T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POTANSİYEL OBEZİTE BİYOBELİRTEÇLERİNİN TAYİNİ İÇİN İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ALP YÜCEL

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

EDİRNE-2023

Alp YÜCEL'in hazırladığı "**POTANSİYEL OBEZİTE BİYOBELİRTEÇLERİNİN TAYİNİ İÇİN İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Kimya** Anabilim Dalında bir **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:	İmza
Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL	……
Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR	……
Prof. Dr. Figen BOZ	……
Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN	……
Dr. Öğr. Üyesi Engin ASAV	……

Tez

Savunma Tarihi: 17/01/2023

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA 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.

17/01/2023

Alp YÜCEL

Doktora Tezi

Potansiyel Obezite Biyobelirteçlerinin Tayini İçin İmpedimetrik Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Obezite, vücutta yağın aşırı miktarda birikmesi, depolanması ile karakterize edilen ve beklenen yaşam süresinin azalmasına, sağlık sorunlarının artmasına yol açan bir durum olup, içinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Obezite, inme, osteoartrit, uyku apnesi gibi kronik hastalıklar, bazı kanserler ve inflamasyona dayalı patolojilerin yanı sıra diyabet, hipertansiyon ve kalp-damar hastalıkları gibi metabolik bozuklukların gelişimini de kolaylaştırmaktadır. İnsan vücudundaki yağ doku, yağ dokusunun fonksiyonel durumunu beyne ve diğer hedef organlara sinyal gönderen peptitler olan çok sayıda adipokin salgılayan önemli bir endokrin fonksiyona sahiptir. Adipokinler pek çok hastalığın erken teşhisinde önemli biyobelirteçlerdir.

Bu tez kapsamında, obezite biyobelirteçlerinden Chemerin ve Omentin'in tayini için iki adet impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Omentin biyosensörü için, yüzey baskılı altın elektrotların yüzeyinde 12-Merkaptododekanoik asit (12-MDDA) ile kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM'ler) meydana getirilmiş ve Omentin proteinine özgü antikorun immobilizasyonu yapılmıştır. Chemerin biyosensörü için, üç boyutlu yazıcı ile fotopolimer reçine temelli parçalar basılıp yüzeyleri altın kaplanarak tek kullanımlık elektrotlar üretilmiştir. Bu elektrotların yüzeylerinde 12-MDDA ile SAM'ler meydana getirilmiş ve Chemerin proteinine özgü antikorun immobilizasyonu yapılmıştır. Her iki biyosensörün de immobilizasyon aşamalarına ait optimum parametrelerin belirlenmesinde ve analitik karakterizasyon çalışmalarında, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri tekniği kullanılmıştır. Biyosensörlere ait yüzey

karakterizasyonu çalışmaları, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDS) ve fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapılmıştır.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 166

Anahtar Kelimeler : Obezite, Adipokinler, Chemerin, Omentin, Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, İmpedimetrik biyosensör

Ph.D. Thesis

Development of Impedimetric Biosensor Systems for Detection of Potential Obesity Biomarkers

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

Obesity is a condition characterized by excessive accumulation and storage of fat in the body, leading to a decrease in life expectancy and an increase in health problems, and is one of the most important public health problems of the current century. Obesity facilitates the development of stroke, osteoarthritis, chronic diseases such as sleep apnea, some cancers and pathologies based on inflammation, as well as metabolic disorders such as diabetes, hypertension and cardiovascular diseases. Adipose tissue in the human body has an important endocrine function, secreting a large number of adipokines, which are peptides that signal the functional state of adipose tissue to the brain and other target organs. Adipokines are important biomarkers in the early diagnosis of many diseases.

In this thesis, two impedimetric biosensors have been developed for the determination of obesity biomarkers Chemerin and Omentin. For the Omentin biosensor, self-assembled monolayers (SAMs) were formed with 12-Mercaptododecanoic acid (12-MDDA) on the surface of the screen printed gold electrodes, and the Omentin protein-specific antibody was immobilized. For the Chemerin biosensor, disposable electrodes were produced by printing photopolymer resin-based parts with a three-dimensional printer and coating their surfaces with gold. SAMs were formed with 12-MDDA on the surfaces of these electrodes and Chemerin protein-specific antibody were immobilized. Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry technique were used in the determination of the optimum parameters of the immobilization stages of both biosensors and in analytical characterization studies. Surface characterization studies of

biosensors were performed using scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS), and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Year : 2023

Number of Pages : 166

Keywords : Obesity, Adipokines, Chemerin, Omentin, Electrochemical impedance spectroscopy, Impedimetric biosensor

TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans, doktora eğitimim ve çalışma hayatım süresince, hocam, akıl hocam, danışmanım, çalışma arkadaşım, müdürüm, yöneticim ve hepsinden önemlisi ağabeyim Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a, bana vermiş olduğu emeği, benden esirgemediği bilgi ve tecrübeleri, bana karşı göstermiş olduğu yüce sabrı için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarımda ve başım her sıkıştığında, benden yardımlarını esirgemeyen, bana yol gösteren ve özellikle tez çalışmamın başlangıcında beni motive ederek bana özgüven aşılayan değerli hocam Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda verdiği destekten dolayı Dr. Öğr. Üyesi İrem ÇETİNKAYA'ya teşekkür ederim.

Birlikte TÜTAGEM'de geçirdiğimiz süre boyunca, tez çalışmalarımda bana destek olan Prof. Dr. Şaban AKTAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Ufuk BAĞCI'ya sabırlarından ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım öncesinde ve sonrasında, bana gösterdikleri/gösterecekleri hoşgörüleri ve her yardıma ihtiyaç duyduğumda yanımda oldukları/olacakları için TÜTAGEM'de bulunan bütün çalışma arkadaşlarıma çok içten teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında arkamda duran, maddi manevi beni hiçbir şeyden eksik hissettirmeyen, her telefon konuşmamızda üzerine basa basa "oğlum sen bunu da başarırsın, biz sana inanıyoruz" diyerek bana kimsenin olmadığı kadar destek olan annemin ve babamın ellerinden öper, sonsuz minnetlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TÜBAP 2019/256 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

TEŞEKKÜR ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xviii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xxii**

BÖLÜM 1 ..... **1**

GİRİŞ **1**

BÖLÜM 2 ..... **4**

KURAMSAL BİLGİLER **4**

2.1. Obezite 4

2.1.1. Obezite biyobelirteçleri 7

2.1.1.1. Adipokinler 8

2.1.1.2. Chemerin 10

2.1.1.3. Omentin 13

2.1.2. Obezite teşhisinde kullanılan yöntemler 16

2.1.3. Kanda bulunan potansiyel obezite biyobelirteçlerinin tayin yöntemleri 18

2.1.3.1. ELISA yöntemi 18

2.1.3.2. İmmünosensörler 20

2.2. Biyosensörler 22
2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 25
2.2.2. Elektrokimyasal yöntemler 30
2.2.2.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) 30
2.2.2.2. Tek nokta frekansta impedans spektroskopisi (SFI) 34
2.2.2.3. Döngüsel voltametri (CV) 34
2.3. Biyosensör oluşturmada kullanılan immobilizasyon yöntemleri 36
2.3.1. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) 37
2.3.1.1. SAM oluşumunda merkapto karboksilik asitlerin kullanımı 38
2.3.1.2. EDC/NHS ile uç grupların aktivasyonu 39
BÖLÜM 3 41
MATERYAL ve YÖNTEM 41
3.1. Materyal 41
3.1.1. Biyosensör tasarımında kullanılan kimyasallar ve malzemeler 41
3.1.1.1. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışları 42
3.1.2. Biyosensör tasarımında kullanılan cihazlar 43
3.1.3. Biyosensör tasarımında kullanılan elektrotlar 44
3.1.3.1. Yüzey baskılı elektrotlar (Screen printed electrode, SPE) 44
3.1.3.2. Üç boyutlu yazıcı ile üretilmiş altın elektrotlar (3D-printed gold electrode, 3DPGE) 45
3.1.4. Elektrokimyasal ölçümlerin parametreleri 46
3.1.5. Nyquist eğrilerinden yük transfer dirençlerinin (ΔRct) hesaplanması 49
3.2. Yöntem 50
3.2.1. Omentin biyosensörünün tasarım kimyası 50
3.2.2. Omentin biyosensörünün tasarımına ait optimizasyon çalışmaları 51

3.2.2.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu..... 53
3.2.2.2. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonu..... 54
3.2.2.3. Omentin'in inkübasyon süresinin optimizasyonu..... 55
3.2.2.4. BSA konsantrasyonunun optimizasyonu 56
3.2.3. Omentin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmaları 58
3.2.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı 58
3.2.3.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları 58
3.2.3.3. Omentin biyosensörünün yapay serum analizi 59
3.2.3.4. Omentin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu..... 59
3.2.3.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 59
3.2.3.4.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDS)..... 60
3.2.3.4.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi 60
3.2.3.4.4. Omentin biyosensörünün yüzey alanına ait hesaplamalar 60
3.2.4. Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretimi 61
3.2.4.1. Üç boyutlu yazıcı ile uygun çalışma elektrotu tasarımının belirlenmesi62
3.2.4.2. 3DPGE tasarımındaki modifikasyonlar 63
3.2.4.3. Üç boyutlu yazıcı ile oluşturulan bileşenlerin altın kaplama çalışmaları 63
3.2.4.4. 3DPGE'lerin üç boyutlu yazıcı üzerinde farklı açılarda basılması..... 64
3.2.5. Chemerin biyosensörünün tasarım kimyası..... 65
3.2.6. Chemerin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmaları 68
3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı 68
3.2.6.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları 68
3.2.6.3. Chemerin biyosensörünün insan serumu analizi..... 69
3.2.6.4. Tek nokta frekansta impedans analizi 69

3.2.6.5. Chemerin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu 69
3.2.6.5.1. Taramalı elektron mikroskobu 70
3.2.6.5.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi 70
3.2.6.5.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi 70
BÖLÜM 4 71
SONUÇLAR ve TARTIŞMA 71
4.1. Omentin Biyosensörüne Ait Deneysel Sonuçlar 71
4.1.1. Omentin biyosensörünün optimizasyonuna ait deneysel sonuçlar 74
4.1.1.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu 74
4.1.1.2. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonu 76
4.1.1.3. Omentin'in inkübasyon süresinin optimizasyonu 78
4.1.1.4. BSA konsantrasyonunun optimizasyonu 79
4.1.2. Omentin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmalarına ait deneysel sonuçlar 81
4.1.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı 82
4.1.2.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları 84
4.1.2.3. Omentin biyosensörünün yapay serum analizi 86
4.1.2.4. Omentin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu 87
4.1.2.4.1. Taramalı elektron mikroskobu 87
4.1.2.4.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi 89
4.1.2.4.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi 90
4.1.2.4.4. Omentin biyosensörünün yüzey alanına ait hesaplamalar 91
4.2. Chemerin Biyosensörüne Ait Deneysel Sonuçlar 93
4.2.1. Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretimi 95
4.2.1.1. Üç boyutlu yazıcı ile uygun çalışma elektrotu tasarımının belirlenmesi 96

