaplarının elde edilmesi için optimize edildi. Bu amaçla 1X PBS (pH 7.4) çözeltisi içinde 50 ng/ml, 100 ng/ml ve 200 ng/ml olacak şekilde anti-$A\beta_{42}$ porsiyonları hazırlandı. Bölüm 3.2.4.1'de belirtilen çalışmayla belirlenen optimum GPDMMS konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan elektrotlar 3 farklı konsantrasyondaki anti-$A\beta_{42}$ çözeltilerine daldırılarak 1 saat süreyle oda koşullarında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Optimum anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonunun belirlenebilmesi için anti-$A\beta_{42}$ inkübasyon süresi, $A\beta_{42}$ konsantrasyon aralığı ve inkübasyon süresi sabit tutuldu. Daha sonraki optimizasyon çalışmalarında, 3 farklı anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensörlerin ölçümü sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak belirlenen optimum anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu kullanıldı.

3.2.3.3. Anti-$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

$A\beta_{42}$ analizi için tasarlanan biyosensörde dayanıklı, kararlı ve hassas $A\beta_{42}$ ölçümlerine izin veren antijen-antikor komplekslerinin oluşturulabilmesi için anti-$A\beta_{42}$

molekülünün inkübasyon süresi optimize edildi. Bu amaçla GPDMMS ile modifiye edilen ITO-PET elektrotlar, Bölüm 3.2.4.2'de belirtilen çalışmayla belirlenen optimum anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonundaki antikor çözeltisi 30, 60 ve 90 dakikalık inkübasyon sürelerinde bekletildi ve bu üç biyosensörün yanıtları elektrokimyasal impedans ölçümleri yapılarak incelendi. Farklı inkübasyon periyotları sonunda oluşturulan kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler ışığında belirlenen optimum inkübasyon süresi bir sonraki $A\beta_{42}$ inkübasyon süresinin optimizasyonu adımında kullanıldı.

3.2.3.4. $A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Yukarıda belirtildiği şekilde optimize edilmiş koşullarda hazırlanan $A\beta_{42}$ biyosensörleri ile ölçüm sürecinde, ITO-PET elektrotlarda immobilize edilmiş Anti-$A\beta_{42}$ moleküllerine yüksek verimlilikte bağlanmayı sağlayabilmek amacıyla $A\beta_{42}$ proteininin inkübasyon süresi de optimize edildi. Bunun için optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar 30, 60 ve 90 dakika süreyle $A\beta_{42}$ çözeltilerine daldırılarak inkübe edildi. Ardından impedans ölçümleri yapılarak elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔR_{ct} değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi. Grafikten elde edilen veriler ışığında optimum $A\beta_{42}$ inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.4. Elektrot Yüzeyindeki Değişikliklerin İncelenmesi

3.2.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzeyin Görüntülenmesi

$A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon adımlarında, ITO-PET elektrot yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amacıyla, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (NABİLTEM), alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FEI-Quanta FEG 250) ile yüzey görüntüleri elde edildi. Elektrot yüzeyine ait SEM görüntülerinde 5 kV hızlanma gerilimi kullanıldı.

3.2.4.2. Fourier-dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) ile Yüzeyin İncelenmesi

Tez kapsamında tasarlanan $A\beta_{42}$ biyosensörünün SAMs ve anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonunda, elektrot yüzeyinde oluşan kimyasal bağların incelenmesi amacıyla Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde

(NABİLTEM), 4000–400 cm^{-1} aralığında işletilen Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) spektrumları kaydedildi.

3.2.6. $A\beta_{42}$ Analizi İçin Tasarlanan Biyosensörün Karakterizasyonu

Tez kapsamında $A\beta_{42}$ tayini için tasarlanan biyosensörün optimum çalışma koşullarının belirlenmesinin ardından, ideal bir biyosensör olup olmadığının belirlenmesi için bazı analitik karakteristik özellikleri de incelendi. Bu amaçla optimum koşullarda hazırlanan biyosensörlerde doğrusal tayin aralığı, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, rejenerasyon, depolama kararlılığı, yapay serumda uygulanması, ticari olarak satın alınan insan serumunda uygulanması çalışmaları ve sabit frekansta impedans analizi yapıldı.

3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Bölüm 3.2.4'te belirtilen optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen koşullarda (%0.5 GPDMMS, 100 ng/ml Anti-$A\beta_{42}$, 60 dakika Anti-$A\beta_{42}$ inkübasyon süresi) hazırlanan biyosensörler ile $A\beta_{42}$ proteini 60 dakika inkübasyon süresi kadar bekletilerek 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan $A\beta_{42}$ protein çözeltileri kullanılarak $A\beta_{42}$ biyosensörünün doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.2.6.2. Tekrar Üretilebilirlik

Hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için optimize edilen koşullarda, farklı günlerde 10 adet $A\beta_{42}$ biyosensörü hazırlandı. Bu biyosensörlerin 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan $A\beta_{42}$ protein çözeltileri için biyosensör yanıtları EIS spektrumları ile takip edildi. Elde edilen Nyquist eğrileri yardımıyla hesaplanan ΔRct değerleri kullanılarak derişime karşılık yük transfer direnci grafikleri çizildi. Grafik denklemleri yardımı ile biyosensörün tekrar üretilebilirliği değerlendirildi.

3.2.6.3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmasında, 8 adet ITO-PET elektrot optimize edilen koşullarda hazırlandı. $A\beta_{42}$'nin sabit konsantrasyondaki (60 pg/ml) biyosensör cevapları

elde edildi. Yapılan ölçümler sonucunda hesaplanan ΔRct değerleri kıyaslanarak biyosensörün tekrarlanabilirliği değerlendirildi.

3.2.6.4. Seçicilik

$A\beta_{42}$ tayini için hazırlanan biyosensörün farklı analit proteinler varlığında, spesifik olmayan etkileşimler yoluyla girişim yaparak biyosensör cevaplara etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için seçicilik çalışması yapıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensörde büyüme-farklılaşma faktörü (Growth-differentiation Factor-15, GDF-15), alfa-1-antitripsin (A1AT), osteokalsin (OCN), kemik siyaloprotein (Bone Sialoprotein, BSP), luteinleştirici hormon (LH) ve insan serum albümini de analit olarak kullanıldı. Seçicilik çalışmaları kapsamında kullanılan tüm analit proteinler 100 pg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 1X PBS çözeltisinde (pH 7.4) porsiyonlandı. Yukarıda belirtilen analitlerin biyosensör cevapları $A\beta_{42}$'nin aynı konsantrasyonda (100 pg/ml) alınan biyosensör yanıtı ile karşılaştırıldı.

3.2.6.5. Sabit Frekansta İmpedans (SFI) Analizi

Elektrokimyasal temelli bir biyosensörde, antikor-antijen kompleksi oluşumundaki kinetik davranış Bölüm 2.2.2.1'de belirtildiği gibi sabit frekans yöntemi ile takip edilebilmektedir. Bu amaçla GPDMMS modifiyeli ITO-PET elektrotlarda anti-$A\beta_{42}$ ve akabinde BSA immobilizasyonu tamamlandıktan sonra yapılan impedans ölçümünde elde edilen Bode grafiğindeki verilerden yararlanıldı. FRA modüllü potanstiyostat/galvanostat cihazı Bode grafiği yardımı ile belirlenen sabit frekansa (15 Hz) ayarlandı. Ölçümler 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde üçlü elektrot sistemi ile yapıldı. Bu analiz yönteminde zamanla impedans değerindeki ve faz açısındaki değişim değerlendirildi.

3.2.6.6. Depolama Kararlılığı

Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan $A\beta_{42}$ biyosensörlerinin depo ömrü, belirli periyotlarla ölçümü yapılarak takip edildi. Bu amaçla aktif hidroksil grupları birikimi gerçekleştirilen ITO-PET elektrotlar, sırasıyla GPDMMS, Anti-$A\beta_{42}$ ve BSA immobilizasyonları gerçekleştirildikten sonra ölçüm alınıncaya kadar +4 ^{o}C'de muhafaza edildi. Biyosensörlerin 7 günlük periyotlarda, sabit $A\beta_{42}$ konsantrasyonunda (60 pg/ml)

EIS ölçümü yapıldı. Biyosensör performansındaki değişim, ilk gün yapılan ölçümde elde edilen yük transfer direnci baz alınarak değerlendirildi.

3.2.6.7. Tekrar Kullanılabilirlik (Rejenerasyon)

Tez kapsamında tasarlanan $A\beta_{42}$ biyosensöründe çalışma elektrodu olarak kullanılan ITO-PET elektrotlar, biyosensör maliyetini azaltmak amacıyla rejenere edildi. Aynı elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin değerlendirildiği bu çalışmada GPDMMS ile modifiye edilmiş elektrotlarda anti-$A\beta_{42}$ ve BSA immobilizasyonlarından sonra ITO-PET elektrotlar 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$ ile muamele edildi. Biyosensör ölçümü yapıldıktan sonra, elektrotlar 10 mM HCl çözeltisine daldırılarak rejenere edildi. Rejenerasyon sonrası impedans ölçümü yapılarak yüzey deformasyonu değerlendirildi. Ardından tekrar 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$ ile muamele edildi. Biyosensör yanıtlarında anlamlı bir değişiklik oluncaya kadar bu işlem tekrarlandı. Biyosensör performansındaki değişim, ilk $A\beta_{42}$ (60 pg/ml) ölçümünde elde edilen ΔRct değeri baz alınarak değerlendirildi.

3.2.6.8. Yapay Serumda Uygulama

Bu karakterizasyon çalışmasında, $A\beta_{42}$ protein analizi için tasarlanan biyosensörün, ticari olarak satın alınan Serum Replacement 3 (50x) çözeltisinde var olan proteinlerin ve bu çözeltiye ilave edilen tuz, glukoz, üre gibi bileşenlerin biyosensör yanıtlarına etkisi incelendi. Bu amaçla $A\beta_{42}$ proteini yapay serum çözeltisi içerisinde 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında olacak şekilde porsiyonlandı.

3.2.6.9. İnsan Serumunda Uygulama

Tez kapsamında hazırlanan biyosensör, $A\beta_{42}$'nin kan serumunda kantitatif analizinin yapılabilmesi amacıyla tasarlandı. Bu amaçla, ticari olarak satın alınan insan serumundaki tuz, protein ve diğer biyolojik bileşenlerin ölçüm esnasında ITO-PET elektrot yüzeyindeki antijen-antikor kompleksi (anti-$A\beta_{42}$-$A\beta_{42}$ kompleksi) ve dolayısıyla biyosensör cevabı etkisinin olup olmadığı incelendi. $A\beta_{42}$ çözeltileri, 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında olacak şekilde, 10^6 kat seyreltilmiş insan serumunda hazırlandı.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

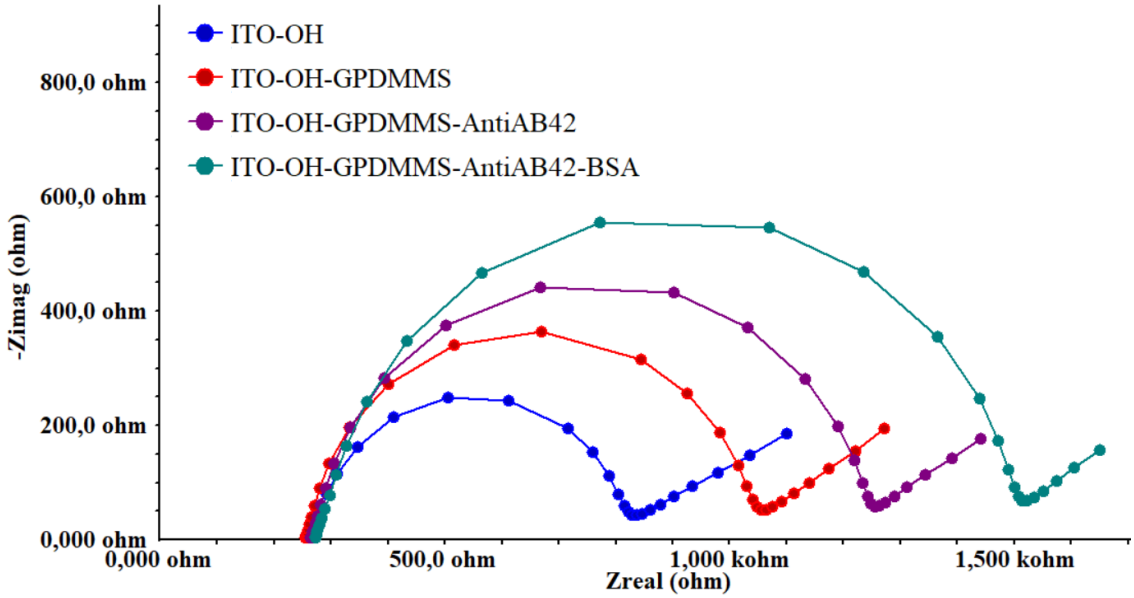
4.1. $A\beta_{42}$ Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Biyosensör Tasarımında Elde Edilen Bulgular

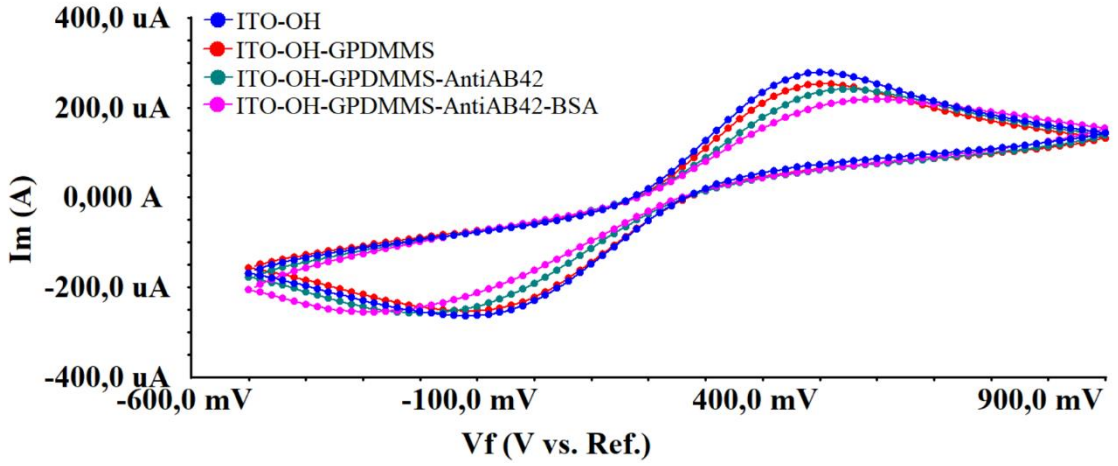
$A\beta_{42}$ tayini için tasarlanan biyosensörün her immobilizasyon adımı sonrasında ITO-PET elektrot yüzeyinde oluşan değişimlerin izlenebilmesi için EIS ve CV ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.1a ve Şekil 4.1b'de gösterilmektedir. Her immobilizasyon adımında biyosensör yanıtı EIS ölçümleriyle elde edilen Nyquist eğrileri yardımı ile yük trasfer direnci (Rct) değerleri hesaplandı. Elde edilen Rct sonuçları Çizelge 4.1'de ve Şekil 4.1c'de sütun grafik olarak verildi.

Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1'de immobilizasyon basamakları,

1. Aktif hidroksil grupları biriktirilmiş ITO-PET yüzeyi: ITO-OH
2. GPDMMS ile SAMs oluşturulmuş ITO-PET yüzeyi: ITO-OH-GPDMMS
3. Antikor immobilizasyonu sonrası ITO-PET yüzeyi: ITO-OH-GPDMMS-AntiAB42
4. BSA sonrası ITO-PET yüzeyi: ITO-OH-GPDMMS-AntiAB42-BSA olarak ifade edilmiştir.

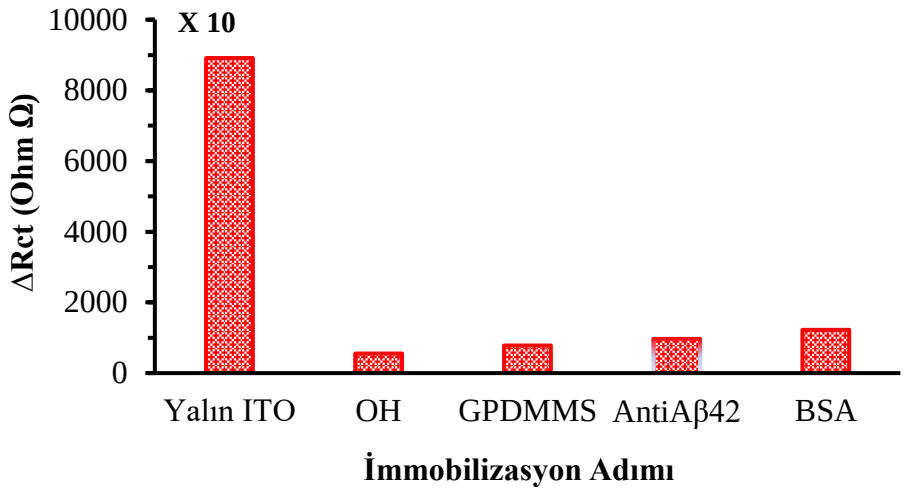


Şekil 4.1a. Aβ$_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen impedans spektrumları



Şekil 4.1b. Aβ$_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen döngüsel voltamogramları

Şekil 4.1a incelendiğinde immobilizasyon adımlarına ait Nyquist grafiklerindeki yarım daire çapları, yük transfer direncini (Rct) göstermektedir. Şekil 4.1b'deki döngüsel voltamogramlarda, grafiklere ait pik yükseklikleri elektrot yüzeyinin elektrik iletkenliği yani akım ile doğru orantılıdır.



Şekil 4.1c. $A\beta_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen EIS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerlerine bağlı sütun grafik

Çizelge 4.1. $A\beta_{42}$ biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen EIS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleri

Elektrot Yüzeyi	**Rct (Ohm Ω)**
Yalın ITO	89180
ITO-OH	555.7
ITO-OH-GPDMMS	780.4
ITO-OH-GPDMMS-Anti$A\beta_{42}$	968
ITO-OH-GPDMMS-Anti$A\beta_{42}$-BSA	1222

ITO-PET elektrotlar, metal oksit bir yüzeye sahip oldukları için, Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı şekilde temizlendikten sonra yapılan EIS ölçümünde (Yalın ITO) Rct değeri Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere (89 180 ohm) oldukça yüksektir.

GPDMMS molekülleri ile SAMs oluşabilmesi için aktif hidroksil (-OH) grupları biriktilen elektrotlara ait EIS (Şekil 4.1a) ve CV (Şekil 4.1b) ölçümlerinde -OH gruplarının yük aktarımına izin vermeleri sebebiyle ITO elektrot yüzeyinin iletkenliğinde belirgin bir artış görülmektedir. Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde elektrot yüzeyinde aktif hidroksil grupları biriktirildikten sonra Nyquist grafiğinden hesaplanan Rct değeri

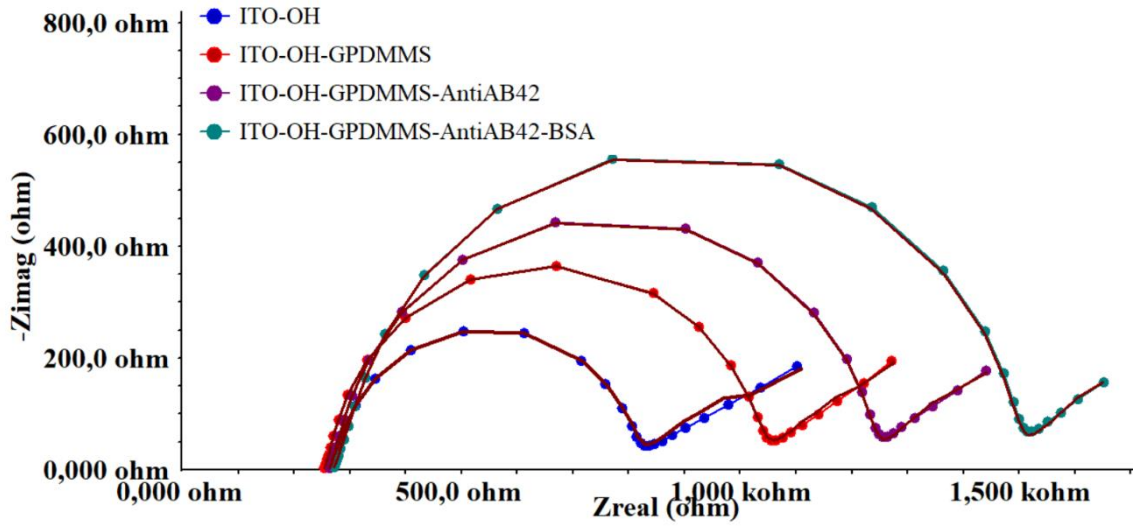
(555.7 ohm), yalın ITO'ya ait Rct değeri (89 180 ohm) ile karşılaştırıldığında elektrot yüzeyindeki iletkenlik artışını ortaya koymaktadır.

SAMs oluşumunda, GPDMMS molekülüne ait metoksi grupları hidrolize olarak elektrot yüzeyinde bulunan -OH grupları ile siloksan bağı oluşturmaktadır. Bu şekilde kovalent olarak bağlanan GPDMMS molekülü iletkenliği düşürerek impedansı (780.4 ohm) arttırmıştır.

GPDMMS immobilizasyonundan sonra açıkta kalan epoksi ucunun, anti-$A\beta_{42}$ molekülündeki nükleofilik amino grubu ile reaksiyona girmesiyle halka açılımı gerçekleşir ve anti-$A\beta_{42}$'nin immobilize olmasını sağlar. Protein yapısındaki anti-$A\beta_{42}$, iletken olmadığı için elektrolit çözeltisinden elektrot yüzeyine elektron geçişini kısmen engeller ve Şekil 4.1a'daki Nyquist eğrisinin çapı yani biyosensör cevabı (968 ohm) artar. Bu durum Şekil 4.1'deki döngüsel voltamogramlarda iletkenlikteki azalma yani pik yüksekliğindeki azalma olarak görülmektedir.

ITO-PET elektrot son olarak Anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonundan sonra açıkta kalan epoksi uçlarının kapatılması ve dolayısıyla 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında $A\beta_{42}$ proteininin spesifik olmayan bağlanmalarının engellenmesi için elektrot yüzeyi sığır serum albümin (BSA) ile muamele edilmiştir. BSA, antikor bağlanmamış epoksi grupları ile bağ yaparak yüzey direncini daha da arttırarak Rct değerinin 1222 ohm olarak bulunmasına neden olmuştur. Bu duruma bağlı olarak döngüsel voltamogramdaki pik yüksekliği de azalmıştır.

Kramers Kronig dönüşümü elektrokimyasal impedans spektrumunda enstrümental hatalar gibi dış etkenlerden dolayı oluşan sapmaları göstermektedir. Bu yöntemde yapılan hesaplamada ya impedans verilerinin gerçek kesitinin hayali bölümü kullanılır ya da hayali bölümün gerçek kesiti hesaplanır (Demirbakan & Sezgintürk, 2017). $A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait her Nyquist eğrisi için FRA modüllü potansiyostat cihazı ile farklı biyosensör yüzeylerine ait uyum değerleri hesaplandı (Şekil 4.2). Bu yöntem sayesinde geliştirilen biyosensörün stabilitesi de test edilmiş oldu.



Şekil 4.2. $A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm eğrileri

Şekil 4.2'deki kırmızı renkli eğriler, Şekil 4.1a'daki immobilizasyon basamaklarına ait Nyquist eğrileri üzerine potansiyostat cihazı tarafından belirlenen Kramers Kronig dönüşümüne ait eğrilerdir. Biyosensöre ait gerçek impedans değerleri için çizilen Nyquist eğrileri ile Kramers Kronig dönüşümüne ait spektrumlar arasındaki fark Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İmmobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

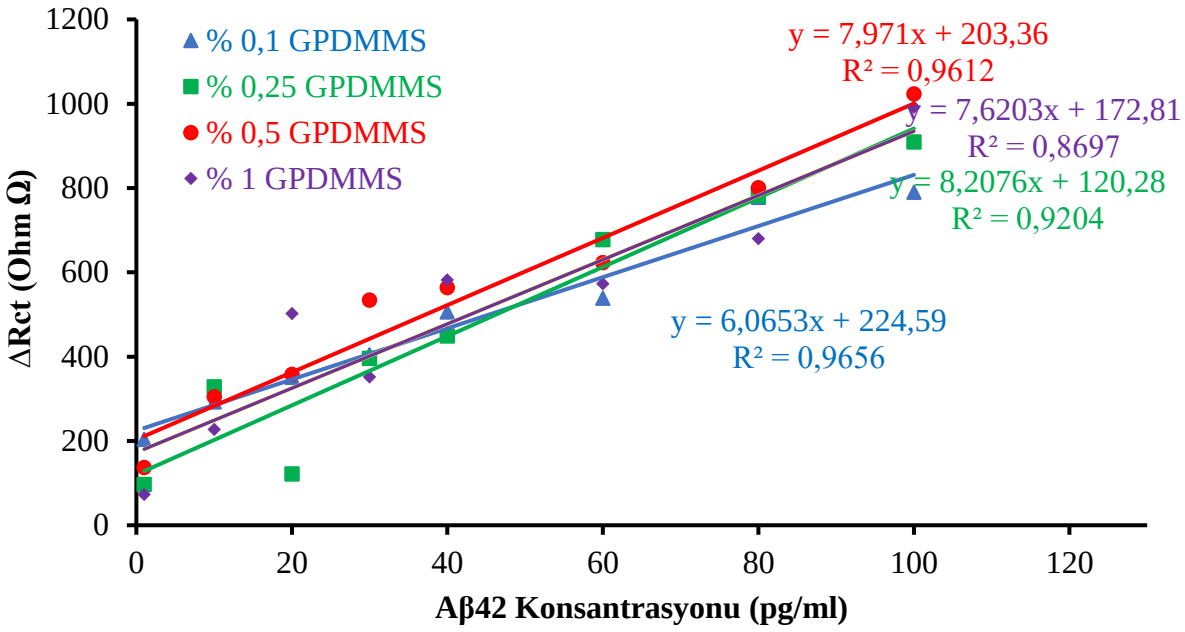
İmmobilizasyon Adımı	**Kramers Kronig Dönüşüm Değeri (μ)**
Yalın ITO	34.99
OH	95.57
GPDMMS	16.99
Anti-$A\beta_{42}$	8.11
BSA	4.273

Çizelge 4.2'deki değerler incelendiğinde, iki spektrum arasındaki farkın küçük olduğu dolayısıyla impedans spektrumlarının dış etkenlerden çok fazla etkilenmediği görülmektedir.

4.1.2. İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.2.1. GPDMMS Molekülünün Optimum Konsantrasyonu

Aktif hidroksil grupları biriktirilmiş ITO-PET yüzeyinde SAMs oluşumu, biyoalgılama elemanı olan anti-$A\beta_{42}$'nin immobilizasyonunda, bağlanmayı büyük ölçüde etkilediği için ilk olarak GPDMMS molekülünün optimum konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla elektrotlar, %99.9'luk etanolde hazırlanan %0.1, %0.25, %0.5 ve %1'lik GPDMMS ile modifiye edilerek SAMs tabakası oluşturuldu. 4 farklı GPDMMS konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensörlerin EIS ölçümleri alındı ve Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplandı. ΔRct değerlerinin $A\beta_{42}$ konsantrasyonuna karşı çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3'te gösterilmektedir. Hazırlanan her biyosensörün kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. GPDMMS optimizasyonuna ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.3. GPDMMS konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

GPDMMS Konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
%0.10	y = 6.0653x + 224.59	R^2 = 0.9656
%0.25	y = 8.2076x + 120.28	R^2 = 0.9204
%0.50	y = 7.971x + 203.36	R^2 = 0.9612
%1.0	y = 7.6203x + 172.81	R^2 = 0.8697

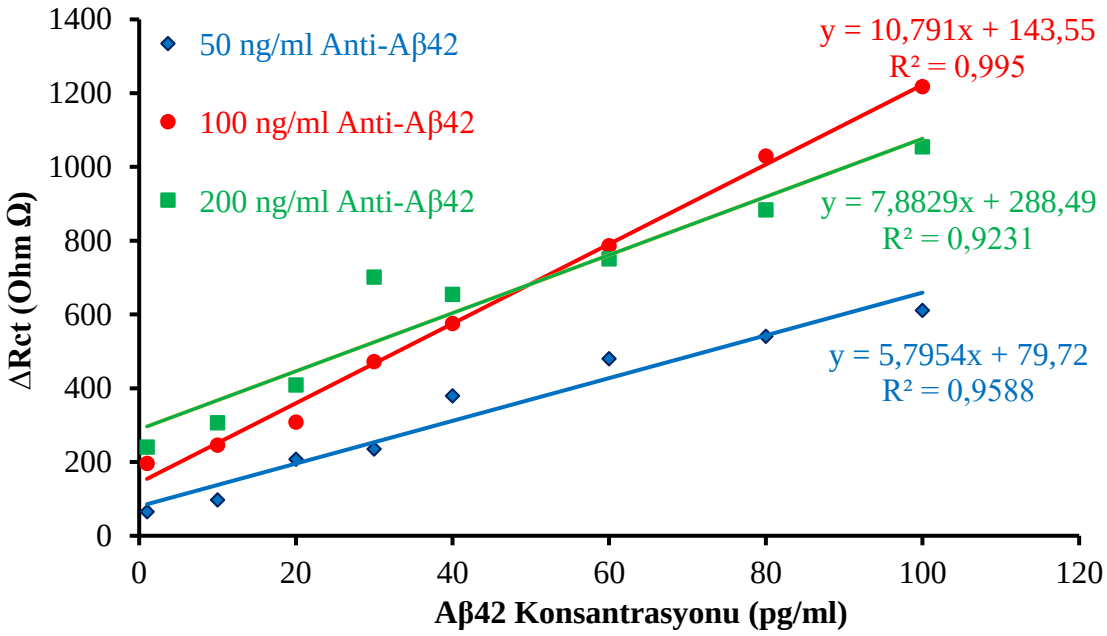
ITO-PET elektrot yüzeyinde SAMs oluşturmak üzere kullanılan GPDMMS konsantrasyonu; elektrot yüzeyindeki SAMs'in kararlılığına ve elektrot yüzeyindeki organosilan molekülünün uzak ucundaki fonksiyonel grup miktarına da etkir. Fonksiyonel grup miktarına bağlı olarak SAMs üzerine immobilize edilecek anti-$A\beta_{42}$ miktarını ve dolayısıyla oluşacak antikor-antijen komplekslerini de etkileyerek biyosensör cevabını değiştirecektir. Bu nedenle farklı GPDMMS konsantrasyonlarında farklı biyosensör davranışları görüldü.

Şekil 4.3'te görüldüğü üzere %0.1 GPDMMS kullanılarak hazırlanan biyosensörde, R^2 = 0.9656 değeri ile doğrusallık katsayısının oldukça iyi olmasına rağmen $A\beta_{42}$ konsantrasyonu arttıkça biyosensör cevabı diğer GPDMMS konsantrasyonlarına göre daha düşük kalmıştır ve elde edilen doğrunun eğimi (m=6.0653) de diğer kalibrasyon grafiklerininkine göre daha küçüktür. Bu durum %0.1'lik GPDMMS'nin kararlı SAMs oluşumunda yetersiz kaldığının göstergesi olabilir. Çalışmada kullanılan en yüksek GPDMMS konsantrasyonu olan (%1.0) kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği incelendiğinde ise, grafik denklemindeki eğim değerinin (m=7.6203) daha yüksek olduğu, ancak doğrusallık katsayısının R^2 = 0.8697 olduğu görülmektedir. Bunun nedeni; kullanılan GPDMMS konsantrasyonuna bağlı olarak yüzeyde daha sık istiflenmiş bir SAMs oluşması, bunın da anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonunda düzensizliğe ve biyosensör yanıtlarının düşük olmamasına rağmen R^2 değerinin doğrusallıktan daha uzak olmasına neden olmuş olabilir. Ancak %0.25 ve %0.5'lik GPDMMS ile hazırlanan biyosensörlerin grafikleri karşılaştırıldığında eğim değerlerinin birbirine yakın olduğu, biyosensör yanıtlarının ve doğrusallık katsayılarının da yüksek olduğu görülmektedir. Bu iki konsantrasyondan; %0.25 GPDMMS

kullanıldığında elde edilen grafiğin eğimi çok az yüksek olmasına rağmen, %0.5'lik GPDMMS ile elde edilen grafiğin doğrusallık katsayısı daha yüksek olduğu için (R^2 = 0.9612), %0.5'lik GPDMMS optimum konsantrasyon olarak belirlendi.

4.1.2.2. Anti-$A\beta_{42}$ Optimum Konsantrasyonu

Daha önceki çalışmada belirlenen optimum GPDMMS konsantrasyonu (%0.5) kullanarak hazırlanan biyosensörlerde 50, 100 ve 200 ng/ml konsantrasyonları kullanılarak anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonunun optimizasyonu çalışması yapıldı. Bu amaçla hazırlanan biyosensörlerin EIS ölçümleri sonucu hesaplanan ΔRct değerleri ile 1-100 pg/ml arasında değişen $A\beta_{42}$ konsantrasyonları arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. Elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'te, grafiklere ait doğruların doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu optimizasyonuna ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.4. Anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
50 ng/ml	y = 5.7954x + 79.72	R^2 = 0.9588
100 ng/ml	y = 11.129x + 100.74	R^2 = 0.9571
200 ng/ml	y = 7.8829x + 288.49	R^2 = 0.9231

Anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu optimizasyonuna ait Şekil 4.4'teki grafikler incelendiğinde; 50 ng/ml anti-$A\beta_{42}$ ile hazırlanan biyosensörün EIS cevaplarının diğer konsantrasyonlara göre düşük olduğu görülmektedir. Bu durum anti-$A\beta_{42}$ miktarının, etkin bir antikor-antijen bağlanması dolayısıyla daha yüksek biyosensör yanıtı için yetersiz kalmış olması nedeniyle olabilir.

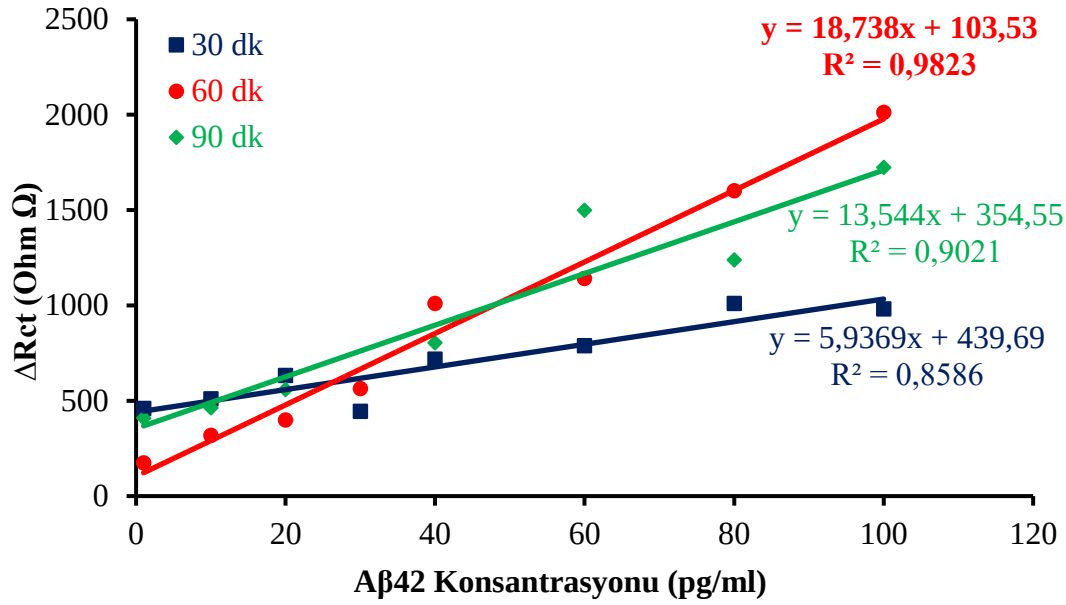
Bu çalışmada kullanılan en yüksek antikor konsantrasyonu 200 ng/ml anti-$A\beta_{42}$ kullanıldığında elde edilen doğrunun hem doğrusallık katsayısının hem de eğiminin (100 ng/ml anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonuna ait grafikten elde edilen verilerden (R^2 = 0.9231 ve m=7.8829)) daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum yüksek anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu kullanıldığında elektrot yüzeyinde $A\beta_{42}$ bağlanmasına yönelik daha fazla sterik engel oluşmasından ve protein-protein etkileşimindeki inhibe edici etkiden kaynaklanıyor olabilir.

Bu veriler göz önüne alınarak, optimum anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu olarak 100 ng/ml seçildi.

4.1.2.3. Optimum Anti-$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi

Optimum GPDMMS konsantrasyonu (%0.5) ve optimum anti-$A\beta_{42}$ konsantrasyonu (100 ng/ml) kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile etkin antikor-antijen komplekslerinin oluşumu için optimum anti-$A\beta_{42}$ inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 30, 60 ve 90 dakika süreyle bekletilerek elektrotların yüzeyinde anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonları gerçekleştirildi.

Biyosensör cevaplarının ölçümü ile belirlenen ΔR_{ct} değerleri ile $A\beta_{42}$ konsantrasyonlarına karşı kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.5). Şekil 4.5'te görülen kalibrasyon grafiklerine ilişkin doğru denklemleri ve doğruların doğrusallık katsayıları Çizelge 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5. Anti-Aβ$_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmasına ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.5. Anti-Aβ$_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

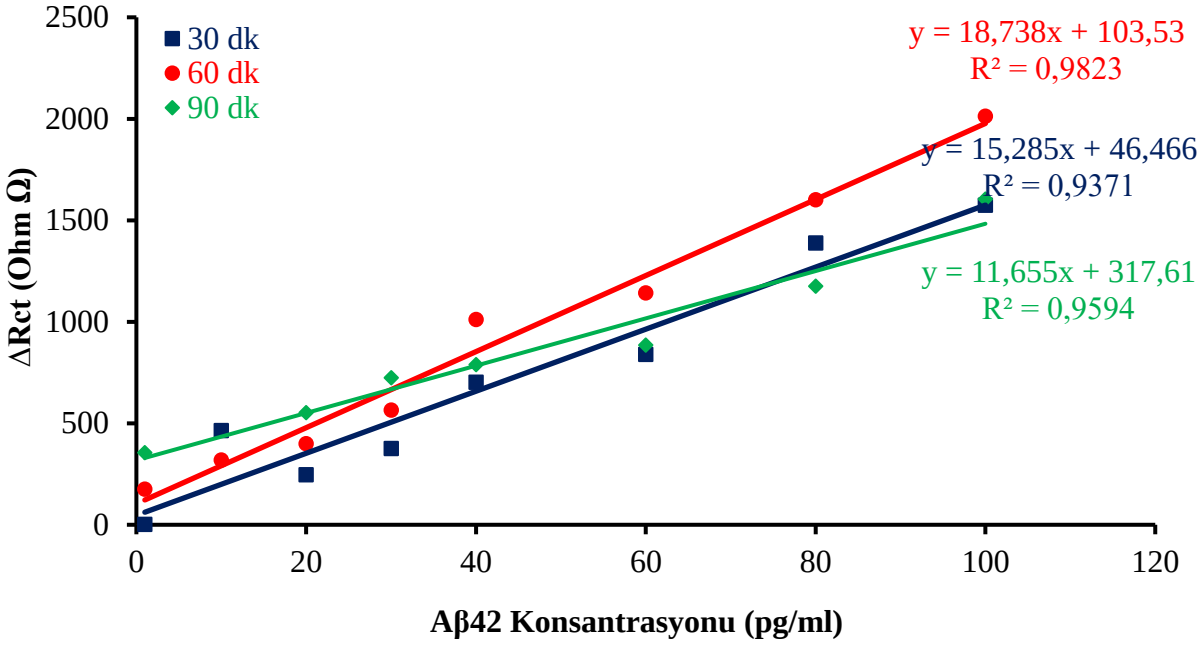
Anti-Aβ$_{42}$ İnkübasyon Süresi	**Doğru Denklemi**	**Doğrusallık Katsayısı (R^2)**
30 dakika	y = 5.9369x + 439.69	R^2 = 0.8586
60 dakika	y = 18.738x + 103.53	R^2 = 0.9823
90 dakika	y = 13.544x + 354.55	R^2 = 0.9021

Şekil 4.5'teki veriler incelendiğinde; 30 dakikalık inkübasyon süresine ait çalışmada kalibrasyon duyarlığının düşük olduğu görülmektedir. Bu durum doğru denklemindeki eğim değerinden (m=5.9369) açıkça görülmektedir. Ayrıca doğrusallığın da R^2 = 0.8586 değeri ile diğer grafiklerin doğrusallık katsayılarına göre düşük kaldığı görülmektedir. Biyosensör yanıtlarındaki bu düşük değer 30 dakika antikor inkübasyon süresinin etkin anti-Aβ$_{42}$ - Aβ$_{42}$ kompleks oluşumu için yetersiz kalmış olabileceğini düşündürmektedir. 90 dakikalık antikor inkübasyonu sonunda elde edilen doğru değerlendirildiğinde ise; uzayan inkübasyon süresi nedeniyle elektrot yüzeyinde kısmen daha fazla antikor bağlanması düzensizliğin artmasına neden olmuş, yüksek protein konsantrasyonlarında yapılan ölçümlerde, yüzeyde bulunan fazla miktarda antikor, protein moleküllerinin doğru yönelimle antikor moleküllerine yaklaşmasına sterik bir

engel oluşturmuş olabilir. Bu durum doğrusallıktan (R^2 = 0.9021) sapmaya ve görece daha düşük biyosensör cevabına yol açmıştır. Tüm bu veriler ışığında hem doğrusallık katsayısının (R^2 = 0.9823) iyi olduğu, hem doğru eğiminin (m=18.738) iyi olması nedeniyle 60 dakika inkübasyon süresi optimum koşul olarak kabul edildi.

4.1.2.4. Optimum $A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi

Tez kapsamında hazırlanan biyosensörde yüksek verimlilikte $A\beta_{42}$ bağlanması sağlamak amacıyla, GPDMMS modifiyeli ITO elektrotlarda biyosensör yanıtı almak üzere; 30, 60 ve 90 dakika süreyle $A\beta_{42}$ inkübasyonu çalışıldı. Gerçekleştirilen EIS analizleri sonucunda sonucunda elde edilen ΔRct değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu grafiğe ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları ise Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. $A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonuna ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.6. $A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
30 dakika	y = 15.285x + 46.66	R^2 = 0.9371
60 dakika	y = 18.738x + 103.53	R^2 = 0.9823
90 dakika	y = 11.655x + 317.61	R^2 = 0.9594

$A\beta_{42}$ inkübasyon süresi optimizasyonu sonrası elde edilen Şekil 4.6'daki kalibrasyon grafikleri incelendiğinde; 30 ve 90 dakikalık periyotlar sonunda daha düşük biyosensör yanıtları elde edilmiştir.

30 dakika inkübasyon süresi, analit protein olan $A\beta_{42}$ molekülünün elektrot yüzeyinde immobilize edilmiş halde bulunan antikor moleküllerine bağlanarak etkin, dayanıklı ve kararlı antikor-antijen kompleksi oluşumu için yetersiz kalmış ve buna bağlı olarak biyosensör cevabında düşme (m=15.285) ve doğrusallıktan sapma (R^2 = 0.9371) meydana gelmiş olabilir. 90 dakikalık $A\beta_{42}$ inkübasyon süresinde ise uzayan inkübasyon süresi elektrot yüzeyinde daha fazla analit protein bağlanmasına fakat bu bağlanmalardan kaynaklı yüzeyde düzensizliğe yol açmış olabilir. Bu durum biyosensör cevabının (m=11.655) diğer inkübasyon sürelerine oranla düşük kalmasına ve doğrusallıktan sapmaya (R^2 = 0.9594) neden olmuş olabilir. Bu çalışmanın sonucunda; en iyi biyosensör cevapları (m=18.738) ve bu cevapların doğrusallık katsayısının (R^2 = 0.9823) daha iyi olması sebebiyle optimum inkübasyon süresi 60 dakika olarak bulundu.