4.2.1.2. 3DPGE tasarımındaki modifikasyonlar 97
4.2.1.3. Üç boyutlu yazıcı ile oluşturulan bileşenlerin altın kaplama çalışmaları 103
4.2.1.4. 3DPGE'lerin üç boyutlu yazıcı üzerinde farklı açılarda basılması 107
4.2.2. Chemerin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmaları 111
4.2.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı 111
4.2.2.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları 113
4.2.2.3. Chemerin biyosensörünün insan serumu analizi 115
4.2.2.4. Tek nokta frekansta impedans analizi 116
4.2.2.5. Chemerin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu 117
4.2.2.5.1. Taramalı elektron mikroskobu 117
4.2.2.5.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi 119
4.2.2.5.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi 120
KAYNAKLAR 124
ÖZGEÇMİŞ 143

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

12-MDDA	: 12-Merkaptododekanoik asit
3DPGE	: Üç boyutlu yazıcı ile basılmış altın elektrot
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
A-FABP4	: Adiposit yağ asidi bağlayıcı protein
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
cAMP	: Siklik AMP
AMPK	: AMP ile aktive edilmiş protein kinaz
ASP	: Açilasyon uyarıcı protein
BKO	: Bel-Kalça oranı
BSA	: Sığır serum albümini
CCRL2	: Kemokin (C-C motif) reseptör tipi 2
CMKLR1	: Kemokin tipi reseptör 1
CRP	: C-reaktif protein
CTRP	: C1q/TNF ile ilişkili proteinler
CV	: Döngüsel voltametri
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDS	: Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi

EİS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ELISA	: Enzim-bağlı immünosorbent testi
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ERK	: Hücre dışı düzenlenmiş protein kinazların
FB1	: Fumonisin B1
FTIR	: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
GPR1	: G protein eşlikli reseptör 1
HLA	: İnsan lökosit antijeni
IL-6	: İnterlökin-6
ISFET	: İyon duyarlı alan etkili transistör
JNK	: C-Jun N-terminal kinaz
LCN2	: Lipokalin 2
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti
LSV	: Lineer Sweep Voltametrisi
NHS	: N-hidroksisüksinimid
PTH	: Paratiroid hormonu
RACK1	: Aktive olmuş C kinaz 1 reseptörü
Rct	: Yük transfer direnci
RBP-4	: Retinol bağlayıcı protein-4
SAM	: Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SPR	: Yüzey plazmon rezonansı
SFI	: Tek nokta frekansta impedans spektroskopisi
SiNW-FET	: Silikon nanotel alan etkili transistör

SPE	: Yüzey baskılı elektrot
THz-TDS	: Terahertz zaman-alan spektroskopisi
TIG2	: Tazaroten-indüklü gen 2
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-α
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VKİ	: Vücut kitle indeksi
Vtg	: Vitellogenin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PubMed üzerinde başlığı içerisinde “obezite” terimi geçen makale sayısının yıllara göre dağılımı 5

Şekil 2.2. Omentin’e ait üç boyutlu yapı 13

Şekil 2.3. Omentin’in hücre içi sinyal iletim yolları 15

Şekil 2.4. VKİ’nin boy ve kiloya bağlı değişimini gösteren grafik 17

Şekil 2.5 Bir biyosensörün şematik diyagramı 24

Şekil 2.6 Biyosensörlerin sınıflandırılması 25

Şekil 2.7. Bir impedimetrik biyosensöre ait örnek gösterim 28

Şekil 2.8. Randles eşdeğer devre modeli 31

Şekil 2.9. Randles devresinden ortaya çıkan Nyquist grafiği 33

Şekil 2.10. Basit bir elektrokimyasal hücrenin impedans davranışını tanımlayan Bode Grafiği 34

Şekil 2.11. Döngüsel voltamogram örneği 35

Şekil 2.12. Sık kullanılan immobilizasyon teknikleri 36

Şekil 2.13. SAM'lerin altın yüzey üzerinde oluşumu 39

Şekil 2.14. EDC-NHS ile karboksilat moleküllerinin reaksiyon mekanizması 40

Şekil 3.1. Dropsense 250 AT yüzey baskılı elektrot 45

Şekil 3.2. Üç boyutlu yazıcı ile üretilmiş altın elektrotlar 46

Şekil 3.3. Omentin biyosensörüne ait çalışma hücresi 47

Şekil 3.4. Chemerin biyosensörüne ait çalışma hücresi 48

Şekil 3.5. Gamry Echem Analyst yazılımı ile impedans hesaplama..... 49

Şekil 3.6. Omentin biyosensörünün tasarım stratejisi..... 51

Şekil 3.7 Formlabs 3+ üç boyutlu yazıcı..... 62

Şekil 3.8 Agar Sputter Coater altın kaplama cihazı..... 64

Şekil 3.9. Chemerin biyosensörünün tasarım stratejisi..... 66

Şekil 4.1. Omentin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen Nyquist eğrileri..... 72

Şekil 4.2. Omentin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen döngüsel voltamogramlar..... 72

Şekil 4.3. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi..... 74

Şekil 4.4. Anti-Omentin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi..... 76

Şekil 4.5. Omentin inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi..... 78

Şekil 4.6. BSA konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi..... 80

Şekil 4.7. Omentin biyosensörünün 100-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki EİS ölçümlerine ait Nyquist eğrileri..... 83

Şekil 4.8. Omentin biyosensörünün 100-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları..... 83

Şekil 4.9. Omentin biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ait standart grafik..... 84

Şekil 4.10. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının SEM görüntüleri..... 88

Şekil 4.11. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları..... 89

Şekil 4.12. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları..... 89

Şekil 4.13. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları..... 90

Şekil 4.14. Omentin biyosensörünün yalın halinin ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrasına ait FTIR spektrumu..... 91

Şekil 4.15. Yalın SPE'nin 10 mV-100 mV potansiyel aralığındaki CV sonuçları..... 92

Şekil 4.16. Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası SPE'nin 10 mV-100 mV potansiyel aralığındaki CV sonuçları 92

Şekil 4.17. Chemerin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen Nyquist eğrileri..... 94

Şekil 4.18. Chemerin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen döngüsel voltamogramlar..... 94

Şekil 4.19. Solid Works yazılımı ile Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu tasarımları..... 96

Şekil 4.20. 3DPGE'lerin boyun bölgesine eklenen eşik tasarımına ait çizim 98

Şekil 4.21. 3DPGE'lerin çalışma yüzeylerinin iyileştirilmesi..... 99

Şekil 4.22. İmmobilizasyon aşamalarında 3DPGE'lerin yüzeyine uygulanan damla yöntemi 99

Şekil 4.23. 3DPGE'lerin potansiyostata bağlantı kısmına eklenen eşiğin çizimine ait görüntü 100

Şekil 4.24. 3DPGE'lerin potansiyostata bağlantı bölgelerinin iyileştirilmesi..... 101

Şekil 4.25. Tüm modifikasyonlar sonrası 3DPGE'lerin teknik çizimi..... 102

Şekil 4.26. 3DPGE'lerin üç boyutlu yazıcı üzerindeki görüntüleri..... 103

Şekil 4.27. Altın kaplama uygulaması öncesi 3DPGE yüzeyindeki yük transfer direncini gösteren Nyquist eğrisi..... 104

Şekil 4.28. 40, 80 ve 120 saniye boyunca altın kaplama ardından 3DPGE yüzeylerindeki yük transfer dirençlerini gösteren Nyquist eğrileri 104

Şekil 4.29. 3DPGE'lerin altın kaplama sonrası ve öncesi görünümleri..... 105

Şekil 4.30. 40 Saniye boyunca yüzeyi altın kaplanan 3DPGE'ye ait EDS spektrumu. 106

Şekil 4.31. 80 Saniye boyunca yüzeyi altın kaplanan 3DPGE'ye ait EDS spektrumu. 106

Şekil 4.32. 120 Saniye boyunca yüzeyi altın kaplanan 3DPGE'ye ait EDS spektrumu 106

Şekil 4.33. A: İstasyon yüzeyi ile 90º açıya sahip, B: İstasyon yüzeyine paralel, C: İstasyon yüzeyi ile 45º açıya sahip, D: İstasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90º, X ekseni ile 45º açıya sahip 3DPGE'ler 108

Şekil 4.34. A: İstasyon yüzeyi ile 90º açıya sahip, B: İstasyon yüzeyine paralel, C: İstasyon yüzeyi ile 45º açıya sahip, D: İstasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90º, X ekseni ile 45º açıya sahip 3DPGE'ler. 109

Şekil 4.35. Y ekseni ile 90º X, ekseni ile 45º açı yaparak üretilen 3DPGE'ler..... 111

Şekil 4.36. Chemerin biyosensörünün 2-20 ng/mL konsantrasyon aralığındaki EİS ölçümlerine ait Nyquist eğrileri 112

Şekil 4.37. Chemerin biyosensörünün 2-20 ng/mL konsantrasyon aralığındaki EİS ölçümlerine ait döngüsel voltamogramlar..... 112

Şekil 4.38. Chemerin biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ait standart grafik 113

Şekil 4.39. Chemerin biyosensörünün tek noktada frekansta impedans ölçümü öncesi alınan impedans ölçümüne ait Bode Grafiği..... 116

Şekil 4.40. Chemerin biyosensörünün tek nokta frekansta impedans analizine ait grafik 117

Şekil 4.41. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının SEM görüntüleri..... 118

Şekil 4.42. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları..... 119

Şekil 4.43. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları..... 119

Şekil 4.44. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları..... 120

Şekil 4.45. Chemerin biyosensörünün yalın halinin FTIR spektrumu..... 121

Şekil 4.46. Chemerin biyosensörünün Anti-Chemerin immobilizasyonu sonrasına ait FTIR spektrumu 121

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Antiinflamatuar ve proinflamatuar adipokin örnekleri 9

Çizelge 2.2. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre kilo sınıflandırmaları ve VKİ değerleri 17

Çizelge 2.3. Bazı antikor-temelli biyosensör örnekleri 27

Çizelge 2.4. Bazı impedimetri temelli biyosensör örnekleri 29

Çizelge 3.1. Omentin biyosensörünün genel hazırlık aşamaları 52

Çizelge 3.2. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları 54

Çizelge 3.3. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları 55

Çizelge 3.4. Omentin inkübasyon süresinin optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları 56