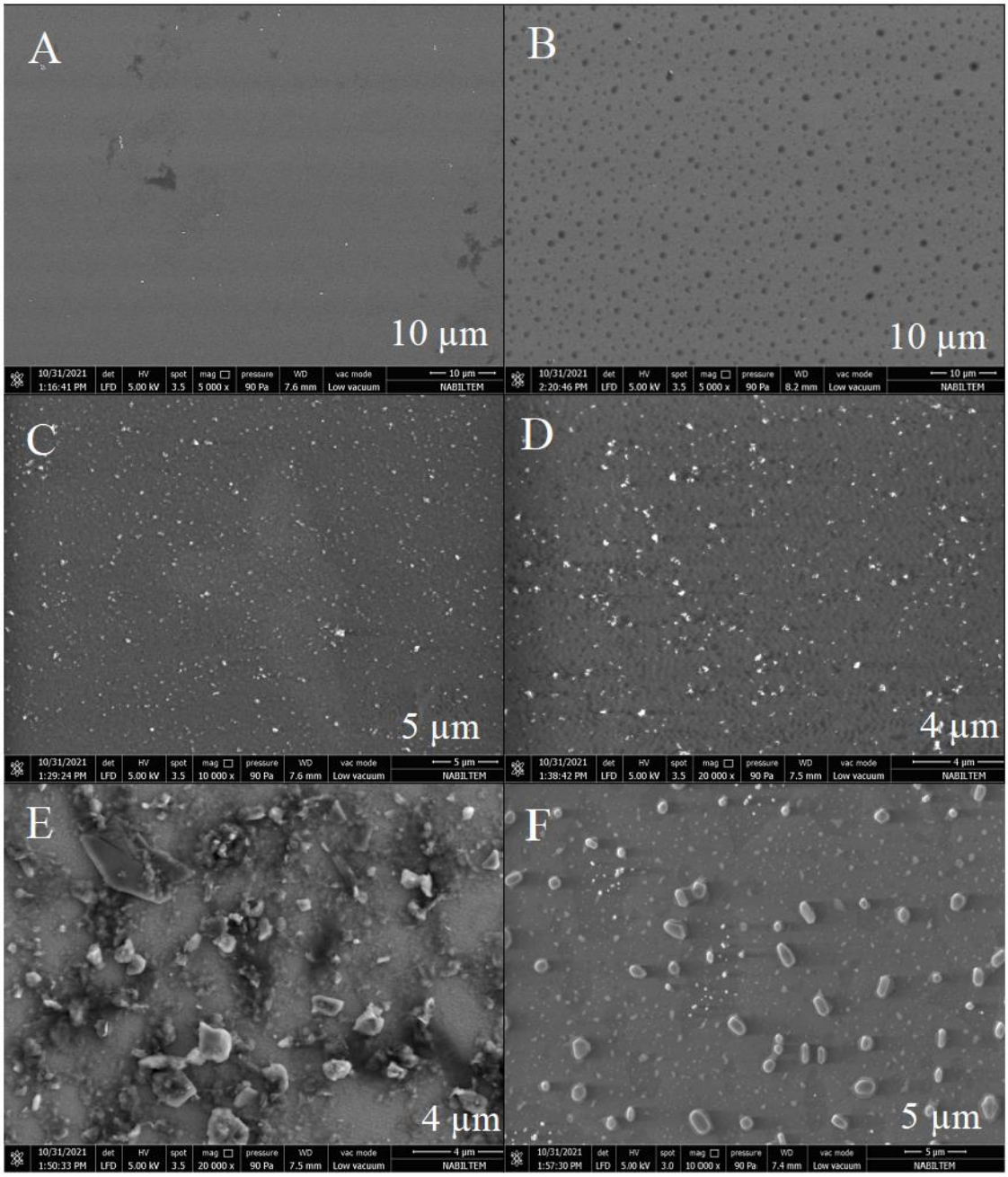
Yukarıda belirtildiği şekilde geliştirilen biyosensörün, immobilizasyon basamaklarının optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum değerlerin tümü Çizelge 4.7'de verilmiştir. Bu değerler biyosensörün analitik karakteristik özelliklerini aydınlatabilmek amacıyla gerçekleştirilecek bundan sonraki çalışmalarda $A\beta_{42}$ biyosensörü hazırlarken kullanılmıştır.

Çizelge 4.7. $A\beta_{42}$ biyosensörünün geliştirilmesinde optimum çalışma koşulları

Optimizasyon Parametreleri	**Optimum Değerler**
GPDMMS Konsantrasyonu	%0.50
Anti-$A\beta_{42}$ Konsantrasyonu	100 ng/ml
Anti-$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi	60 dk
$A\beta_{42}$ İnkübasyon Süresi	60 dk

4.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Tez kapsamında tasarlanan $A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon adımlarının morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. SEM ile elde edilen görüntüler (Şekil 4.7) elektrot yüzeyinde meydana gelen değişimler hakkında bilgi vermektedir.



Şekil 4.7. $A\beta_{42}$ biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri (A) Yalın ITO, (B) ITO-OH, (C) ITO-OH-GPDMMS, (D) ITO-OH-GPDMMS-Anti-$A\beta_{42}$, (E) ITO-OH-GPDMMS-Anti-$A\beta_{42}$-BSA, (F) ITO-OH-GPDMMS-Anti-$A\beta_{42}$-BSA-$A\beta_{42}$

Şekil 4.7(A) temiz ITO yüzeyinin homojen görünümü görülürken, Şekil 4.7(B)'de ise aktif hidroksil grupları biriktirildikten sonra elde edilen SEM görüntüsünün yalın elektroda göre farklılaştığı, yüzeyin homojen olarak küçük küreciklerle kaplandığı görülmektedir.

GPDMMS ile modifiye edilmiş ITO-PET elektrot yüzeyi Şekil 4.7(C)'de gösterilmiştir. Elektrot yüzeyindeki küçük küreciklerin yerini daha dolgun taneciklerin aldığı ve yüzeyin kaplandığı dikkat çekmektedir.

Şekil 4.7(D) görülen Anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonu sonrası yüzey morfolojisindeki değişimi incelendiğinde yüzeydeki kaplama kalınlığının arttığı ve taneciklerin de irileştiği gözlenmektedir.

BSA immobilizasyonuna ait SEM görüntüsü ise Şekil 4.7(E)'de verilmiştir. Bu SEM görüntüsünde farklı olarak yüzey üzerinde daha önce görülmemiş kümelenmiş protein yapıları göze çarpmaktadır.

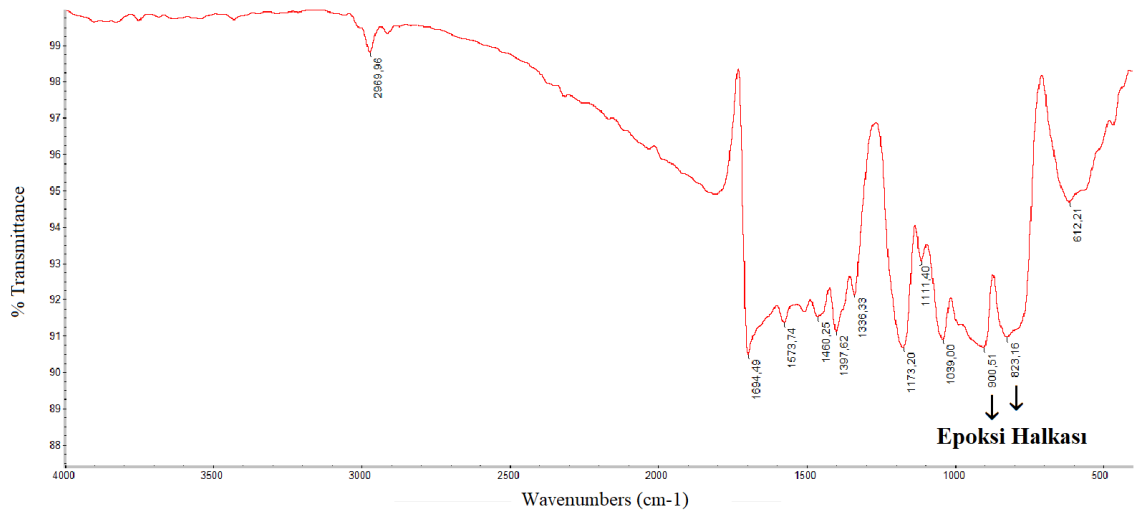
Son olarak Anti-$A\beta_{42}$-$A\beta_{42}$ immünokompleks oluşumuna ait Şekil 4.7(F)'de verilen SEM görüntüsünde amorf kümelenmiş proteinlerin yerini daha düzgün şekilli tablet görünümlü protein yapılarının aldığı görülmektedir.

Şekil 4.7'de sunulan bu SEM fotoğrafları, ITO-PET elektrot yüzeyindeki değişimlerin EIS ve CV ölçümlerinin sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

4.1.4. Fourier-dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

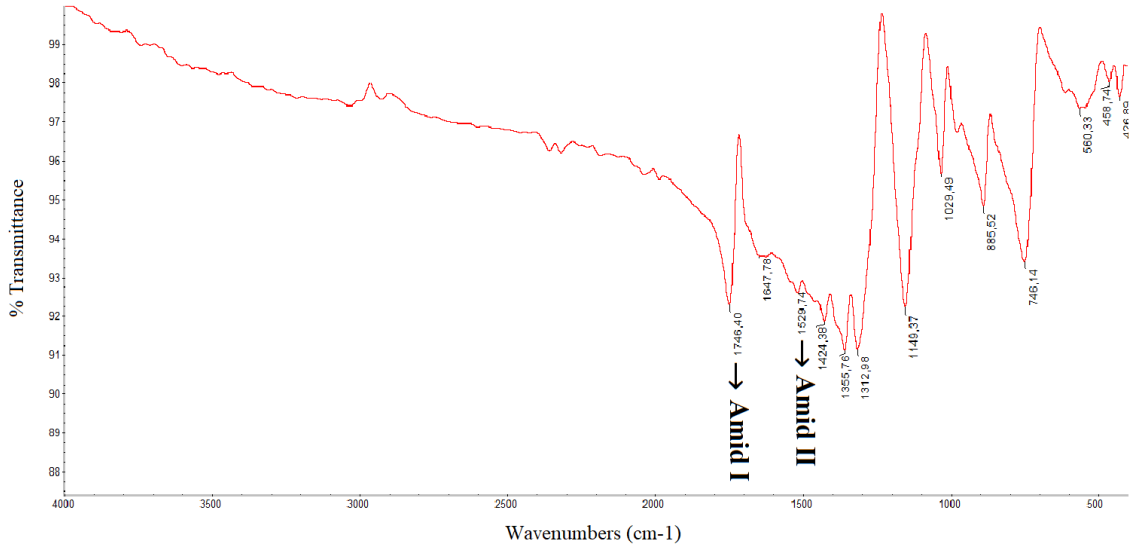
ITO-PET elektrot yüzeyinde GPDMMS ve Anti-$A\beta_{42}$ immobilizasyonlarından elde edilen FTIR sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmektedir.

GPDMMS molekülü ile SAMs oluşumu sonrası elde edilen Şekil 4.8'deki FTIR spektrumunda 900 cm^{-1} ve 823 cm^{-1}'de GPDMMS'nin açıkta kalan epoksi grubunun karakteristik bandı görülmektedir. Bu da ITO-PET elektrot yüzeyinin GPDMMS ile halihazırda kaplandığını göstermektedir ve SEM görüntüleri, EIS ve CV ölçümlerinin sonuçlarını destekler niteliktedir.



Şekil 4.8. Aβ$_{42}$ biyosensörünün GPDMMS immobilizasyonu sonrası FTIR sonucu

Biyosensör inşası esnasında SAMs tabakası üzerine anti-Aβ$_{42}$ molekülü immobilize edildikten sonra bu piklerin kaybolduğu ve Şekil 4.9'da verilen FTIR spektrumunda 1746 cm^{-1}'de C=O gerilmesine ait (amid I) ve 1529 cm^{-1} 'de N-H bağına ait (amid II) karakteristik piklerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Sözkonusu bu pik değerleri, GPDMMS'nin epoksi grupları ile anti-Aβ$_{42}$ antikorunun uç amino grupları arasında amid bağlarının oluştuğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.9. Aβ$_{42}$ biyosensöründe anti-Aβ$_{42}$ immobilizasyonu sonrası FTIR sonucu

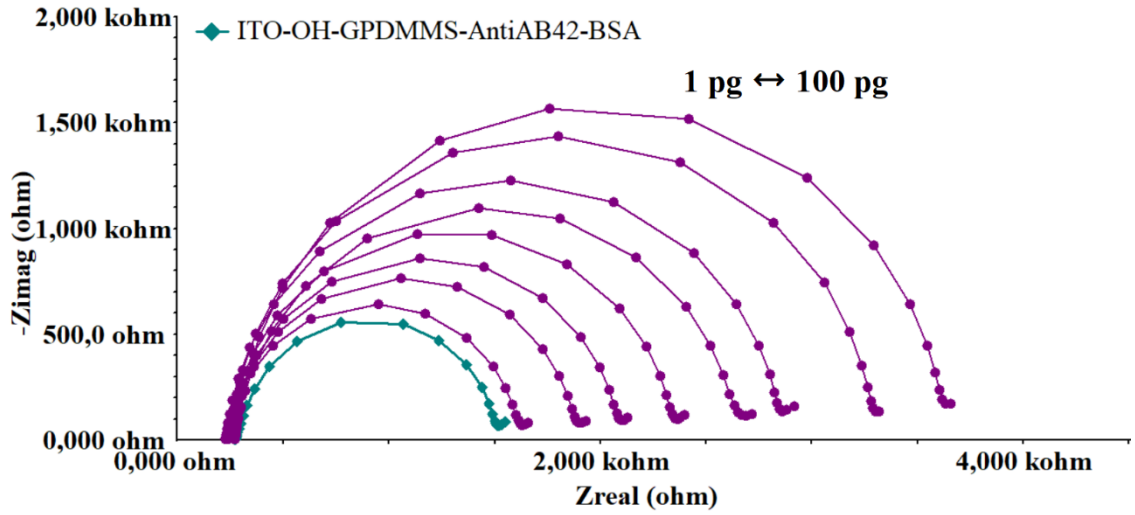
.

4.1.5. Aβ42 Biyosensörünün Karakterizasyona İlişkin Bulgular

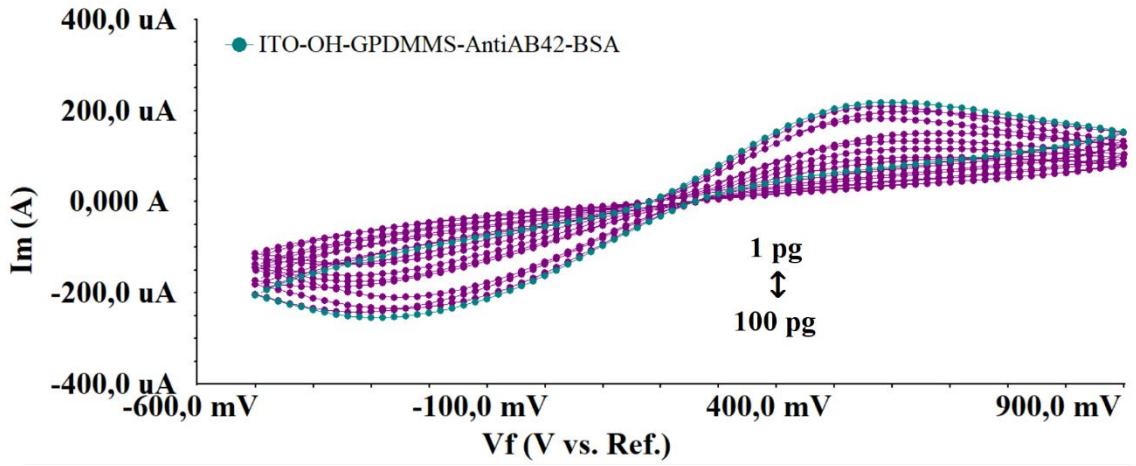
4.1.5.1. Aβ42 Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı

Çizelge 4.7'de verilen optimum koşullarda hazırlanan $A\beta_{42}$ biyosensörleri ile yürütülen deneylerde EIS ve CV ölçümleri ile doğrusal tayin aralığı 1-100 pg/ml olarak belirlendi. Bu konsantrasyon aralığında elde edilen EIS ve CV ölçümlerinin Nyquist eğrileri olarak alınan impedans spektrumları ve döngüsel voltamogramları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

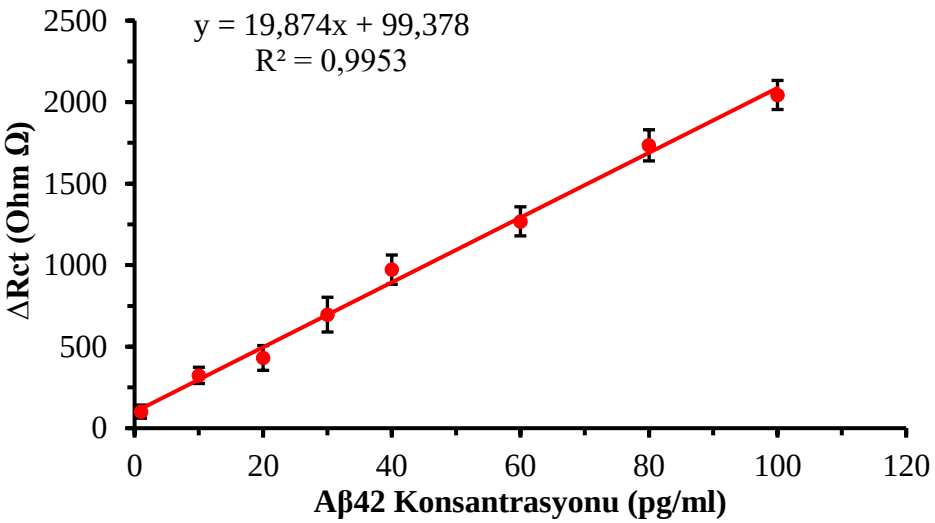
EIS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleri kullanılarak çizilen standart grafik Şekil 4.12'da görülmektedir.