Çizelge 3.5. BSA konsantrasyonunun optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları 57

Çizelge 3.6. Laviron eşitliğinin elemanları 60

Çizelge 3.7. Chemerin biyosensörünün genel hazırlık aşamaları 67

Çizelge 4.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri 75

Çizelge 4.2. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri 77

Çizelge 4.3. Omentin inkübasyon süresinin optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri 79

Çizelge 4.4. BSA konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri 80

Çizelge 4.5. Omentin biyosensörünün optimum hazırlık parametreleri 82

Çizelge 4.6. Omentin biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçlarına ait tablo 85

Çizelge 4.7. Omentin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait denklemler 86

Çizelge 4.8. Omentin biyosensörünün yapay serum uygulaması 87

Çizelge 4.9. Farklı altın kaplama sürelerinde 3DPGE'lerin yüzeyindeki element yüzdeleri 107

Çizelge 4.10. Farklı basım açılarıyla üretilen 3DPGE'lerin altın kaplama uygulaması sonrası yüzeylerindeki altın yüzdeleri 110

Çizelge 4.11. Chemerin biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçlarına ait tablo 114

Çizelge 4.12. Chemerin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait denklemler 115

Çizelge 4.13. Chemerin biyosensörünün insan serumu uygulaması 116

Çizelge 4.14. Ticari olarak satılan Omentin ve Chemerin ELISA kitleri 122

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, obezite "günümüzün en bariz görünen ama en çok ihmal edilen halk sağlığı sorunlarından biri" olarak tanımlanmaktadır. Obezite yaygınlığının, 1980'den bu yana dünya çapında %200'den fazla artış gösterdiği ve 2014'te obez olan 600 milyon birey de dahil olmak üzere yaklaşık 2 milyar yetişkinin aşırı kilolu olduğu rapor edilmekte (Ofori-Asenso vd., 2016) ve günümüze kadar geçen sürede bu sayının katlanarak arttığı tahmin edilmektedir.

Aşırı kilo ve obezite, sağlık üzerinde olumsuz etkiler yaratma potansiyeline sahip anormal veya aşırı miktarda yağ birikimi olarak tanımlanabilir ve vücudun, hem fiziksel aktivite hem de büyüme için ihtiyaç duyduğu enerji gereksinimlerinin üzerinde kalori alımı gerçekleştiğinde ortaya çıkar (Escalona vd., 2006; Ofori-Asenso vd., 2016). Obezite yaygınlığındaki artış, geniş ölçüde genetik faktörlere, diyet ve fiziksel aktivite alışkanlıklarındaki değişikliklere ve yüksek yağlı gıdaların artan kullanımına bağlanmaktadır (Marinou vd., 2010). Yapılan araştırmalar, aşırı vücut ağırlığının sadece yetişkinlerde değil ergenlerde de hipertansiyon, tip 2 diyabet ve iskemik kalp hastalığı vakalarındaki dinamik artışı etkilediğini göstermiştir.

Yağ dokusu, adipositlerden, preadipositlerden, fibroblastlardan, stromal hücrelerden ve makrofajlardan meydana gelmektedir. 1980'lere kadar yağ dokusunun endokrin işlevi bilinmemekle beraber yağ dokusu, trigliseritler şeklinde birikmiş aktif

olmayan bir enerji deposu olarak görülmekteydi. Günümüzde vücuttaki yağ dokusunun, enerji depolama, ısı yalıtımı, bağışıklık ve endokrin gibi fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir (M.-W. Lee vd., 2019; Zorena vd., 2020).

Adipositler, yeme davranışını ve metabolizmayı etkileyen bir dizi adipokin salgılar. Yağ dokusunun bir endokrin organ olarak algılanmasındaki en büyük adım, ilk adipokin olan leptinin keşfidir. Şimdiye kadar yağ dokusu tarafından salgılanan pek çok madde keşfedilmiş ve tanımlanmış olup, bunların metabolik etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Obezite genel olarak diyabet, hipertansiyon, polikistik over sendromu, koroner arter hastalığı ve kanserlere yol açabilir (Gómez-Hernández vd., 2016; Zorena vd., 2020).

Adipositler ve yağ dokunun diğer hücreleri, leptin, adiponektin, resistin, visfatin, chemerin, omentin gibi kronik komplikasyonlara yol açabilecek çok sayıda biyolojik olarak aktif otokrin, parakrin ve endokrin maddenin üretiminden ve salgılanmasından sorumludurlar. Omentin ve chemerin, insülinin metabolizması üzerinde büyük etkisi olan adipokinlerdir ve obezite kaynaklı insülin direnci ile de ilişkilidirler. Tip 2 diyabet dahil olmak üzere, obezite ve obezite ile ilişkili hastalıkların patogenezinde rol oynamak için potansiyel adaylardır. Bozulmuş glukoz toleransı olan ve yeni teşhis edilmiş tedavi edilmemiş tip 2 diyabet hastalarında Omentin seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Omentin seviyeleri obezite, hiperglisemi, insülin direnci, inflamasyon ve plazma Chemerin seviyeleri ile negatif korelasyon göstermektedir. Omentin seviyelerindeki bu azalma, visseral ve deri altı yağ dokularında ve diğer insüline bağımlı dokularda, insüline bağımlı glukoz alımının azalmasına neden olabilir (Nway vd., 2016; Syed Ikmal vd., 2013; Zorena vd., 2020)..

Chemerin, omentine benzer şekilde, adipositler tarafından insüline bağımlı glukoz alımını güçlendirir. Chemerin'in, obezite ve inflamasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Düzeyleri özellikle aşırı obez bireylerde yüksek olup; metabolik sendromun temel unsurları olan vücut kitle indeksi, trigliseritler ve arteriyel hipertansiyon ile ilişkilidir (Bremer & Jialal, 2013).

Bu doktora tezi çalışması kapsamında, potansiyel obezite biyobelirteçlerinden olan Omentin ve Chemerin moleküllerinin tayini için iki adet impedimetrik biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında bu iki moleküle ait

biyosensör bulunmamakla beraber; Chemerin biyosensörünün tasarımında, üç boyutlu yazıcı ile fotopolimer reçine temelli altın kaplı tek kullanımlık elektrotlar, çalışma elektrotu olarak kullanılmak üzere ilk kez üretilmişlerdir.

Ayrıca, geliştirilmesi planlanan iki adet biyosensörün, potansiyel obezite biyobelirteçlerinden Omentin ve Chemerin'in insan kanındaki miktarının hızlı ve kolay olarak belirlenebilmesi için bir yöntem sağlaması ile literatüre katkıda bulunması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Obezite

Obezite, latin kökenli “obesitas, obesus” sözcüklerinden günümüze gelmekte ve kelime anlamı olarak yağlılık, şişmanlık anlamını taşımaktadır.

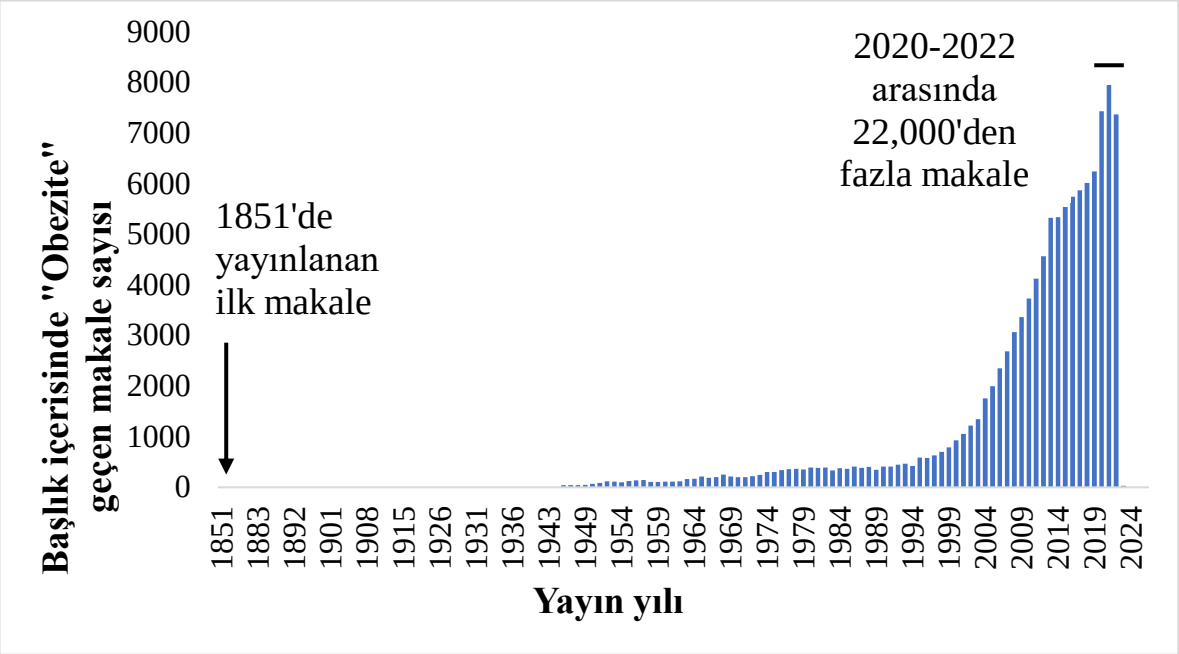
Tıbbi olarak obezite, vücutta yağın aşırı miktarda birikmesi, depolanması ile karakterize edilen ve yaşam beklentisinin azalmasına, sağlık sorunlarının artmasına yol açan bir durumdur (Mohamed vd., 2014).

Kısmen aşırı kalori tüketiminden kaynaklanan kalori dengesizliği, artan obezite prevalansı ile ilişkilidir. Sanayileşmiş ülkelerin nüfusu, yaşam tarzındaki değişikliklerin bir sonucu olarak daha fazla kilo almakta ve obezite, 21. yüzyılın en yaygın sağlık sorunu haline gelmektedir (Eckel & Krauss, 1998; Kumanyika vd., 2002).

Bilimsel ve klinik toplulukta, obezitenin bu yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır. Obezite ile ilgili belgelenmiş raporlar ilk olarak 19. yüzyılın sonu ile 20. yüzyılın başında karşımıza çıkmaktadır (MacLennan, 1898; Oliver, 1880; Perry, 1903; Poirier & Eckel, 2002).

19. Yüzyılın ortasından günümüze kadar olan süre içerisinde PubMed üzerinde yayınlanmış, başlığı içerisinde “obezite” terimi geçen makale sayısı 99.000 üzerinde iken, aramaya yayınların özet kısmını da dahil ettiğimizde bu sayı 300.000’in üzerine

çıkmaktadır. PubMed veri tabanında, başlığı içerisinde “obezite” terimi geçen makale sayısının yıllara göre dağılımını gösteren grafik Şekil 2.1‘de verilmiştir.



Şekil 2.1. PubMed üzerinde başlığı içerisinde “obezite” terimi geçen makale sayısının yıllara göre dağılımı

Şekil 2.1‘deki grafik, özellikle geçtiğimiz yıllarda obezite ile alakalı yapılan bilimsel çalışmaların sayıca artmış olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaların da birçoğu, obezite sorununun dünyanın farklı yerlerinde yaygınlığını bildirmektedir.

Ng ve arkadaşları, obezite ile ilgili yaptıkları çalışmada, farklı cinsiyete, yaş grubuna, dünya bölgesine ve kalkınma durumuna göre 2 ile 80 yaş arası 188 ülkenin bireylerine ait veri sunmuşlardır. Bu çalışma sonucunda, Okyanusya, Kuzey Afrika ve Orta Doğu’daki bazı ülkelerde obezite yaygınlığının (Vücut kitle indeksi, VKİ [Body mass index, BMI] $\geq$ 30 kg/m^2) 2013 yılında yetişkin nüfusun %50’sini aştığı sonucuna varmışlardır (Ng vd., 2014; Ortega vd., 2016; Poirier & Eckel, 2002). Çalışmada, obezite yaygınlığının, yetişkin nüfusun üçte birinin obez olduğu Kuzey Amerika’ya veya beşte birinin obez olduğu Batı Avrupa’ya kıyasla daha düşük olduğu fakat buna rağmen yine de çok yüksek olduğu görülmektedir. Vücut kitle indeksi 25 kg/m^2’den fazla olan kişilerin yüzdesi dikkate alındığında ise bu sayılar iki kattan daha da fazla artış göstermektedir.

Çocuklarda ve ergenlerde obezite yaygınlığı, yetişkinler için bildirilenlerin yaklaşık yarısı kadardır. 1980'den 2013'e kadar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, erkeklerde ve kadınlarda, çocuklarda ve yetişkinlerde dünya çapında bir obezite artışı gerçekleşmiştir (Ng vd., 2014; Ortega vd., 2016; Poirier & Eckel, 2002). Gelişmiş ülkeler arasında bir istisna olarak, nüfusunun yalnızca %3,8'i obez olan Japonya'da obezite salgını olduğu düşünülmemektedir. Bu durumun, en azından kısmen geleneksel beslenme alışkanlıklarından (pirinç, sebze, balık ve daha düşük kalorili diyet) ve ülkedeki gelişmiş toplu taşımanın daha az araba kullanımına ve dolayısıyla daha çok yürüme alışkanlığına neden olması ile açıklanabileceği düşünülmektedir (Ortega vd., 2016; Poirier & Eckel, 2002).

Bireysel düzeyde, aşırı gıda enerjisi alımı ve fiziksel aktivite eksikliği kombinasyonunun obezite nedenlerinin çoğunu açıkladığı düşünülmektedir (Lau vd., 2007). Bazı vakalarda, obezite genetik faktörlerden, tıbbi nedenlerden veya psikiyatrik hastalıklardan kaynaklanmaktadır (Bleich vd., 2008). Öte yandan, toplumsal düzeyde artan obezite oranlarının, kolay erişilebilir ve lezzetli beslenme, arabalara artan güven ve kolay endüstriyel üretimden kaynaklandığı düşünülmektedir (James, 2008; Mohamed vd., 2014).

2006'da yapılan bir inceleme, yetersiz uyku, endokrin bozucular, ortam sıcaklığındaki değişkenliğin azalması, sigara içmenin iştahı bastırmasından dolayı sigara içme oranlarının azalması, kilo alımına neden olabilecek ilaçların artan kullanımı (örneğin atipik antipsikotikler), daha kilolu olma eğiliminde olan etnik ve yaş gruplarındaki artışlar, daha geç yaşta hamilelik (çocuklarda obeziteye yatkınlığa neden olabilir), nesilden nesile aktarılan epigenetik risk faktörleri, daha yüksek VKİ için doğal seçilim ve obezite risk faktörlerinin artan konsantrasyonuna yol açan sınıflandırıcı çiftleşme gibi son zamanlarda obezite artışına katkıda bulunan on olası etmeni belirlemiştir (Keith vd., 2006; Mohamed vd., 2014).

Obezite, inme, osteoartrit, uyku apnesi gibi kronik hastalıklar, bazı kanserler ve inflamasyona dayalı patolojilerin yanı sıra diyabet, hipertansiyon ve kalp-damar hastalıkları gibi metabolik bozuklukların gelişimini kolaylaştırmaktadır (Mohamed vd., 2014).

Yayınlanmış veriler, obezite ile diyabetin en yaygın birincil formu olan insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus ve bozulmuş glukoz toleransı arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Obez bireylerde, yağ dokusu yüksek miktarda esterleşmemiş yağ asitleri, gliserol, proinflamatuar sitokinler ve hormonlar salgılar. Bu moleküller, pankreas hücrelerinin aşırı uyarılması ve insülin reseptörlerinin azalması ile telafi edici hiperinsülinemi oluşturan insülin direncinin gelişimi ile bağlantılıdırlar (Mohamed vd., 2014; Stumvoll vd., 2008).

Epidemiyolojik araştırmalar, hipertansiyon riskinin %65-75'inin obeziteden sorumlu olduğunu göstermiştir (Mohamed vd., 2014; Wofford & Hall, 2005). Adipoz dokuyla ilgili endokrinolojik araştırmalar, obezite ile hipertansiyon arasında, muhtemelen adipoz dokunun biyoaktif moleküller ve immünomodülatörler salgılamasının bir sonucu olarak, bağlantı olduğunu ortaya koymuştur (Hajer vd., 2008; Mohamed vd., 2014).

Obezite, dislipideminin en yaygın nedenidir. Obezite, hiperinsülinemi ve/veya insülin direnci durumunda aşırı lipid artışı, esterleşmemiş yağ asidi mevcudiyetinin artmasına ve dolayısıyla kas, karaciğer ve pankreas gibi adipoz olmayan dokularda yüksek miktarda trigliserid depolanmasına sebep olur (Boden vd., 2001; Marchesini vd., 2001).

Özellikle viseral yağın aşırı birikmesinin, glukoz intoleransı, dislipidemi ve hipertansiyon kümesi üzerine büyük katkısı bulunmaktadır; bu koşullar kardiyovasküler hastalıkların da gelişmesine yol açar (Calle vd., 1999; Després & Lemieux, 2006; Matsuzawa, 2006; Nielsen & Jensen, 1997; Shibata vd., 2017)

2.1.1. Obezite biyobelirteçleri

Yağ dokusu, yakındaki veya uzaktaki dokulara doğrudan etki eden adipokinler olarak da bilinen çeşitli biyoaktif moleküller üretir (K. Nakamura vd., 2014; Ouchi vd., 2011; Shibata vd., 2017). Obezite, bu adipokinlerin salgılanma düzenini bozar ve insülin duyarlılığına yol açar. Bu nedenle, salgılanan adipokin profilindeki değişim, insülin direnci ve obezite ile ilişkili olup; bu durum, adipokinleri obezitenin, insülin direncinin ve tip 2 diyabet nüksünün tahmini, teşhisi ve terapötik izlenmesi için umut verici aday biyobelirteçler haline getirmektedir (Jung & Choi, 2014).

Adiposit yağ asidi bağlayıcı protein (A-FABP4), Chemerin, Omentin, Leptin, Adiponektin, Retinol Bağlayıcı Protein-4 (RBP-4), Açilasyon Uyarıcı Protein (ASP), Vaspin, Visfatin, Ghrelin, Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α), İnterlökin-6 (IL-6), Apelin adipokin olarak görev yapan biyobelirteçlerden bazılarıdır (Bozaoglu vd., 2007; Doç vd., 2013; Ernst & Sinal, 2010; Han vd., 2016; Moreno-Navarrete vd., 2010, 2011; Motor vd., 2014; R. Nakamura vd., 2017; Rourke vd., 2013; Sell vd., 2009; B. K. Tan vd., 2010; Yang vd., 2006).

2.1.1.1. Adipokinler

Oldukça aktif bir metabolik ve endokrin organ olarak adipoz doku, lipid ve glukoz metabolizmasında rol oynar. Adipoz doku aynı zamanda çok sayıda adipokin (kemokinler, sitokinler ve hormonlar dahil) salgılayan önemli bir endokrin fonksiyona sahiptir. Adipokinler, yağ dokusunun fonksiyonel durumunu beyne ve diğer hedef organlara sinyal gönderen peptitlerdir (Smekal & Vaclavik, 2017).

Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerine göre adipokinler, kardiyoprotektif adipokinler (antiinflamatuar) ve kardiyovasküler sistemi olumsuz etkileyen adipokinler (proinflamatuar) olarak ikiye ayrılabilir (Çizelge 2.1). Bununla birlikte, bu ayrım tam olarak doğru değildir, adipokinlerin büyük bir kısmı için, koruyucu ve yan etkiler bildirilmiştir ve bunların genel fonksiyonları tam olarak tanımlanmamıştır (Smekal & Vaclavik, 2017).

Bazı adipositokinler (resistin, apelin) her iki kaynak tarafından üretildikleri için, yağ dokusu salgı ürünlerinin, stromal vasküler hücre fraksiyonları tarafından üretilen sitokinler ve adipositler tarafından üretilen adipokinler olarak sınıflandırılması tam olarak doğru bir sınıflandırma değildir. Ayrıca, birçok adipokin yağ dokusu dışında bol miktarda üretilmekte ve bu durum bu maddelerin sınıflandırılmasını daha da karmaşık hale getirmektedir. Adipokinlerin sadece küçük bir kısmı sadece adipoz doku tarafından üretilir (Smekal & Vaclavik, 2017).

Kemokinler ve sitokinler dahil olmak üzere, adipokinlerin birçoğu, enerji homeostazı ve inflamasyon ile bağlantılıdır. Adipositler obezite durumunda, çeşitli proinflamatuar kemokinlerin ve sitokinlerin salgılanmasını arttırarak, obezitenin neden

olduğu enflamasyonun gelişiminde büyük rol oynarlar (Jernås vd., 2006; Skurk vd., 2007).

Adiponektin, RBP-4, A-FABP4, leptin, vaspin ve chemerin gibi bir dizi adipokin'in insülin direnci gelişiminde rol oynadığı belirtilmiştir (Jung & Choi, 2014).