Şekil 4.10. $A\beta_{42}$'nin 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığındaki Nyquist eğrileri



Şekil 4.11. $A\beta_{42}$'nin 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları



Şekil 4.12. $A\beta_{42}$ biyosensörünün 1-100 pg/ml tayin aralığına ait standart grafik

GPDMMS modifiyeli ITO-PET elektrot yüzeyinde immobilize edilen anti-$A\beta_{42}$ moleküllerine bağlanan $A\beta_{42}$ moleküllerinin konsantrasyonu arttıkça, EIS ölçümünden elde edilen Nyquist eğrilerinin de çapı artmaktadır. Çaptaki bu artış yük transfer direncindeki (Rct) artış ile ilişkilidir. Rct değerindeki artış ise elektrottaki antikor-antijen kompleksinden kaynaklı yüzey iletkenliğindeki azalışın göstergesidir. Şekil 4.10'da görüldüğü üzere Nyquist eğrilerinin çapı yani Rct değerleri $A\beta_{42}$ konsantrasyonu artıkça artmaktadır. Şekil 4.11'de ise döngüsel voltamogramların tepe akımlarının $A\beta_{42}$ konsantrasyonundaki artışın yüzeydeki iletkenliği azaltması nedeniyle gittikçe azaldığı görülmektedir.

$A\beta_{42}$ biyosensörünün standart grafiği; optimum koşullarda hazırlanmış tekrar üretilebilirlik çalışmasında 10 adet biyosensörün ΔRct değerlerinin ortalaması kullanılarak çizildi (Şekil 4.12). Grafikte; $A\beta_{42}$ konsantrasyonu arttıkça biyosensör yanıtı yani ΔRct değerinin de lineer olarak arttığı görülmektedir, doğrusallık katsayısının da R^2= 0.9974 değeri ile oldukça iyi olduğu tespit edilmiştir.

Tespit limiti (LOD), bir numunedeki analitin nicelendirilemeyen ancak tespit edilebilen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. Tayin sınırı (LOQ) analitik proseslerin belirtilen çalışma koşulları altında kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla belirlenebilen bir numunedeki analitin en düşük konsantrasyonudur (Shrivastava & Gupta, 2011; Uhrovčík, 2014). Tez kapsamında tasarlanan biyosensör ile $A\beta_{42}$'nin analizi için LOD ve LOQ değerleri $A\beta_{42}$'nin en düşük konsantrasyonda alınan ölçümlerin standart sapması hesaplanarak belirlendi. LOD ve LOQ değerinin hesabı aşağıdaki eşitliklere göre yapıldı:

LOD = 3 x SD (Standart Sapma) / m (Standart grafiğin eğimi)

LOQ = 10 x SD (Standart Sapma) / m (Standart grafiğin eğimi)

Yukarıdaki eşitliklere göre LOD değeri 0.37 pg/ml ve LOQ değeri 1.25 pg/ml olarak hesaplandı.

4.1.5.2. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tekrar Üretilebilirliği

Farklı zamanlarda, optimum çalışma koşullarında hazırlanan 10 ayrı biyosensör sistemi ile doğrusal tayin aralığındaki konsantrasyonlarda EIS ölçümleri yapıldı. Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerine karşı konsantrasyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerdeki doğruların denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. $A\beta_{42}$ biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik çalışmalarının doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Biyosensör Numarası	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Tayin Aralığı (pg/ml)
1	y = 22.271x – 98.561	R^2 = 0.9928	1-100 pg/ml
2	y = 21.708x + 80.067	R^2 = 0.9921	1-100 pg/ml
3	y = 21.485x + 45.735	R^2 = 0.9976	1-100 pg/ml
4	y = 19.852x + 156.33	R^2 = 0.9943	1-100 pg/ml
5	y = 19,281x + 44,614	R^2 = 0,9875	1-100 pg/ml
6	y = 19.152x + 205.34	R^2 = 0.9874	1-100 pg/ml
7	y = 18.627x + 125.18	R^2 = 0.9828	1-100 pg/ml
8	y = 18.517x + 118.3	R^2 = 0.9924	1-100 pg/ml
9	y = 18.064x + 79.321	R^2 = 0.987	1-100 pg/ml
10	y = 17.574x + 152.79	R^2 = 0.9871	1-100 pg/ml

Çizelge 4.8'de görüldüğü üzere ölçümleri yapılan biyosensörlerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları birbirine oldukça yakın değerlerdedir. Bu da tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

4.1.5.3. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği

Optimum ve benzer çalışma koşullarında hazırlanan 8 adet ITO-PET elektrotla sabit $A\beta_{42}$ konsantrasyonunda (60 pg/ml) ölçüm yapıldı. Her elektrot için hesaplanan ΔRct değerinin Şekil 4.8'de verilen standart grafikte yerine konmasıyla hesaplanan $A\beta_{42}$ miktarları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

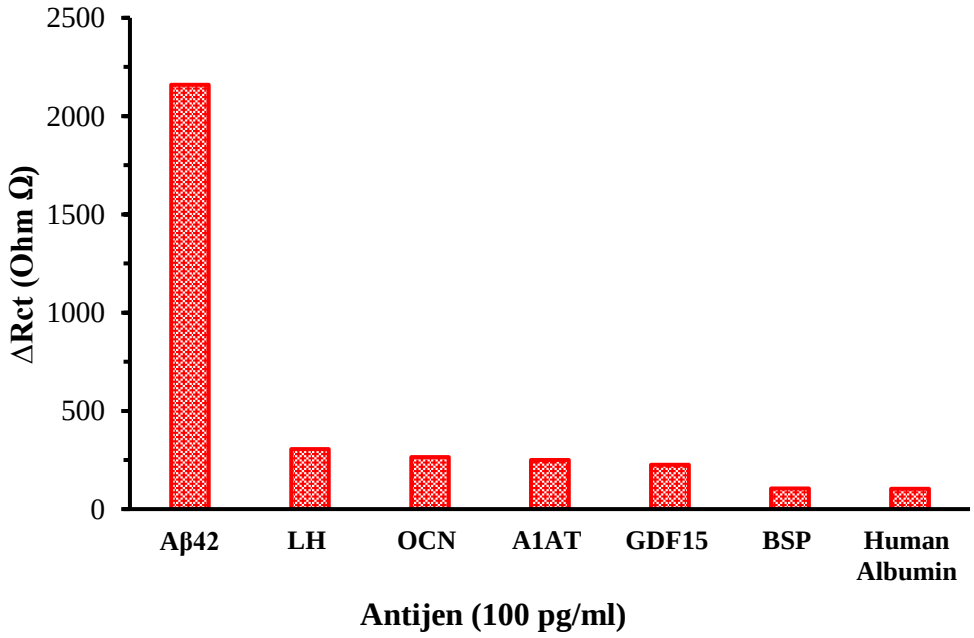
Çizelge 4.9'daki veriler doğrultusunda $A\beta_{42}$ analizine yönelik hazırlanan biyosensörün, 60 pg/ml konsantrasyonundaki ortalama konsantrasyon değeri 59.38 ± 1.71 pg/ml ve relatif standart sapma değeri ise %2.89 pg/ml olarak hesaplandı.

Çizelge 4.9. Tekrarlanabilirlik ölçümlerine ilişkin tablo

Elektrot Numarası	Kullanılan $A\beta_{42}$ Konsantrasyonu	Ölçülen $A\beta_{42}$ Konsantrasyonu	Geri Kazanım (%)
1	60 pg/ml	59.9 pg/ml	99.83
2	60 pg/ml	59.53 pg/ml	99.21
3	60 pg/ml	59.58 pg/ml	99.3
4	60 pg/ml	60.48 pg/ml	100.8
5	60 pg/ml	62.02 pg/ml	103.36
6	60 pg/ml	58.1 pg/ml	96.83
7	60 pg/ml	56.14 pg/ml	93.56
8	60 pg/ml	59.32 pg/ml	98.86

4.1.5.4. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Seçiciliği

Tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensörünün seçiciliğinin, farklı antijenler varlığında, değerlendirilmesi amacıyla LH, OSCN, A1AT, GDF-15, BSP ve insan albümini kullanılarak biyosensör yanıtları incelendi. Yapılan çalışmada kullanılan tüm analit proteinleri 100 pg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde 1X PBS (pH 7.4) tamponunda porsiyonlandı. EIS ölçümleri yapılarak elde edilen biyosensör yanıtları Şekil 4.13'te kullanılan antijene karşı ΔRct değeri olarak verilmektedir.



Şekil 4.13. $A\beta_{42}$ biyosensörünün seçicilik çalışmaları grafiği

Şekil 4.13'teki sütun grafikler incelendiğinde 2159 ohm ΔRct değeri ile en yüksek cevap $A\beta_{42}$'nin analit olarak kullanıldığı biyosensörde elde edilmiştir. Diğer proteinlerdeki biyosensör yanıtları ise; LH'ta 306 ohm, OSCN'de 265 ohm, A1AT'de 250 ohm, GDF-15'te 226 ohm, BSP'de 105 ohm, insan albüminde 104 ohm olarak bulunmuştur.

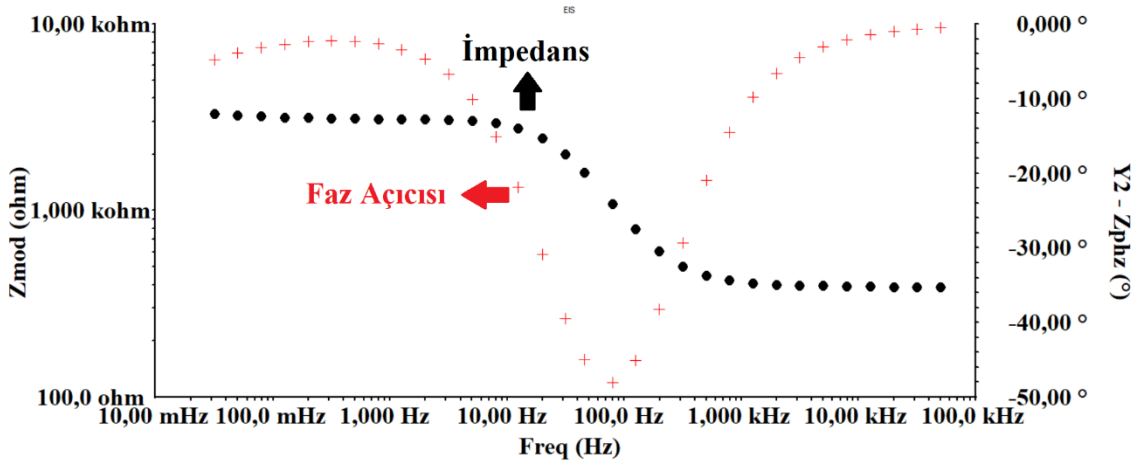
Yapılan çalışmada elde edilen ΔRct değerleri göz önünde bulundurulduğunda, aynı konsantrasyonlarda (100 pg/ml) farklı analit proteinleri varlığında hazırlanan biyosensörler ile $A\beta_{42}$ biyosensörünün verdiği cevap arasındaki büyük fark, biyosensörün seçiciliğinin iyi olduğunu göstermektedir. Farklı analit proteinleri kullanıldığında alınan EIS yanıtları, $A\beta_{42}$ proteinine ait amino asit kalıntıları ile diğer proteinlerdeki amino asit kalıntıları arasındaki benzerlikten ve buna bağlı olarak da biyoalgılama elementi olan anti-$A\beta_{42}$ ile antikor-antijen kompleksleri oluşturmalarından kaynaklanıyor olabilir. Ancak elde edilen ΔRct değerlerinin düşüklüğü, diğer analit proteinlerle kararlı ve etkin antikor-antijen komplekslerinin oluşmadığını göstermektedir

4.1.5.5. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Sabit Frekanstaki İmpedans (SFI) Analizi

$A\beta_{42}$ biyosensöründe, anti-$A\beta_{42}$ ile $A\beta_{42}$ arasındaki antikor-antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi ve böylece çalışma elektrodundaki immünoreaksiyonun gerçek zamanlı süresinin tespiti için sabit frekansta impedans analizi yapıldı.

Bu amaçla GPDMMS modifiyeli ITO-PET elektrodun BSA immobilizasyonu adımından sonra EIS ölçümü yapıldı. Bu ölçüme ait Bode grafiğindeki (Şekil 4.14) verilerden yararlanılarak sabit frekans analizinde kullanılacak tek frekans değeri (15 Hz) belirlendi.

.

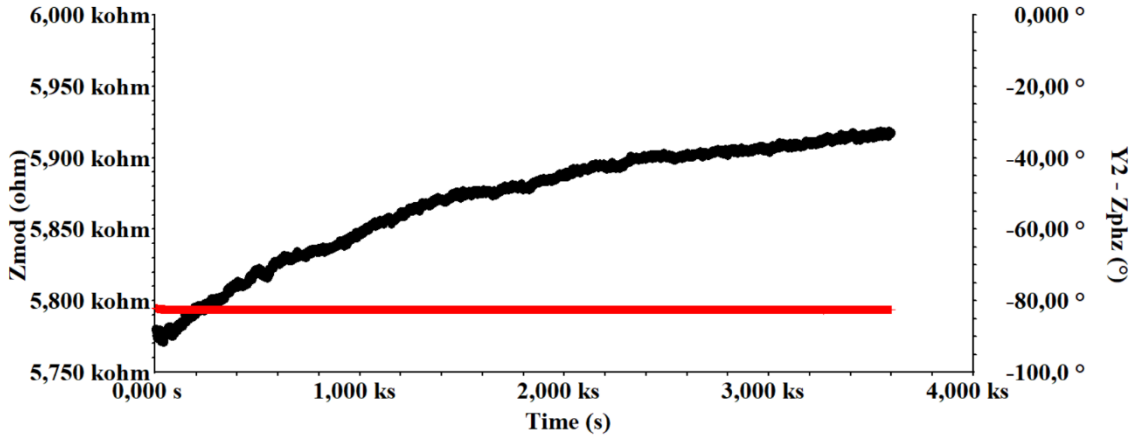


Şekil 4.14. $A\beta_{42}$ biyosensörünün BSA adımına ait Bode grafiği

Şekil 4.14'teki grafiğe incelendiğinde, impedansın frekansa bağlılığı doğrudan görülmektedir. Bu grafikte impedans değerindeki değişim ile faz açısındaki değişim arasındaki farktan yararlanılarak sabit frekans analizi için potansiyostat cihazında frekans değeri 15 Hz olarak seçildi.