C1q/TNF ile ilişkili proteinler (CTRP'ler), Omentin ve salgılanan kıvrık-ilişkili protein 5 (SFRP5), adipoz doku tarafından üretilen antiinflamatuar adipokinlerdir (Gutiérrez-Vidal vd., 2015; Mancuso, 2016; Ohashi vd., 2014). Obezite ile ilişkili inflamasyonun artmasında rol oynayan Chemerin, RBP-4 ve lipokalin 2 (LCN2) gibi proinflamatuar adipokinlerle ilgili az sayıda çalışma vardır (Mancuso, 2016; Ouchi vd., 2011).

Adipokinler, kan dolaşımı seviyeleri ölçülerek belirlenebilirler (Antuna-Puente vd., 2008). Çizelge 2.1'de antiinflamatuar ve proinflamatuar adipokinlerden bazıları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Antiinflamatuar ve proinflamatuar adipokin örnekleri

Antiinflamatuar	**Proinflamatuar**
Leptin	
Adiponektin	AFABP
Apelin	Chemerin
CTRP'ler	LCN2
Omentin	RBP-4
SFRP5	Resistin
Vaspin	Visfatin

2.1.1.2. Chemerin

Tazaroten-indüklü gen 2 (TIG2) olarak da bilinen insan Chemerin'i, Sistatin süper ailesinin yeni ama uzak bir üyesidir. RAR-responsive protein, RARRES2, TIG2HP10433, TIG2, retinoik asit reseptör responder 2, retinoik asit reseptör responder protein 2 olarak da adlandırılmaktadır. Bu süper ailenin üyeleri, birbiri ile yaklaşık 100 amino asit mesafede bulunan en az iki zincir içi disülfit bağı ve alfa-sarmal yapı içerirler (Nagpal vd., 1997; Storici vd., 1996; Zanetti, 2004).

Chemerin, 20 amino asitlik hidrofobik N-terminal bir dizi, arada kalan 137 amino asitlik Sistatin benzeri katlanmış bölge ve 6 amino asitlik C-terminal prosegmenti içeren toplam 163 amino asitlik bir öncü molekül olarak sentezlenir (Nagpal vd., 1997; Wittamer vd., 2004). Sistatin benzeri katlanmış bölge içerisinde, katlanmaya katkıda bulunan üç zincir içi disülfit bağı, ve fosforilasyon için üç, miristoilasyon için bir potansiyel bölge bulundurmaktadır (Meder vd., 2003). Öncü molekül, her iki terminalde de proteazlar tarafından proteolitik işlemlerden geçer. 20 amino asitlik hidrofobik N-terminal bölgesi, ya bir sinyal dizisi ya da tip 2 transmembran protein için bir transmembran bölümü olarak tanımlanmaktadır (Nagpal vd., 1997; Yokoyama-Kobayashi vd., 1999). Her iki durum da, C-terminal üzerinde daha çok işlemden geçebilecek çözünebilir bir ön formu meydana getirmektedir. İnsanlarda, 6 amino asitlik C-terminal kalıntısı ayrılarak, 21-157 amino asitlik 16 kDa kütleli Heparin-bağlayıcı biyoaktif monomerik molekülün oluşumunu sağlamaktadır (Wittamer vd., 2004).

Chemerin'in 134 amino asitlik daha kısa bir formu da tanımlanmıştır (Meder vd., 2003). Biyoaktivitenin yoğun olarak, prosegmentten önce gelen 149-157 amino asit arasında kalan 9 amino asitlik kalıntı üzerinde olduğu görülmüştür (Wittamer vd., 2004). 137 amino asitlik bölümün, ChemR23 olarak da bilinen G-protein eşlikli reseptöre bağlandığı bilinmektedir (Meder vd., 2003; Wittamer vd., 2003). Bu bağlanma, makrofaj ve olgunlaşmamış dendritik hücrelerin kemotaksisine sebep olmaktadır (Wittamer vd., 2003).

Chemerin, yoğunlukla adipositlerde ve hepatositlerde (Herová vd., 2014; Stejskal vd., 2008) olmak üzere, epitel hücrelerde, fibroblastlarda, kondrositlerde ve az miktarda osteoblastlardan sentezlenmektedir (Albadah vd., 2015; Zabel vd., 2014).

Chemerin'in, kemokin tipi reseptör 1 (CMKLR1 / ChemR23), G protein eşlikli reseptör 1 (GPR1) ve kemokin (C-C motif) reseptör tipi 2 (CCRL2) olmak üzere ligand bağlanmasıyla tetiklenen üç ana reseptörü bulunmaktadır. Bunlardan ilk tanımlanan reseptör olan ChemR23, G proteinlerinin Gi ailesine bağlanma gösterir ve şimdiye kadar sinyal aktivitesine sahip açıklanan iki Chemerin reseptöründen biridir. GPR1, CMKLR1'in en yakın homologudur ve CMKLR1 ile %40'tan fazla sekans benzerliğine sahiptir. GPR1'in ekspresyonu, merkezi sinir sistemi, cilt ve yağ dokusunda ve ayrıca Leydig hücreleri ve granüloza hücreleri dahil olmak üzere birkaç hücre tipinde rapor edilmiştir (Banas vd., 2015; Reverchon vd., 2012). GPR1, arrestin alımına dayanan Tango testini içeren bir taramanın sonucunda bir Chemerin reseptörü olarak tanımlanmıştır. Chemerin'in GPR1'e bağlanmasının, rekombinant hücre hatlarında zayıf kalsiyum mobilizasyonunu aktive ettiği de gösterilmiş, ancak GPR1'in doğal ortamlarda sinyal kaskadlarını tetikleyip tetiklemediği hala net olarak kanıtlanamamıştır. GPR1'e bağlanan Chemerin, kendi regülasyonunu tetikler, bu da GPR1'in hücre dışı chemerin seviyelerini kontrol eden bir çöpçü reseptör olabileceğini düşündürür (de Henau vd., 2016). CCRL2 reseptörünün, büyük olasılıkla herhangi bir sinyal aktivitesi göstermeyen atipik bir kemokin reseptörü olduğu rapor edilmiştir (Bondue vd., 2011; Wittamer vd., 2003; Zabel vd., 2014). CCRL2'nin Chemerin'i CMKLR1'e ve muhtemelen GPR1'e yönlendirdiği tahmin edilmektedir (Yoshimura & Oppenheim, 2011). Chemerin, bu reseptörlerin hepsine düşük nanomolar afinite ile bağlanır (Buechler vd., 2019; de Henau vd., 2016).

Chemerin'in CMKLR1'e bağlanması, hücre içi kalsiyumun yükselişini ve siklik Adenozin monofosfat'ın (cAMP) düşüşünü uyarır (Wittamer vd., 2003). G-proteinlerinin hiçbirisinin, Chemerin'in GPR1 veya CCRL2'ye bağlanması üzerine aktive olmadığı; yine de, her iki reseptör için de beta-arrestin 1 ve 2'nin alımının gözlendiği rapor edilmiştir (de Henau vd., 2016). Chemerin ayrıca, transkripsiyonel düzenleyici serum-yanıt faktörünü aktive etmek için GPR1 ve CMKLR1'in hedefi RhoA ve Rho ile ilişkili protein kinaz bağımlı yolağı kullanır (Rourke vd., 2015). ChemR23 eksprese eden rekombinant hücrelerde Chemerin, cAMP birikimini inhibe eder, fosfolipaz C'yi, inositol trifosfat (IP3) salınımını ve kalsiyum mobilizasyonunu aktive eder ve fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) ve hücre dışı düzenlenmiş protein kinazların (ERK1/2) yolaklarını tetikler. Chemerin, ChemR23 eksprese eden tüm lökosit popülasyonlarının kemotaksisini artırır.

İnsan ve fareden alınan makrofajlar, olgunlaşmamış miyeloid ve plazmasitoid dendritik hücrelerin ve doğal öldürücü hücrelerinin, ex vivo kemotaksis analizlerinde chemerine doğru göç ettiği gösterilmiştir (Bondue vd., 2011; de Henau vd., 2016).

ERK1/2'nin, endotel hücreleri, adipositler ve iskelet kası hücreleri gibi çeşitli hücrelerde Chemerin uygulanması üzerine fosforile olduğu ve adipositlerde, yüksek olmayan Chemerin konsantrasyonlarında bu yolağın aktive olduğu rapor edilmiştir (Buechler vd., 2019; Goralski vd., 2007). Chemerin ayrıca p38 mitojenle aktive olan protein kinazı, Akt'ı ve PI3K'ı aktive etmektedir (Mattern vd., 2014; Rourke vd., 2013). Chemerin ile kısa süreli inkübasyonun hepatositlerde Akt'ı aktive ettiği, oysa iki saate kadar uzun süreli inkübasyonlarda bu hücrelerde fosforile Akt seviyelerinde düşüşe yol açtığı gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışma, Chemerin bağlanmasının fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ile CMKLR1 arasındaki ilişkiyi zayıflattığını bildirmektedir. Chemerin'in CMKLR1'e bağlanmasının, PTEN aktivitesini artırdığı ve ardından Akt fosforilasyonunun azalmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (J.-J. Li vd., 2018). Protein kinaz C'nin Chemerin tarafından aktivasyonu, CMKLR1'in reseptör aracılı endositozunu uyarır. Bu yolağın bloke edilmesi, kalsiyum akışını ve ERK fosforilasyonunu arttırarak, bu mekanizmanın duyarsızlaştırma yoluyla sinyal iletimini sonlandırdığını göstermektedir (J. Zhou vd., 2014). Nükleer faktör kappa B (NFkB) yolağının, iskelet kası hücrelerinde Chemerin tarafından aktive edildiği; adipositlerde ise Chemerin sinyalinin inhibisyonunun, NFkB aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Dranse vd., 2016; Sell vd., 2009). Böylece Chemerin'in, çeşitli sinyal yollarını aktive ettiği ve etkilerinin Chemerin'in inkübasyon süresine ve konsantrasyonuna bağlı olduğu söylenebilir.

Birçok klinik çalışma; Chemerin ile insülin duyarlılığı, obezite, inflamasyon ve diğer metabolik bozukluklar arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Chemerin'in, diyabet ve obezite ile ilişkili hastalıklarda inflamasyona, oksidatif strese, vasküler insülin sinyaline ve vasküler fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Neves vd., 2016).

Obezite durumunda, insüline dirençli ve enflamatuar durumlarda Chemerin'in serum konsantrasyonları, bağışıklık hücrelerini aktive ederek, fibronektin ve vasküler hücre adezyon molekülü-1'e (VCAM-1) makrofaj bağlantısını uyararak artış gösterir.

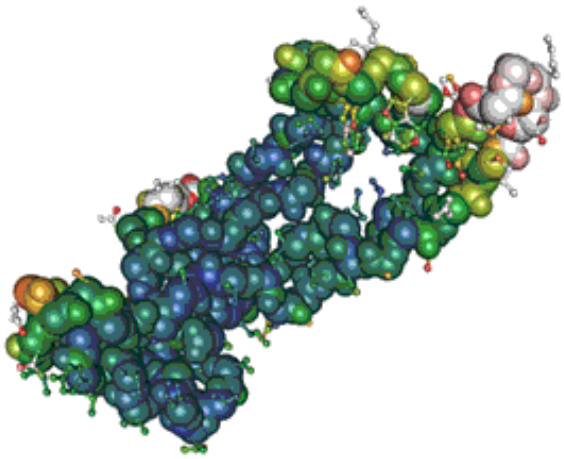
Bağışıklık hücrelerini uyararak sırayla iskelet kası ve adipositlerde insülin duyarlılığını ve glukoz alımını değiştirir. Chemerin ayrıca VKİ, trigliserid seviyeleri ve kan basıncı dahil olmak üzere tip 2 diyabet parametreleriyle de ilişkilendirilmiştir (Ali & al Hadidi, 2013). Chemerin'in, metabolik bozuklukların başlangıcından önce insülin duyarlılığı için yararlı bir dedektör belirteci olarak kabul edilebileceği öne sürülmüştür (Park vd., 2015). Ancak bu belirtecin biyosensör tabanlı tespiti için literatürde herhangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

2.1.1.3. Omentin

Omentin, 313 amino asitten meydana gelen, kardiyovasküler hasara yanıtta koruyucu bir rol oynayan çok işlevli bir anti-inflamatuar adipokindir. Endotel lektin, HL-1, galaktofuranoz-bağlayıcı lektin, INTLHL1, ITLN1, ITLNITLN-1, intelektin-1, bağırsak laktoferrin reseptörü, Omentin-1, hIntL olarak da adlandırılmaktadır (Jaikanth vd., 2013; Lesná vd., 2015).

Yetişkin insana ait Omentin, bir adet fibrinojen C-terminal bölgesi bulundurmakta ve amino asit dizisi bakımından fareye ve sıçana ait Omentinler ile sırasıyla %82 ve %80 benzerlik göstermektedir (J. K. Lee vd., 2001; Suzuki vd., 2001; Tsuji vd., 2001).

İnsanda bulunan Omentin'e ait üç boyutlu yapı Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Omentin'e ait üç boyutlu yapı

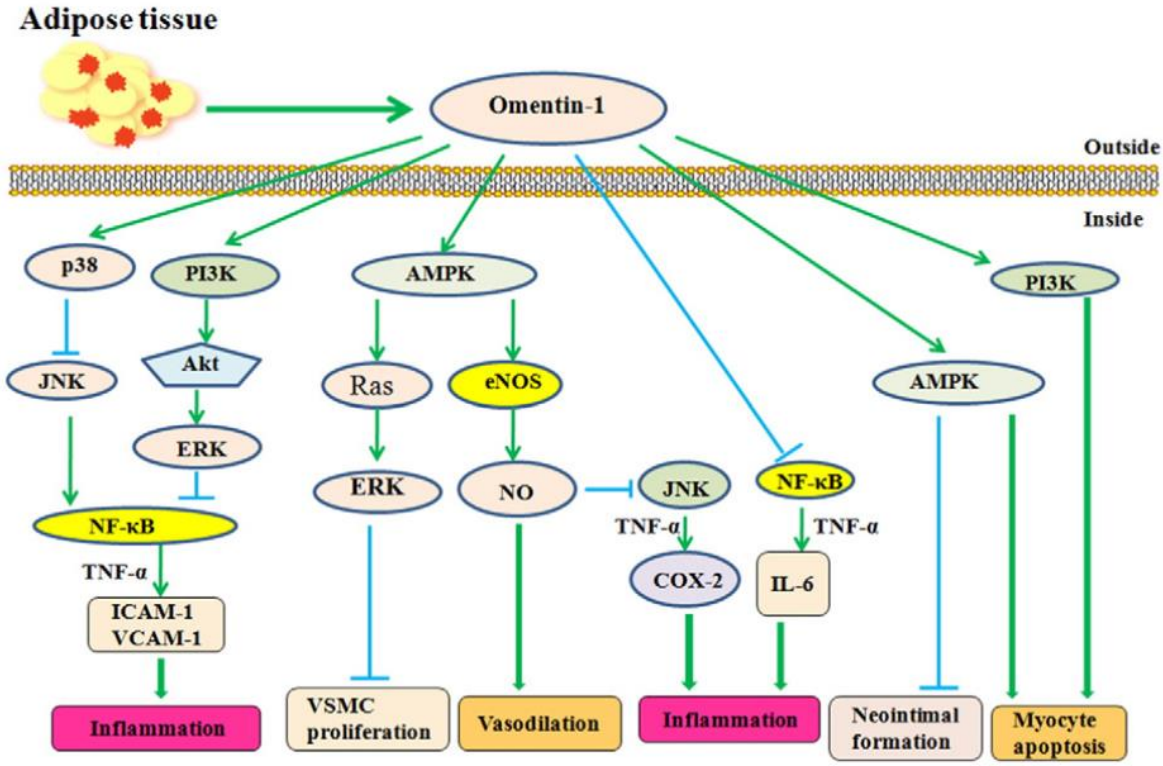
Omentin, özellikle kalp, vasküler düz kas ve endotel hücreler (J. K. Lee vd., 2001; Watanabe vd., 2016; Yang vd., 2006), ince bağırsak, kolon, timus, yumurtalık, testis ve viseral yağ dokusundan (J. K. Lee vd., 2001; Tsuji vd., 2001; Yang vd., 2006), bağırsaktaki paneth ve goblet hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Kerr vd., 2014; Komiya vd., 1998; Washimi vd., 2012).

Omentin, disülfit-bağlı homotrimerler oluşturabilen 35-40 kDa kütleye sahip GPI (Glikozilfosfatidilinositol)-çapalı bir glikoprotein olup (Suzuki vd., 2001; Tsuji vd., 2001), dolaşıma ve bronşiyal lavaj sıvısına salınabilir (Kerr vd., 2014; Yang vd., 2006). Mikrobiyal galaktofuranozil karbohidratlara bağlanır (Tsuji vd., 2001; Wesener vd., 2015) ve buna ek olarak demir taşıyıcı protein olan laktoferrin için reseptör olarak işlev görür (Suzuki vd., 2001).

Omentin, birçok hücre içi ve hücre dışı sinyal yolaklarında görev almaktadır. Yamawaki ve ark. Omentin'in, muhtemelen AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK), endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nitrik oksit (NO) içeren yolların aktivasyonu yoluyla c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunu önleyerek siklooksijenaz-2 (COX-2) uyarılmasını inhibe ettiğini göstermiştir (Yamawaki vd., 2011). Maruyama ve ark. Omentin'in, bir Akt-eNOS sinyal yolunu uyarması aracılığıyla iskemiye yanıt olarak endotel hücre fonksiyonlarını ve revaskülarizasyonu arttırdığını rapor etmişlerdir (Maruyama vd., 2012; Y. L. Tan vd., 2015).

Omentin ayrıca, hücre dışı düzenlenmiş protein kinazlar / nükleer faktör κappa B (ERK/NF-κB) yolağını baskılayarak endotelyal hücrelerde TNF-α kaynaklı hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve VCAM-1 ekspresyonunu da inhibe eder. Omentin, p38 ve JNK yolaklarını baskılayarak vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) TNF-α kaynaklı VCAM-1 ekspresyonunun inhibisyonunda da görev alır. Böylece Omentin, vasküler inflamasyonu azaltan bir adipokin olarak işlev görür (Y. L. Tan vd., 2015).

Omentin'in hücre içi sinyal iletim yollarındaki rollerinin şematik sunumu Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Omentin'in hücre içi sinyal iletim yolları (Y. L. Tan vd., 2015)

Omentin, insana ait yağ dokuda insülin ile uyarılmış glukoz alımını arttırır ve in vitro Akt sinyalini tetikler (Yang vd., 2006). Akt, glukoz metabolizması, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarda ikinci bir haberci olarak kritik bir role sahip olan bir serin / treonin protein kinazdır. C2C12 miyositlerinde Omentin, enerji metabolizması için önemli olan AMPK fosforilasyonunu arttırır. AMPK'nın hedefi olan asetil koenzim A karboksilaz, Omentin seviyelerine bağımlı bir şekilde fosforile edilir. Omentin, dolaşımdaki seviyelerine göre yağ asidi oksidasyonunun artmasına veya azalmasına sebep olur. Omentin, AMPK'nın başka bir hedefi olan p70S6K'nın fosforilasyonunu inhibe eder ve insülin aracılı glukoz alımını arttırır. Bu nedenle, Omentin'in AMPK'yi aktive ederek enerji metabolizmasını in vitro ve in vivo olarak düzenlediği, bu sebeple enerji metabolizmasında bir rol oynadığı düşünülür (Yu, 2011; J.-Y. Zhou vd., 2014).

İnsana ait viseral yağ dokudaki ve plazmadaki Omentin seviyeleri obezite durumunda azalış göstermektedir (de Souza Batista vd., 2007). Dolaşımda bulunan omentin seviyeleri, insulin duyarlılığı ile pozitif ilişkili olup, düşük Omentin seviyeleri

ise bozulmuş glukoz intoleransı ile ilişkilendirilmektedir (Herder vd., 2015). Düşük Omentin plazma seviyelerinin, dislipidemi, yüksek kan basıncı ve bozulmuş glukoz toleransı gibi birçok metabolik risk faktörü ile de ilişkisi bulunmaktadır (Pan vd., 2010; Shibata vd., 2012). Dolaşımdaki Omentin seviyeleri, ateroskleroz (damar sertliği) için bir belirteç olan karotis intima media kalınlığı ile negatif ilişki göstermekte (Shibata, Takahashi, vd., 2011; Yoo vd., 2011) ve koroner arter hastalığı ile akut koroner sendroma bağlı olarak azalış göstermektedir (Shang vd., 2011; Shibata, Ouchi, vd., 2011; Zhong vd., 2011). Artan omentin seviyelerinin, akud miyokard enfarktüs hastalarında perkütan koroner girişim sonrası kardiyak hasarın ve fonksiyonun geliştirilmesi ile de bağlantısı vardır (Kataoka vd., 2014). Ayrıca, azalan Omentin seviyesi, kalp yetmezliği olan hastaların düşük kalp debisi ile de alakalıdır (Narumi vd., 2014). Bu nedenle, dolaşımdaki Omentin seviyelerinin ölçümü, obezite bağlantılı metabolik ve kardiyovasküler bozuklukların değerlendirilmesi için oldukça önem taşımaktadır (Shibata vd., 2017). Omentin için literatürde herhangi bir biyosensör sistemi henüz bildirilmemiştir.