Bu ölçüm tekniğinde de üçlü elektrot sistemi kullanılırken diğer ölçümlerden farklı olarak, redoks probu yerine 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanıldı. BSA immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ITO-PET elektrot ölçüm hücresine yerleştirildikten sonra $A\beta_{42}$ protein çözeltisi, ölçüm esnasında mikro pipet yardımı ile ölçüm hücresine eklendi.

$A\beta_{42}$ biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.15'de verilmektedir.



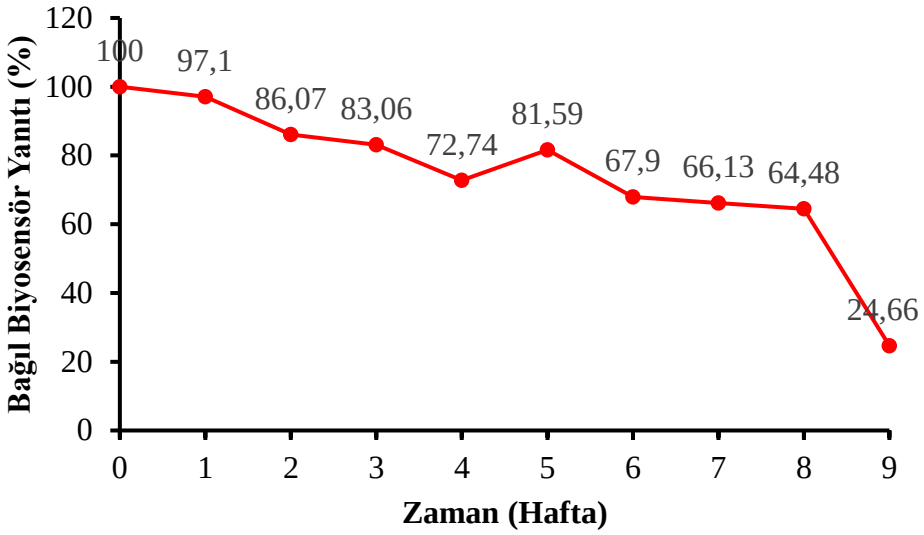
Şekil 4.15. $A\beta_{42}$ biyosensörünün SFI analizine ait grafik (siyah renkli eğri impedansı, kırmızı renkli eğri faz açısını göstermektedir.)

Şekil 4.15'te verilen grafik; impedans ve faz açısının zamana bağlı olarak değişimini göstermektedir. Tez kapsamında yapılan optimizasyon çalışmalarında $A\beta_{42}$ proteininin optimum inkübasyon süresi (Bölüm 4.1.2.3) 60 dakika olarak belirlendiği için SFI analizinde de ölçüm süresi 60 dakika (3600 saniye) olarak seçildi.

Şekil 4.15'teki grafik incelendiğinde; antikor-antijen (anti-$A\beta_{42}$-$A\beta_{42}$) kompleksi oluşumu esnasında meydana gelen direncin zamanla artışı impedans eğrisinden açıkça görülmektedir. Bu artış ilk 1000 saniyede daha fazla iken 2600. saniyeden itibaren azalarak sabitlenmeye başlamıştır. Bu durum elektrot yüzeyinde anti-$A\beta_{42}$'nin doygunluk noktasına ulaşması ve buna bağlı olarak daha fazla $A\beta_{42}$ bağlanmasına izin vermemesiyle açıklanabilir.

4.1.5.6. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Depolama Kararlılığı

Tez kapsamında hazırlanan $A\beta_{42}$ biyosensörünün depolama kararlılığının değerlendirilmesi amacıyla GPDMMS modifiyeli ITO-PET elektrotlar, Anti-$A\beta_{42}$ ve BSA immobilizasyonları tamamlandıktan sonra +4 ^{o}C'de tampon kullanmaksızın kuru olarak depolandı. Bu çalışma doğrultusunda yapılan tüm ölçümlerde 1X PBS (pH 7.4) tamponunda hazırlanmış 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$ molekülü kullanıldı. Elektrotların hazırlandığı ilk gün alınan EIS ölçümü 100 olarak kabul edildi. Daha sonrasında 7 günlük periyotlarla yapılan EIS ölçümleri sonucu elde edilen ΔRct değerlerinin, ilk ölçüme bağlı olarak (%) grafiği çizildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. $A\beta_{42}$ biyosensörünün depolama kararlılığına ait grafik

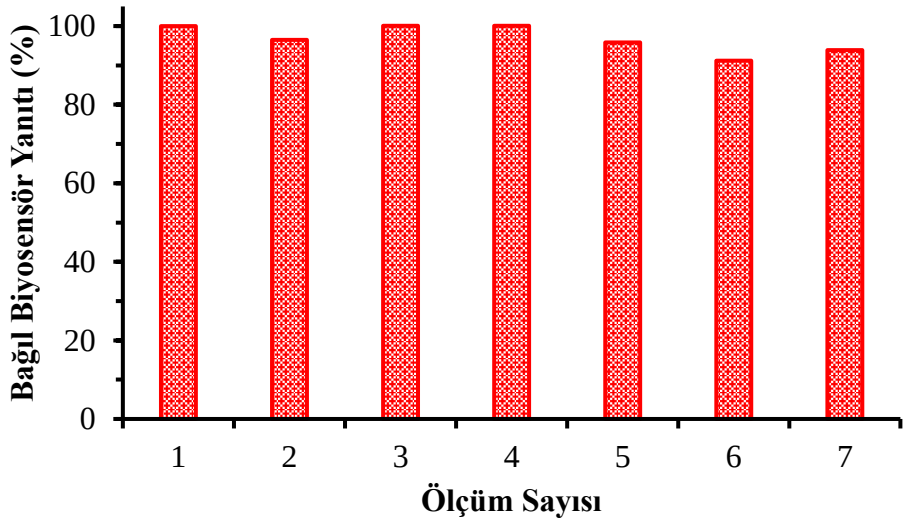
Şekil 4.16'daki grafiğe incelendiğinde $A\beta_{42}$ analizi için tasarlanan biyosensörünün antijen bağlama kapasitesini dokuzuncu haftaya kadar yaklaşık %60 oranında koruduğu görülmektedir. Bu değerler göz önüne alındığında ITO-PET elektrotlarda inşa edilen biyosensörün, sekizinci haftaya kadar antikor-antijen kompleksleri oluşturabilme kabiliyetinin yaklaşık %65'ini korurken, dokuzuncu hafta itibariyle büyük oranda kaybettiği görülmüştür. Laboratuvar koşullarında elde edilen depolama kararlılığı sonuçları endüstriyel ölçekte değişebilir. Bu amaçla daha ileriki çalışmalarda endüstriyel anlamda biyosensörün operasyonel kararlılığı değerlendirilebilri.

4.1.5.7. $A\beta_{42}$ Biyosensörünün Tekrar Kullanılabilirliği (Rejenerasyon)

$A\beta_{42}$ analizi için geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin (rejenere edilebilirliğinin) değerlendirildiği bu çalışmada optimum koşullarda hazırlanan elektrot yüzeyindeki antikor-antijen immünokompleksinin ayrıştırılıp tekrar bağlanabilme kapasitesi analizlenmiştir. Bu amaçla GPDMMS modifiyeli ITO-PET elektrotta anti-$A\beta_{42}$ ve BSA immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$ proteinine ait EIS yanıtı alındı. Ardından elektrot rejeneresyon işlemi için 10 mM HCl çözeltisinde 1 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra ultra saf ile daldırma yapılarak yıkanan elektrotların EIS ölçümü yapılarak elektrot yüzeyindeki antikor-antijen kompleksindeki ayrışma tespit

edildi. 10 mM HCl çözeltisi ile muamele edilen elektrotlarda, asit çözeltisinden kaynaklanan pH değişiminden ötürü elektrot yüzeyindeki proteine ait R yan gruplarında iyonlaşma sonucu gerçekleşen denatürasyon, $A\beta_{42}$ moleküllerinin biyoalgılama elemanından (anti-$A\beta_{42}$) ayrılmasına yol açmaktadır. Rejenere edilen elektrot tekrar 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$ çözeltisi ile optimum inkübasyon süresi olan 60 dakika boyunca inkübe edildi. Sonrasında elektrot yüzeyinde bağlanmamış halde bulunan $A\beta_{42}$ moleküllerinin uzaklaştırılması amacıyla ultra saf su ile daldırma yapılarak yıkandı ve EIS ölçümü ile biyosensör yanıtı alındı. Böylece rejenerasyon sonrası biyoalgılama elemanı olan anti-$A\beta_{42}$'nin yeniden 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$'yi bağlama kapasitesi tespit edildi. Bu işlemlere biyosensör yanıtında anlamlı bir farklılaşma oluncaya kadar devam edildi.

10 mM HCl ile rejenere edilmeden önce 60 pg/ml konsantrasyonundaki $A\beta_{42}$ proteinine ait EIS ölçümündeki Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değeri 100 olarak kabul edildi. Her rejenerasyon döngüsü sonunda alınan $A\beta_{42}$ (60 pg/ml) proteinine ait ΔRct değerlerinin ilk ölçüme bağlı olarak (%) grafiği çizildi (Şekil 4.17). Biyosensör yanıtlarına ait ΔRct değerleri Çizelge 4.10'da verilmektedir.



Şekil 4.17. $A\beta_{42}$ biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğine ait grafik

Çizelge 4.10. $A\beta_{42}$ biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğine ait ΔRct değerleri

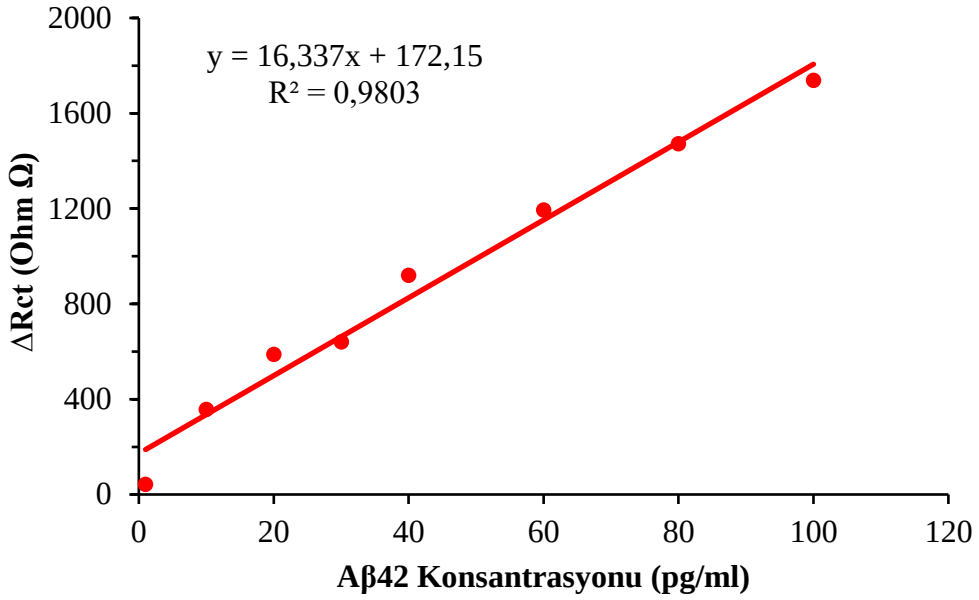
Ölçüm Sayısı	ΔRct (Ohm)	Biyosensör Yanıtı (%)	$A\beta_{42}$ konsantrasyonu (pg/ml)
1	1156	100	60 pg/ml
2	1115	96.45	60 pg/ml
3	1157	100.08	60 pg/ml
4	1157	100.08	60 pg/ml
5	1108	95.84	60 pg/ml
6	1054	91.17	60 pg/ml
7	1085	93.85	60 pg/ml

Şekil 4.17 ve Çizelge 4.10 incelendiğinde, ilk ölçüm rejenerasyon öncesi 60 pg/ml $A\beta_{42}$'ye ait olduğu için, tez kapsamında geliştirilen biyosensörün 6 kez rejenere edilebildiği görülmektedir. 6. Rejenerasyondan sonra biyosensör aktivitesi %93.85'tir. 7. Rejenerasyondan itibaren anlamlı bir biyosensör yanıtı elde edilememiştir. Bu durum 10 mM HCl ile ard arda muamele edilen elektrot yüzeyinde, GPDMMS ile oluşturulan SAMs tabakasının deforme olması ve/veya anti-$A\beta_{42}$'nin asit çözeltisinden kaynaklanan geri dönüşümsüz denatürasyonu ile açıklanabilir.

4.1.5.8. Biyosensörün Yapay Serumda $A\beta_{42}$ Analizi

Bölüm 4.1.3.1'de doğrusal tayin aralığı verilen $A\beta_{42}$ biyosensörünün gerçek kan örneklerinde analiz yapabilme kabiliyetinin incelenmesi amacıyla, 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında yapay serum çözeltilerinde porsiyonlanan $A\beta_{42}$ proteinleri ile EIS ölçümü yapıldı.

Elde edilen biyosensör yanıtları ile $A\beta_{42}$ protein çözeltirlerinin konsantrasyonları arasında standart grafik çizildi (Şekil 4.18).

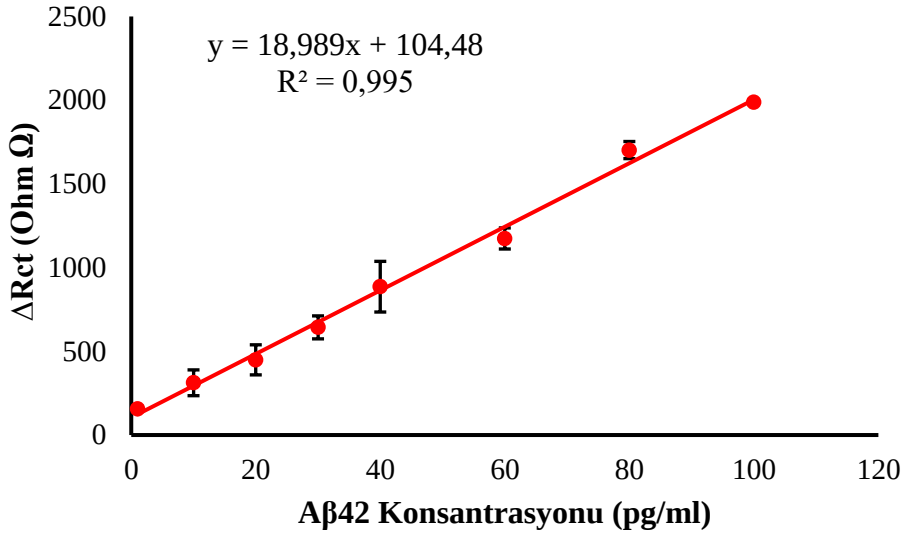


Şekil 4.18. $A\beta_{42}$ biyosensörünün yapay serumda uygulamasına ait standart grafik

Şekil 4.18'deki grafik incelendiğinde; yapay serumda $A\beta_{42}$ analizine ait standart grafiğin eğimi (m=16.337) ve doğrusallık katsayısı (R^2= 0.9803) olarak bulunmuştur. Serum replacement çözeltisinde bulunan serum albümini, transferrin, rekombinant insülin gibi biyomoleküllerin ve eklenen tuz, üre ve glukoz moleküllerinin girişim yaparak, etkin anti-$A\beta_{42}$-$A\beta_{42}$ kompleks oluşumunu etkilemediği Şekil 4.12'de verilen doğrusal tayin aralığı çalışmasına ait standart grafiğin eğim değerine (m=18.874) yakın olduğu görülmektedir. Eğim değerleri arasındaki bu farkın az olması ve doğrusallık katsayısının (R^2= 0.9803) iyi olması nedeniyle, tasarlanan $A\beta_{42}$ biyosensörünün yapay serum çözeltisinde de $A\beta_{42}$ protein analizi yapabildiği söylenebilir.