2.1.2. Obezite teşhisinde kullanılan yöntemler

Obezite teşhisinde vücut ağırlığı, yağ ve kas kütlesi arasında ayrım yapamadığından dolayı iyi bir gösterge değildir. Ciddi sağlık sorunu riski taşıyanları belirlemek için, Vücut Kitle İndeksi (VKİ) ve Bel-Kalça Oranı (BKO) ölçümleri kullanılır.

- **Vücut Kitle İndeksi (VKİ)**

Vücut kitle indeksi, ağırlık ve boy arasında korelasyon sağlayan bir ölçümdür ve aşağıdaki formül ile ifade edilir (Mohamed vd., 2014).

  - VKİ = Kütle (kg) / [Boy (m)]^2

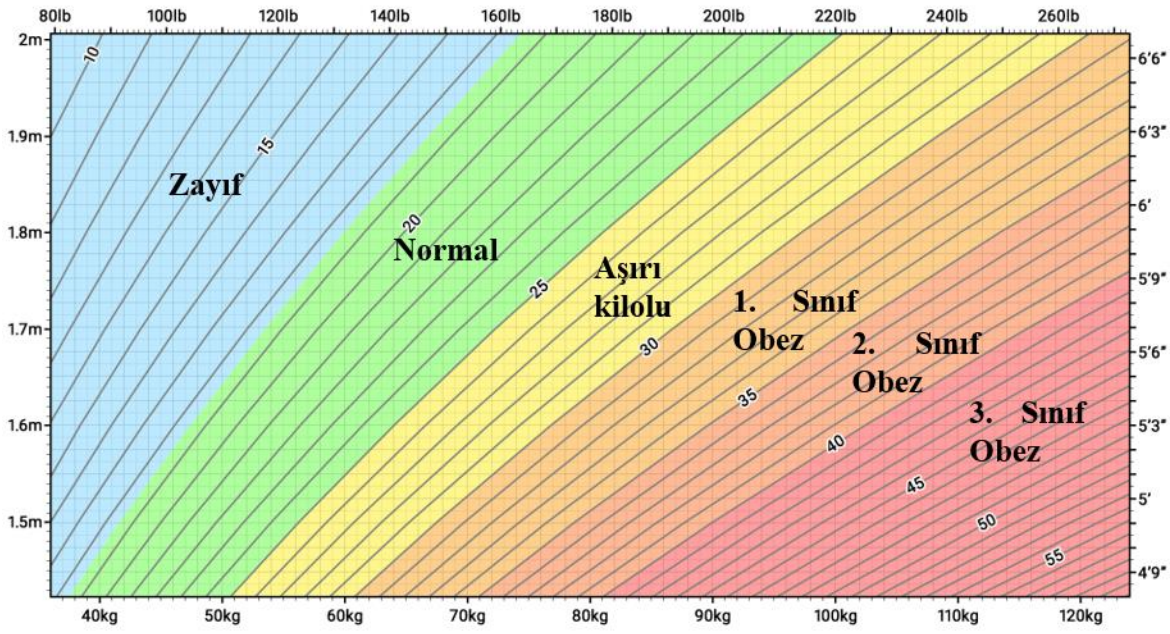
Çizelge 2.2.'de, 2000 yılında yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre VKİ değerleri listelenmektedir (Mohamed vd., 2014).

Çizelge 2.2. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre kilo sınıflandırmaları ve VKİ değerleri

Kilo Sınıflandırması	**VKİ***
Zayıf	< 18,5
Normal	18.5-24.9
Aşırı kilolu	25-29.9
1. Sınıf obez	30-34.9
2. Sınıf obez	35-39.9
3. Sınıf obez	40 ≥

*VKİ ≥ 40-44.9 morbid obezite, VKİ ≥ 45 ya da 50 ise süper obez

VKİ'nin boy ve kiloya bağlı değişimine ait grafik Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. VKİ'nin boy ve kiloya bağlı değişimini gösteren grafik

- **Bel-Kalça Oranı (BKO)**

BKO değeri, obezitenin bir ölçütü olarak kullanılır, DSÖ, erkekler için 0.90'ın üzerinde ve kadınlar için 0.85'in üzerinde bir BKO değerini abdominal obezite olarak tanımlar. BKO değeri 0.8'in üzerinde olan kadınlar ve 1,0'in üzerinde olan erkekler, yağ dağılımları nedeniyle sağlık açısından riskli grupta yer alır. BKO'nun, kardiyovasküler hastalıklarda, bel çevresi ölçüsü ve vücut kitle indeksine göre daha iyi bir gösterge olduğu gösterilmiştir. BKO, vücut yağının merkezi dağılımıyla ilgilenen daha yeni bir kanıttır. Beldeki yağ dağılımı, BKO değerinin hesaplanması ile değerlendirilmektedir (Brown vd., 1996; Mohamed vd., 2014).

  - BKO = Bel Çevresi / Kalça Çevresi

2.1.3. Kanda bulunan potansiyel obezite biyobelirteçlerinin tayin yöntemleri

2.1.3.1. ELISA yöntemi

Obezite ile ilişkilendirilen biyobelirteçleri belirlemede en sık kullanılan tayin metodu enzim-bağlı immünosorbent (ELISA) testidir. ELISA tekniği, İsveç'teki Stockholm Üniversitesi'nde baş araştırmacı Peter Perlmann ve Eva Engvall tarafından kavramsallaştırılıp geliştirilmiştir (Lequin, 2005).

ELISA tekniği, antijenlerin ve antikorların tayini için güvenilir ve çok yönlü bir tayin yöntemidir. Antikorların neredeyse sonsuz bir antijenik yapı dizisini tanıma konusundaki aşırı ayırt edici gücü nedeniyle, ELISA'nın analit ölçümüne uygulanması neredeyse sınırsızdır (Paulie vd., 2006; Reen, 1994). ELISA testlerinin, tayini yapılacak uygulamaya bağlı olarak birçok farklı türü geliştirilmiştir. Uygulamada ELISA, doğrudan, dolaylı, sandviç ve yarışmalı olarak dört ana tipte sınıflandırılmaktadır (Paulie vd., 2006).

Literatürde obezite ilişkili biyobelirteçleri belirlemek için ELISA tekniğinin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Lesná ve arkadaşları 2015 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada Omentin plazma seviyelerinin, kilo verme programı sırasında önemli ölçüde artış gösterdiğini, bundan yola çıkarak Omentin plazma dinamiklerinin, kolesterol metabolizması ile yakın ilişkide olabileceğini rapor etmişlerdir (Lesná vd., 2015).

Moreno-Navarrete ve arkadaşları, 17 kadın ve 18 erkekten oluşan toplam 35 obez gönüllünün yer aldığı çalışmalarında, dolaşımdaki bazal Omentin konsantrasyonlarının, VKİ, vücut ağırlığı, yağ kütlesi, dolaşımdaki leptin konsantrasyonu ve açlık insülin seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiğini, dolaşımdaki Omentin konsantrasyonunun, kilo kaybından sonra önemli ölçüde arttığını tespit etmişler; Omentin'in bu artışını, gelişmiş insülin duyarlılığı ve azalmış VKİ ile ilişkilendirmişlerdir (Moreno-Navarrete vd., 2010).

Bir diğer çalışmada, Pan ve arkadaşları, farklı seviyelerde glukoz regülasyonu olan 151 hastanın serum Omentin seviyelerini test etmek ve serum Omentin seviyeleri ile VKİ, glikolize hemoglobin (HbA1c), plazma glukozu, insülin direnci indeksi (HOMA-IR), TNF-α ve IL-6 seviyeleri arasındaki ilişkiyi analiz etmek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Omentin-1, TNF-α ve IL-6 proteinlerinin seviyeleri ticari olarak temin edilen ELISA kitleri kullanılarak ölçülmüş; yapılan istatistik analizler sonucunda, serum Omentin seviyelerinin bozulmuş glukoz regülasyonu olan kişilerde azalış gösterdiğini ve Omentin eksikliğinin, insülin direnci ve tip 2 diyabet gelişimine katkıda bulunabileceğini rapor etmişlerdir (Pan vd., 2010).

Han ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, yeni teşhis edilmiş 102 tip 2 diyabet hastasında, serum Chemerin düzeyleri ile klinik ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. Serum Chemerin seviyelerinin, VKİ, bel çevresi, viseral yağ kalınlığı, insülin seviyeleri, insülin direncinin homeostaz modeli değerlendirmesi, trigliserit seviyeleri ve yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein ile önemli derecede pozitif korelasyon gösterirken, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol ile önemli derecede negatif korelasyon gösterdiğini rapor etmişler; Chemerin'in, metabolik sendrom bileşenleriyle bağlantılı olduğunu; obezite ve tip 2 diyabet olan deneklerde özellikle viseral yağ dokusu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (Han vd., 2016).

Bununla birlikte, ELISA'ya dayalı teşhisler zaman alıcıdır, pahalıdır, uzman personel gerektirir ve sıklıkla çapraz reaktivite gösterirler (Leva-Bueno vd., 2020).

2.1.3.2. İmmünosensörler

İmmünosensörler, bir elektrod yüzeyine bağlı bir antijenin spesifik antikoruna bağlanmasını saptayan analitik cihazlar olarak tanımlanırlar. İmmünosensörler, immünolojik teste benzer şekilde, kararlı bir kompleks oluşturmak için antijenlerin antikorlar tarafından spesifik olarak tanınmasına dayanan en önemli afinite biyosensör sınıflarından birini oluştururlar. Dönüştürücü tipine bağlı olarak immünosensörler; elektrokimyasal, optik, mikrogravimetrik ve termometrik olarak dört tipte sınıflandırılır. Elektrokimyasal immünosensörlerin geliştirilmesi için en yaygın kullanılan biyoelementler antikorlardır; bunu aptamerler ve mikroRNA'lar takip etmektedir. Erken tanı yapabilmek için, herhangi bir numune ön işlemi olmaksızın doğrudan bir numunede peptitleri ve proteinleri kantitatif olarak tespit edebilirler. Bu doğrudan tespit, proteinlerin antikorlar, aptamerler veya mikroRNA'lar ile spesifik etkileşiminden yararlanan yöntemlerle gerçekleşir (Cristea vd., 2015; Gizeli & Lowe, 1996; Karunakaran vd., 2015).