4.1.5.9. Biyosensörün İnsan Serumunda $A\beta_{42}$ Analizi

Tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensörü, kanda analiz yapabilmesi amacıyla tasarlandığı için ticari olarak satın alınan insan serumundaki biyosensör yanıtları da değerlendirildi. Bu amaç doğrultusunda insan serumu ultra saf su ile 10^6 kez seyreltildikten sonra 1-100 pg/ml konsantrasyon aralığında $A\beta_{42}$ molekülünün porsiyonlanmasında kullanıldı. $A\beta_{42}$ proteini, daha önceki çalışmalarda belirlenen optimum koşullarda hazırlanan elektrotlarla muamele edilerek EIS ölçümleri yapıldı. Şekil 4.19'da EIS ölçümleri sonucu Nyquist eğrilerinden elde edilen ΔRct değerlerinin $A\beta_{42}$ konsantrasyonuna karşı çizilen standart grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.19. $A\beta_{42}$ biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ait standart grafik

$A\beta_{42}$ biyosensörünün, Şekil 4.19'da verilen, insan serumunda uygulamasına ait grafik incelendiğinde eğiminin (m=17.885) ve doğrusallık katsayısının (R^2=0.9925) olduğu görülmektedir.

İnsan serumunda, bir önceki çalışmada kullanılan yapay serum çözeltisindeki bileşenlere ilave olarak; büyüme faktörleri, steroid hormonlar, glukokortikoidler, hücre adezyon faktörleri, lipidler, saptanabilir Ig ve mitojenlerin de var olmasına rağmen elde edilen Şekil 4.19'daki standart grafiğin eğimi Şekil 4.12'deki doğrusal tayin aralığı çalışmasına ait standart grafiğin eğimine benzerdir.

İnsan serumu uygulamasında elde edilen ΔRct değerleri Şekil 4.12'deki standart grafik denkleminde (y= 18,874x + 99,348) yerine konularak $A\beta_{42}$ proteininin ölçülen miktarları hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11'de verildi.

Çizelge 4.11. $A\beta_{42}$ biyosensörünün ticari insan serum uygulamasında ölçülen $A\beta_{42}$ miktarları

Kullanılan $A\beta_{42}$ Konsantrasyonu (pg/ml)	**ΔRct (Ohm)**	**Ölçülen $A\beta_{42}$ Konsantrasyonu (pg/ml)**	**Geri Kazanım (%)**
1	157	2.89 ± 0.71	289
10	312	10.69 ± 3.88	106.9
20	449	17.59 ± 4.51	87.95
30	643	32.23 ± 3.48	107.4
40	886	39.58 ± 7.61	98.95
60	1174	54.07 ± 3.16	90.11
80	1702	80.63 ± 2.57	100.78
100	1988	95.18 ± 0.11	95.18

İnsan serumun çözeltisinde yapılan ölçümlerde yüksek doğrusallık ve biyosensör yanıtlarının elde edilmiş olması, klinik alanda gerçek kan örneklerinde var olan biyomolekül ve diğer bileşenlerin $A\beta_{42}$ biyosensörünün çalışma kapasitesini etkilemeyeceğini göstermektedir. Böylece geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensörünün klinik araştırmalarda ölçüm yapabilme kabiliyetine sahip olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak; $A\beta_{42}$ miktar tayini için tasarladığımız $A\beta_{42}$ biyosensörü, ITO-PET elektrot ile geliştirilen ilk elektrokimyasal temelli $A\beta_{42}$ biyosensörüdür. ITO-PET elektrotlar tek kullanımlık, ucuz ve modifiye edilebilir özellikleri ile biyosensör çalışmalarında dikkat çekmektedir.

Literatürde yer alan $A\beta_{42}$ analizinde kullanılmak üzere geliştirilen diğer biyosensör sistemleri ile tez kapsamında geliştirilen biyosensörün karşılaştırması Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. $A\beta_{42}$ analizi için geliştirilen biyosensörün literatürdeki diğer biyosensörler ile karşılaştırması

Çalışma Numarası	Elektrot	Tasarım Basamakları	Biyoreseptör	Ölçüm Yöntemi	Doğrusal Tayin Aralığı	LOD-LOQ	Referans
1	Screen-printed Karbon Elektrot (SPCE)	1. Altın kaplama 2. Streptavidin immobilizasyonu 3. Kazein immobilizasyonu 3. Biotin ile İşaretlenmiş $A\beta_{42}$ 4. Anti $A\beta_{42}$- $A\beta_{42}$ çözeltisi	Biotin ile İşaretlenmiş $A\beta_{42}$	Döngüsel Voltametri (CV)	0.5-500 ng/ml	0.1 ng/mL-0.4 ng/mL	Rama, González-García & Costa-García, 2014
2	Polietilen Teraftalat (PET) Tabaka	1. Altın kaplama 2. MPA ile SAMs 3. EDC/NHS 4. Anti-$A\beta_{42}$	Anti-$A\beta_{42}$	Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)	0.0675- 0.5 µg/mL	-	Dai, Molazemhosseini & Liu, 2017
3	Screen-printed Karbon Elektrot (SPCE)	1. Altın biriktirme 2. MPA ve PEG-SH ile SAMs 3. EDS/NHS 4. Anti Aβ (12F4) 5. Aβ 6. Anti Aβ (1E11)-ALP	Anti-Aβ	Döngüsel Voltametri (CV) Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)	100 fM -5 pM	-	Diba, Kim & Lee, 2017
4	Screen-printed Karbon Elektrot (SPCE)	1. CNT biriktirme 2. CuO nanoparçacık 3. ANI - $A\beta_{42}$ elektropolimerizasyonu	$A\beta_{42}$ baskılanmış kompozit	Kare Dalga Voltametrisi (SWV)	1-66 ng/ml	LOD: 0.4 ± 0.03 pg/mL	Moreira, Rodriguez, Dutra & Sales, 2018
5	Birbirine Bağlı Zincir Şeklinde Elektrot (ICE)	1. Altın biriktirme 2. MHA ile SAMs 3. EDC/NHS 4. Anti-$A\beta_{42}$	Anti-Aβ	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	10^{-3}-10^{3} ng/ml	LOD: 100 pg/mL	Ngoc Le, Park, Chinnadayyala & Cho, 2019

Çizelge 4.12. $A\beta_{42}$ analizi için geliştirilen biyosensörün literatürdeki diğer biyosensörler ile karşılaştırması (devam)

Çalışma Numarası	Elektrot	Tasarım Basamakları	Biyoreseptör	Ölçüm Yöntemi	Doğrusal Tayin Aralığı	LOD-LOQ	Referans
6	Camsı Karbon Elektrot (GCE)	1. d-Ti3C2TX sentezi 2. . d-Ti3C2TX/MWCNTs kompozit oluşturma 3. $A\beta_{42}$ Molekülü İçeren Pirol ile polimerizasyon 4. MIP oluşturma	$A\beta_{42}$ baskılanmış kompozit malzeme	Döngüsel Voltametri (CV) Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	1-100 fg/ml	LOD: 0.3 fg/mL	Özcan, Medetalibeyoglu, Akyıldırım, Atar & Yola, 2020
7	Mikroskop Camı	1. DMOAP kaplama 2. LC film oluşumu 3. Anti-$A\beta_{42}$ 4. Sinyal gücünü arttırmak için APOE immobilizasyonu	Anti-$A\beta_{42}$	Ocean Optics Spektrometresi	1-1000 pg/ml	-	Kemiklioğlu, Tunçgövde & Özsarlak-Sözer, 2021
8	İndiyum Kalay Oksit-Polietilen Teraftalat (ITO-PET)	1. -OH biriktirme 2. GPDMMS ile SAMs 3. Anti-$A\beta_{42}$	Anti-$A\beta_{42}$	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) Döngüsel Voltametri (CV)	1-100 pg/ml	0.37 pg/ml-1.25 pg/ml	Bu Çalışma

Çizelge 4.12'de 1, 2, 3 ve 4 olarak numaralandırdığımız çalışmalarla geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensörleri ile karşılaştırıldığında; tez kapsamında geliştirilen $A\beta_{42}$ biyosensörünün LOD ve LOQ değerlerinin daha düşük olduğu ve buna bağlı olarak ölçüm hassaslığının daha yüksek olduğu söylenebilir. Çizelgede 5, 6, 7 ve 8 olarak numaralandırdığımız çalışmalardaki $A\beta_{42}$ biyosensörlerinin, doğrusal çalışma aralıkları ve LOD-LOQ değerlerinin daha düşük konsantrasyon aralığında olduğu görülmektedir. Ancak geliştirdiğimiz biyosensörün doğrusal tayin aralığı 1-100 pg/ml olup, Alzheimer hastalarının kan plazmasında bulunan $A\beta_{42}$ konsantrasyonu aralığı ile uyumludur (Kemiklioğlu vd., 2021). Bu nedenle bu biyosensörün gerçek numunelerde $A\beta_{42}$ analizi öncesinde ön hazırlık işlemlerine ihtiyaç duymaksızın $A\beta_{42}$ miktar tayini yapabilme kabiliyetine sahip olduğu da söylenebilir. Daha düşük doğrusal tayin aralığı ve LOD değerlerine sahip 5, 6, 7 ve 8 olarak numaralandırılmış $A\beta_{42}$ biyosensörleri ise; analiz öncesinde seyreltme gibi ön hazırlık işlemleri gerektirebilir.

Çizelge 4.12'de verilen $A\beta_{42}$ miktar analizi için geliştirilen biyosensörlerin çalışma elektrotları karşılaştırılacak olursa; bu çalışmada kullanılan ITO-PET elektrotların maliyetinin, 1, 3, 4 ve 6 numaralı çalışmalardaki elektrotların maliyetinden daha düşük olduğu söylenebilir. 2, 5 ve 7 numaralı çalışmalarda kullanılan elektrotlar ise belirlenen yüzeylerde araştırmacılar tarafından geliştirildikleri için maliyet karşılaştırması yapılamamaktadır.

Çizelge 4.12'de yer alan $A\beta_{42}$ biyosensörlerinin tasarım basamakları incelenecek olursa; tez kapsamında tasarlanan biyosensörünün literatürdeki tüm çalışmalardan daha az sayıda hazırlık adımı içerdiği görülmektedir. Bu durum; geliştirilen biyosensörün üretim sürecinin daha az zahmetli, daha düşük maliyetli ve daha kısa zamanda üretilebilen bir biyosensör olduğunu göstermektedir.

Ayrıca bu tez kapsamında geliştirilen biyosensör; literatürde $A\beta_{42}$ miktar analizi için yapılan biyosensör çalışmaları arasında, antikor-antijen immünokompleks oluşumunun kinetik davranışının izlenebildiği SFI tekniğininin kullanıldığı ilk biyosensör çalışmasıdır.

Hazırlanan bu biyosensör; geleneksel analiz yöntemleri ve ELISA kitleri ile karşılaştırıldığında ise, yetişmiş teknik personel gereksinimi olmaksızın çok daha kısa sürede $A\beta_{42}$ analizine imkân vermektedir.

Bu çalışmada $A\beta_{42}$ analizi için hazırlanan tek bir biyosensörün maliyetinin yaklaşık olarak 1.22 euro olduğu, 6 kez rejenere edilebilme özelliği dikkate alınacak olursa maliyetin 0.20 euro'ya düşebileceği söylenebilir.

Bu biyosensör tek kullanımlık ITO-PET elektrotlar ile hazırlandığı için yapılacak daha ileri çalışmalar ile minyatürize edilebilme potansiyeli de taşımaktadır. Böylece Alzheimer hastalığının erken evrede teşhisinde, uzman gereksinimi olmaksızın sağlık kuruluşlarında kullanılma veya kişilerin kendileri için kolaylıkla kullanabileceği analiz cihazlarına dönüştürülebilme imkânı sağlamaktadır.

$A\beta_{42}$ biyosensörü ile yapılan elektrokimyasal ölçümler ve elektrokimyasal hücre ile elektrot entegrasyonu sadece çalışma standartlarına uygun olup, endüstriyel standartlarda değildir. Daha ileri çalışmalarla bu sorunun aşılması, biyosensör sisteminin daha ileri boyutlara taşınmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca yapay serum ve ticari olarak satın alınan insan serumunda yapılan $A\beta_{42}$ analizleri sonucunda biyosensörün gerçek kan örneklerinde uygulanabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiş olsa da gerekli etik izinler alınarak hasta ve sağlıklı gruplara ait kan örneklerinde yapılacak çalışmaların ve bu çalışmalar doğrultusunda elde edilecek çapraz istatistiki verilerin değerlendirilmesi ile klinik alanda kullanılabilirliği daha geniş kapsamlı olarak değerlendirilebilir. Ek olarak klinik alanda uygulanabilirliğinin incelenmesi amacıyla gerekli etik izinlerin alınması halinde beyin omurilik sıvısında da hazırlanan biyosensörün $A\beta_{42}$ miktar tayini kapasitesi belirlenebilir.

KAYNAKLAR

.

Alsalahat, I., Al-Majdoub, Z. M., Taha, M. O., Barber, J., Aojula, H., Hodson, N. & Freeman, S. (2021). Inhibition of aggregation of amyloid-β through covalent modification with benzylpenicillin; potential relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *26*, 100943, 1-11.

Altuna-Azkargorta, M., Mendioroz-Iriarte, M. (2021). Blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Neurología*, *36*(9), 30091, 704-710.

Arco, J. E., Ramírez, J., Górriz, J. M. & Ruz, M. (2021). Data fusion based on Searchlight analysis for the prediction of Alzheimer's disease. *Expert Systems with Applications, 185*, 115549, 1-13.

Barreiros dos Santos, M., Azevedo, S., Agusil, J. P., Prieto-Simón, B., Sporer, C., Torrents, E., Juárez, A., Teixeira, V. & Samitier, J. (2015). Label-free ITO-based immunosensor for the detection of very low concentrations of pathogenic bacteria. *Bioelectrochemistry*, *101*, 146-152.

Benavente, J. (2005). Electrochemical impedance spectroscopy as a tool for electrical and structural characterizations of membranes in contact with electrolyte solutions. *Recent Advances in Multidisciplinary Applied Physics*, 463–471.

Boccafoschi, F., Fusaro, L. & Cannas, M. (2018). Immobilization of peptides on cardiovascular stent. *Functionalised Cardiovascular Stents*, 305-318.

Brazaca, L. C., Sampaio, I., Zucolotto, V. & Janegitz, B. C. (2020). Applications of biosensors in Alzheimer's disease diagnosis. *Talanta, 210,* 120644, 1-12.

Brunier, A. & Muchnik, A. (2020). WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019. 3 Kasım 2021 tarihinde https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019 adresinden erişildi.

Brehm, M., Scheiger, J. M., Welle, A. & Levkin, P. A. (2020). Reversible surface wettability by silanization. *Advanced Materials Interfaces*, *7*(12), 1902134, 1-8.

Bulut, Y. (2011 Mayıs). *Biyosensörlerin tanımı ve biyosensörlere genel bakış.* 6. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumunda sunulan bildiri, Fırat Üniversitesi, Elazığ. Erişim adresi: http://web.firat.edu.tr/iats/cd/subjects/automotive.html

Cammack, R. (Ed.) (2007). *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology.* Oxford University Press: Oxford.

Carneiro, P., Morais, S. & do Carmo Pereira, M. (2020). Biosensors on the road to early diagnostic and surveillance of Alzheimer's disease. *Talanta*, *211*, 120700, 1-15.

Chaib, F. (2012). Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored. 3 Kasım 2021 tarihinde https://www.who.int/news/item/11-04-2012-dementia-cases-set-to-triple-by-2050-but-still-largely-ignored adresinden erişildi.

Chang, B. Y., Park & S. M. (2010). Electrochemical impedance spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *3*, 207-229.

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, *14*, 450-464.

Chidambaram, H., Chinnathambi, S. (2020). G-Protein coupled receptors and Tau-different roles in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *438*, 198–214.

Clark, L. C., Lyons, C. (1962). Electrode systems for contınuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *31*(102), 29-45.

Colvin, M. T., Silvers, R., Ni, Q. Z., Can, T. V., Sergeyev, I., Rosay, M., Donovan, K. J., Michael, B., Wall, J., Linse, S. & Griffin, R. G. (2016). Atomic resolution structure

of monomorphic Aβ42 amyloid fibrils. *Journal of the American Chemical Society, 138*(30), 9663–9674.

Çakır, M. C., Çalışkan, D., Bütün, B. & Özbay, E. (2016). Planar indium tin oxide heater for improved thermal distribution for metal oxide micromachined gas sensors. *Sensors, 16*(10), 1612, 1-7.

Dai, Y., Molazemhosseini, A. & Liu, C. C. (2017). In vitro quantified determination of β-amyloid 42 peptides, a biomarker of neuro-degenerative disorders, in PBS and human serum using a simple, cost-effective thin gold film biosensor. *Biosensors, 7*(3), 29, 1-11.

Demirbakan, B., Sezgintürk, M. K. (2017). A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1. *Talanta, 169*, 163–169.

Demirbakan, B., Sezgintürk, M. K. (2019). A novel electrochemical immunosensor based on disposable ITO-PET electrodes for sensitive detection of PAK 2 antigen. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 848*, 113304, 1-9.

Diba, F. S., Kim, S. & Lee, H. J. (2017). Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1–42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface. *Catalysis Today, 295*, 41–47.

Fadeev, A. Y., Helmy, R. & Marcinko, S. (2002). Self-assembled monolayers of organosilicon hydrides supported on titanium, zirconium, and hafnium dioxides. *Langmuir, 18*(20), 7521–7529.

Fernández-Sánchez, C., McNeil, C. J. & Rawson, K. (2005). Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. *Trends in Analytical Chemistry, 24*(1), 37–48.

Food and Drug Administration. (2021). 3 Kasım 2021 tarihinde https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/aducanumab-marketed-aduhelm-information adresinden erişildi.

Forget, A., Tucker, R. T., Brett, M. J., Limoges, B. & Balland, V. (2015). Tuning the reactivity of nanostructured indium tin oxide electrodes toward chemisorption. *Chemical Communications, 51*(32), 6944-6947.

Götz, J., Streffer, J. R., David, D., Schild, A., Hoerndli, F., Pennanen, L., Kurosinski, P. & Chen, F. (2004). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: Histopathology, behavior and therapy. *Molecular Psychiatry*, *9*, 664–683.

Godoy-Gallardo, M., Mas-Moruno, C., Yu, K., Manero, J. M., Gil, F. J., Kizhakkedathu, J. N. & Rodriguez, D. (2015). Antibacterial properties of hLf1-11 peptide onto titanium surfaces: A comparison study between silanization and surface initiated polymerization. *Biomacromolecules*, *16*(2), 483–496.

Gooding, J. J., Zhu, Y. (2014). Modifying porous silicon with self-assembled monolayers for biomedical applications. *Porous Silicon for Biomedical Applications*, 81–103.

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors*, *8*(3), 1400-1458.

Hasan, M. R., Ahommed, M. S., Daizy, M., Bacchu, M. S., Ali, M. R., Al-Mamun, M. R., Saad Aly, M. A., Khan, M. Z. H. & Hossain, S. I. (2021). Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics: X*, *8*, 100075, 1-11.

Hermanson, G. T. (2008). *Bioconjugate techniques.* Amsterdam: Elsevier

Higson, S. (Ed.) (2012). *Electrochemical biosensors for medical applications.* Cambridge: Woodhead.

Islam, M. N., Channon, R. B. (2020). Electrochemical sensors. *Bioengineering Innovative Solutions for Cancer*, 47–71.

Keleş, E., Özalevli, S. (2018). Alzheimer hastalığı ve tedavi yaklaşımları. *İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, *3*(2), 39-42.

Kemiklioglu, E., Tuncgovde, E. B. & Ozsarlak-Sozer, G. (2021). Development of liquid crystal biosensor for the detection of amyloid beta-42 levels associated with Alzheimer's disease. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *132*(1), 88–94.

Kuralay, F. (2019). Nanomaterials-based enzyme biosensors for electrochemical applications: Recent trends and future prospects. *New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis*, 381–408.

Kurnaz Yetim, N., Hasanoğlu Özkan, E. & Sarı, N. (2019). Polimerik nanoküreler üzerine enzim immobilizasyonu ve optimizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, *14*, 97-104.

Lasia, A. (2014). *Electrochemical impedance spectroscopy and its applications.* New York: Springer.

Lin, D., Harris, K. D., Chan, N. W. C. & Jemere, A. B. (2018). Nanostructured indium tin oxide electrodes immobilized with toll-like receptor proteins for label-free electrochemical detection of pathogen markers. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *257*, 324-330.

Lisdat, F., Schäfer, D. (2008). The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *391*(5), 1555-15567.

Ma, X., Zhuo, Z., Wei, L., Ma, Z., Li, Z. & Li, H. (2020). Altered temporal organization of brief spontaneous brain activities in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *425*, 1–11.

Malhotra, B. D. & Pandey, C. M. (2017). *Biosensors: Fundamentals and applications.* Shrewsbury: Smithers Rapra.

Marr, R. A. (2016). The amyloid β precursor protein and cognitive function in Alzheimer's disease. *Genes, Environment and Alzheimer's Disease*, 97–133.

Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, *430*, 631–639.

Mehmood, A., Yang, S., Feng, Z., Wang, M., Ahmad, A. S., Khan, R., Maqsood, M. & Yaqub, M. (2021). A transfer learning approach for early diagnosis of Alzheimer's disease on MRI images. *Neuroscience*, *460*, 43–52.

Mehta, P. D. (2007). Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *4*, 359-363.

Mitsubori, M., Takeda, K., Nagashima, S., Ishido, S., Matsuoka, M., Inatome, R. & Yanagi, S. (2021). Identification of highest neurotoxic amyloid-β plaque type showing reduced contact with astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *549*, 67–74.

Mofrad, S. A., Lundervold, A. & Lundervold, A. S. (2021). A predictive framework based on brain volume trajectories enabling early detection of Alzheimer's disease. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, *90*, 101910, 1-11.

Moreira, F. T. C., Rodriguez, B. A. G., Dutra, R. A. F. & Sales, M. G. F. (2018). Redox probe-free readings of a β-amyloid-42 plastic antibody sensory material assembled on copper@carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *264*, 1–9.

Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., Thirumalai, D. & Palaniappan, B. (2020). Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *International Journal of Biological Macromolecules*, *163*, 1599–1617.

Ngoc Le, H. T., Park, J., Chinnadayyala, S. R. & Cho, S. (2019). Sensitive electrochemical detection of amyloid beta peptide in human serum using an interdigitated chain-shaped electrode. *Biosensors and Bioelectronics, 144*, 111694, 1-6.

Nisbet, R. M., Polanco, J. C., Ittner, L. M. & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid-β. *Acta Neuropathologica*, *129*, 207–220.

Özcan, B., Demirbakan, B., Yeşiller, G. & Sezgintürk, M. K. (2014). Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: Single frequency impedance analysis for biosensing systems. *Talanta*, *125*, 7–13.

Özcan, B., Sezgintürk, M. K. (2017). A novel label free immunosensor based on single-use ITO-PET electrodes for detection MAGE1 protein. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *792*, 31-38.

Özcan, B., Sezgintürk, M. K. (2019). Highly sensitive and cost-effective ITO-based immunosensor system modified by 11-CUTMS: Analysis of SOX2 protein in real human serum. *International Journal of Biological Macromolecules, 130*, 245-252.

Özcan, N., Medetalibeyoğlu, H., Akyıldırım, O., Atar, N. & Yola, M. L. (2020). Electrochemical detection of amyloid-β protein by delaminated titanium carbide

MXene/multi-walled carbon nanotubes composite with molecularly imprinted polymer. *Materials Today Communications*, *23*, 101097, 1-9.

Özkay, Ü. D., Öztürk, Y. & Can, Ö. D. (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, *18*(1), 35-42.

Öztürk, G. B., Karan, M. A. (2009). Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim Derigisi*, *22*(3), 36-45.

Park, G., Nhan, H. S., Tyan, S. H., Kawakatsu, Y., Zhang, C., Navarro, M. & Koo, E. H. (2020). Caspase activation and caspase-mediated cleavage of APP is associated with amyloid β-protein-induced synapse loss in Alzheimer's disease. *Cell Reports*, *31*(13), 107839, 1-18.

Rama, E. C., González-García, M. B. & Costa-García, A. (2014). Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructurated screen-printed carbon electrodes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *201*, 567-571.

Roher, A. E., Esh, C. L., Kokjohn, T. A., Castaño, E. M., Van Vickle, G. D., Kalback, W. M., Patton, R. L., Luehrs, D. C., Daugs, I. D., Kuo, Y., Emmerling, M. R., Soares, H., Quinn, J. F., Kaye, J., Connor, D. J., Silverberg, N. B., Adler, C. H., Seward, J. D., Beach, T. G. & Sabbagh, M. N. (2009). Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *5*, 18-19.

Sandhyarani, N. (2019). Surface modification methods for electrochemical biosensors. *Electrochemical Biosensors*, 45–75.

Selekler, K. (2010). Alois Alzheimer ve Alzheimer hastalığı. *Geriatri Dergisi*, *13*(3), 9-14.

Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M. S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R. H., Arnold, H. M. & Sandrock, A. (2016). The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, *537*, 50-56.

Sezgintürk, M. K. (2020). Introduction to commercial biosensors. *Commercial Biosensors and Their Applications*, 1–28.

Shahdost-fard, F., Roushani, M. (2017). Designing an ultra-sensitive aptasensor based on an AgNPs/thiol-GQD nanocomposite for TNT detection at femtomolar levels using the electrochemical oxidation of Rutin as a redox probe. *Biosensors and Bioelectronics*, *87*, 724–731.

Shaw, L. M., Hansson, O., Manuilova, E., Masters, C. L., Doecke, J. D., Li., Q., Rutz, S., Widmann, M., Leinenbach, A. & Blennow, K. (2019). Method comparison study of the Elecsys® β-Amyloid (1–42) CSF assay versus comparator assays and LC-MS/MS. *Clinical Biochemistry*, *72*, 7-14.

Shrivastava, A., Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, *2*(1), 21-25.

Singal, S., Srivastava, A. K., Kotnala, R. K. & Rajesh. (2018). Single-frequency impedance analysis of biofunctionalized dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles-modified screen-printed electrode for biomolecular detection. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *22*, 2649–2657.

Song, F., Poljak, A., Valenzuela, M., Mayeux, R., Smythe, G. A. & Sachdev, P. S. (2011). Meta-analysis of plasma amyloid-β levels in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *26*(2), 365–375.

Stević, Z., Vujasinović, M. R. & Radunović, M. (2009). Estimation of parameters obtained by electrochemical impedance spectroscopy on systems containing high capacities. *Sensors*, *9*(9), 7365-7373.

Tamura, H., Mita, K., Tanaka, A. & Ito, M. (2001). Mechanism of hydroxylation of metal oxide surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *243*, 202-207.

Tan, J. Z. A., Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1861*(4), 697–712.

Thomas, F. G., Henze, G. (2001). *Introduction to voltammetric analysis: Theory and practice.* Clayton: Csiro.

Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(1–2), 121–131.

Turner, A.P.F., Karube, I. & Wilson, G.S. (1987). *Biosensors, fundamentals and applications.* Oxford University Press: Oxford.

Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *6*(62), 71–80.

Tycko, R. (2016). Structure of aggregates revealed. *Nature*, *537*, 492–493.

Uhrovčík, J. (2014). Strategy for determination of LOD and LOQ values – some basic aspects. *Talanta*, *119*, 178-180.

van Oostveen, W. M., de Lange, E. C. M. (2021). Imaging techniques in alzheimer's disease: A review of applications in early diagnosis and longitudinal monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 2110, 1-34.

Wang, C., Wang, H.-I., Tang, W.-T., Luo, C.-W., Kobayashi, T. & Leu, J. (2011). Superior local conductivity in self-organized nanodots on indium-tin-oxide films induced by femtosecond laser pulses. *Optics Express*, *19*(24), 24286-24297.

Wang, Y., Xu, H., Zhang, J. & Li, G. (2008). Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, *8*(4), 2043-2081.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S.-Y. & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(5), 1858-1862.

Xia, W., Yang, T., Shankar, G., Smith, I. M., Shen, Y., Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. (2009). A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring β-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *66*(2), 190-199.

Xing, Y., Xia, N. (2015). Biosensors for the determination of amyloid-beta peptides and their aggregates with application to Alzheimer's disease. *Analytical Letters*, *48*(6), 879-893.

Xiong, F., Ge, W. & Ma, C. (2019). Quantitative proteomics reveals distinct composition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia, 15*(3), 429–440.

Yu, H., Wu, J. (2021). Amyloid-β: A double agent in Alzheimer's disease? *Biomedicine & Pharmacotherapy, 139,* 111575, 1-9.

Zhang, D. W., Papaioannou, N., David, N. M., Luo, H., Gao, H., Tanase, L. C., Degousée, T., Samorì, P., Sapelkin, A., Fenwick, O., Titirici, M. M. & Krause, S. (2018). Photoelectrochemical response of carbon dots (CDs) derived from chitosan and their use in electrochemical imaging. *Materials Horizons, 5*, 423-428.

Zhang, S., Wright, G. & Yang, Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics, 15*(5–6), 273–282.

Zhao, J., Deng, Y., Jiang, Z. & Qing, H. (2016). G protein-coupled receptors (GPCRs) in Alzheimer's disease: A focus on BACE1 related GPCRs. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*(58), 1-15.

ÖZGEÇMİŞ

23.10.1991 yılında Edirne'de doğdum. İlköğrenimimi Yüksel Yeşil İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise eğitimimi Edirne Lisesi'nde, 2009 yılında tamamladım. 2010 yılında Marmara Üniversitesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladım. 2017 yılında mezun oldum. 2018 yılının Eylül ayında Trakya Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalının yüksek lisans programına başladım ve halen devam etmekteyim.

Dilek Nur ALTAY