İdeal bir immünosensör sistemi, gerekli konsantrasyon aralığında ve makul bir süre içinde antijeni algılama ve miktarını belirleme yeteneğine, harici olarak eklenen reaktifler olmadan bağlanma olayını iletme kapasitesine, aynı cihazda ölçümü tekrarlama kapasitesine ve gerçek numunelerde antijenin spesifik bağlanmasını tespit etme yeteneğine sahip olmalıdır (Gizeli & Lowe, 1996). Literatürde bazı obezite biyobelirteçleri için geliştirilmiş immünosensör çalışmaları rapor edilmiştir.

Çocukluk obezitesini belirlemek amacıyla hipotalamik Nöropeptit Y hormonunun tespiti için yapılan bir çalışmada, bir analiz tekniği olarak etiketsiz bir impedimetrik immün algılama sistemi olarak bir biyosensör geliştirilmiştir. İmmobilizasyon işlemi, indirgenmiş grafen oksidin yeni bir grafit kağıt elektrot üzerine adsorpsiyonuna dayanan biyosensör ile, Anti-nöropeptit Y antikorları elektrot yüzeyi üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve insan serumunda nöropeptit Y antijeninin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen immünosensör, nöropeptit Y antijeni için 0.005-10 pg/mL doğrusal aralığa, 0.11 fg/mL düşük tespit limitine, yüksek tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, uzun depolama kararlılığına ve iyi derecede yeniden kullanılabilirliğe sahiptir (B. Özcan & Sezgintürk, 2022).

Bir diğer çalışma, bir obezite biyobelirteci olan Adiponektin'i gerçek insan serumunda belirlemek için grafit kağıt temelli, tek kullanımlık, yeni ve hassas bir biyosensör sistemini rapor etmektedir. Gerçek insan serumunda adiponektin tayini için tasarlanan biyosensörün, 0.05-25 pg/mL tespit aralığına, 0.0033 pg/mL düşük tespit limitine, iyi doğrusallığa, uzun süreli depolama ömrüne (10 hafta), yüksek yeniden kullanılabilirliğe ve pikogram seviyelerinde adiponektin konsantrasyonlarını tespit etme başarısına sahip olduğu rapor edilmiştir (B. Özcan & Sezgintürk, 2021).

Martinez-Garcia ve arkadaşları, pankreatik B hücrelerinden insülin ile birlikte salgılanan, adipozite, açlık ve tokluk ile ilgili bir adacık amiloid polipeptit hormon olan Amilin tayini için amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Antikorun amiline karşı kovalent bağlanmasını kolaylaştıran bol miktarda karboksil grubu içeren elektropolimerize poli(pirol propiyonik asit) (pPPA) ile işlevselleştirilmiş yüzey baskılı karbon elektrot temelli immünosensörün, işlevinde yer alan parametreler optimize edilmiş ve elektrotlar, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan biyosensör 1.0 fg/mL-50 pg/mL tespit aralığına ve 0.92 fg/mL tespit limitine sahip olduğu ve bu değerin, amilin için mevcut ELISA immünolojik testleri için rapor edilen minimum tespit edilebilir konsantrasyondan yaklaşık 7000 kat daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Martínez-García vd., 2018).

Sung ve arkadaşları, özellikle yağ dokularında üretilen, obezite ve obezite bağlantılı hastalıklarla ilişkili bir biyobelirteç olarak kabul edilen bir peptit hormonu olan Leptin'in kanda tespiti için o-Fenilendiamin (oPD) modifiyeli yüzey baskılı altın elektrot temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. 0.1-20 ng/mL tespit aralığına ve 0.033 ng/mL tespit limitine sahip olan biyosensöre ait optimum parametreler döngüsel voltametri ve kare dalga voltametri (SWV) teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Fare kan serumunda Leptin tayini için önerilen sandviç ELISA temelli elektrokimyasal biyosensör, ticari Leptin ELISA ölçümüne kıyasla daha yüksek kararlılığa, hassasiyete, seçiciliğe ve etkinliğe sahiptir (Sung & Heo, 2020).

Kardiyovasküler hastalıkların, bağışıklık bozukluklarının, eklem rahatsızlıklarının, özellikle obeziteye bağlı patolojilerin önlenmesi ve tedavisi için, obezite biyobelirteçlerinden biri olan Adiponektin seviyesindeki düşüşün bir biyosensör ile erken tespiti önem taşımaktadır. Bu amaçla, İnce ve arkadaşları, benzersiz bir şeffaf

iletken malzeme olan indiyum kalay oksit (ITO) ile kaplanmış polietilen tereftalat (PET) levhaları çalışma elektrotu olarak kullanarak son derece ucuz ve esnek bir malzeme ortaya sunmuşlardır. Elektrot yüzeyine Anti-Adiponektin immobilizasyonunu mümkün kılabilmek için etkili bir organosilan ajanı olan 3-glisidoksipropiltrimetoksisilan (3-GOPS) ile elektrot yüzeyinde kararlı bir tabaka üretilmiş, Anti-Adiponektin'in bu tabakalar üzerine immobilizasyonu Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) teknikleri kullanılarak kanıtlanmıştır. Optimal koşullar altında hazırlanan immünosensör, 25 pg/mL-2500 pg/mL gibi geniş bir tayin aralığına ve 148 pg/mL tespit limitine sahip olup, gerçek insan serum örneklerine uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (İnce & Sezgintürk, 2021).

Bir başka çalışmada, Nadri ve arkadaşları, kalp hastalığı da dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarla bağlantılı güçlü bir inflamatuar adipokin olan TNF-α tespiti için, bu çalışmada PCL-PPY-MWCNT (polikaprolakton/polipirol/çok duvarlı karbon nanotüp) elektro-döndürülmüş nano elyafına dayalı yeni bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. TNF antikoru, bu çalışmada PCL-PPY-MWCNT elektro-döndürülmüş iskele elektrot yüzeyine sabitlenmiş ve TNF, CV ve EİS teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Biyosensörün, TNF-α'yı, 1-1000 pg/ml lineer aralığında ve 1 pg/ml tespit limiti ile saptadığı, bu verilerin de geliştirilen biyosensörü kalp krizlerini tespit etmede umut verici kıldığı belirtilmiştir (Nadri vd., 2022).

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonlar ile analitleri tespit eden ve bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürünleri elektriksel, optik veya termal sinyallere dönüştüren cihaz sistemleri olarak tanımlanabilirler. Bu sistemler hızlı algılama, taşınabilirlik ve hasta üzerinde uygulama esnekliği gibi bazı avantajlar sunar (Hassani vd., 2017; Okafor vd., 2014; Salek-Maghsoudi vd., 2018).

Analitik deneyler için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), ELISA veya enzim immünoassay (EIA) gibi klasik yaklaşımlar niceliksel olmasına rağmen nitel veriler sunar. Ayrıca, uzun işlem süresi, uzman personel gerektirmesi ve aynı anda analiz edilecek numune sayısının az olması, bu yöntemlerin ek olumsuz noktaları olarak kabul edilir. Bu nedenle, hedefine göre yüksek hassasiyet ve

seçicilik, hızlı analiz süresi, kullanım kolaylığı, kolay uygulanabilirlik ve uygun maliyetli olma gibi çeşitli avantajlar sunan mevcut tespit yaklaşımlarına alternatif olarak biyosensör temelli cihazlar üretilmiştir (Kumar vd., 2015; Salek-Maghsoudi vd., 2018).

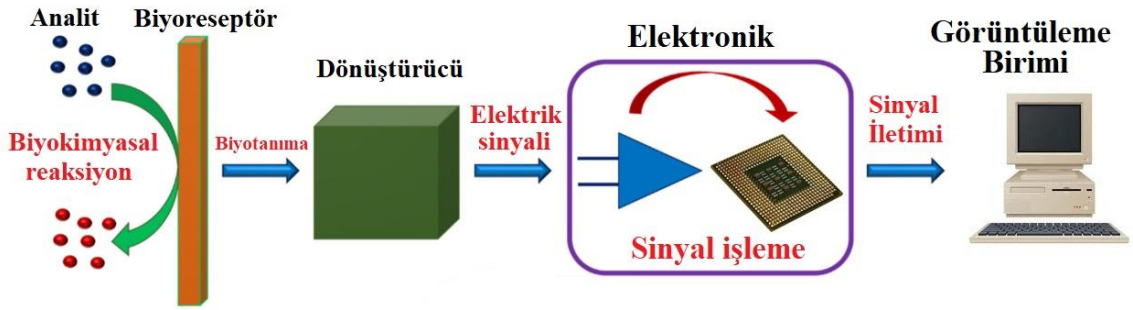
Biyosensörler farklı elektrot türlerinin kullanılmasıyla çeşitli boyutlarda ve şekillerde üretilebilirler. Virüsleri, antijenleri, patojenleri ve çeşitli hastalıklar için biyobelirteçleri tespit edip değerlendirebilirler (Kulkarni vd., 2022). Sistem, bir analit, biyolojik materyal, bir dönüştürücü, bir elektronik modül ve bir görüntüleme birimi içerir. Test edilen malzeme bir elektrolitik çözeltiye eklendiğinde, bileşenleri tespit edilir. Biyotanıma, analit ve biyolojik bileşenler arasındaki etkileşim sırasında bir sinyal oluştururken, dönüştürücü bir biyolojik tanıma sinyalini biyolojik veya kimyasal bir hedefin varlığını gösteren ölçülebilir bir elektriksel forma dönüştürür. Analit-biyoreseptör etkileşimleri, dönüştürücüler tarafından üretilen elektriksel veya optik sinyallerle orantılıdır; çıktı verileri grafiksel, sayısal veya tablo şeklinde olabilir (Kulkarni vd., 2022; Naresh & Lee, 2021).

Tipik bir biyosensör (a) analit, (b) biyoreseptör, (c) dönüştürücü, (d) elektronik ve (e) görüntüleme biriminden oluşur.

a) **Analit:** Bileşenlerinin tespit edilmesi istenilen ilgili madde (örneğin glukoz, amonyak, alkol, laktoz ya da bir protein vb.).
b) **Biyoreseptör:** Hedef molekülü tanıyabilen bir biyomolekül veya biyolojik bir element, biyoreseptör olarak bilinir (örneğin enzimler, hücreler, aptamerler, deoksiribonükleik asit ve antikorlar vb.). Biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşim sırasında sinyal üretimi sürecine (ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişimi, bitki veya hayvan dokusu ve mikrobiyal ürünler vb.) biyotanıma denir.
c) **Dönüştürücü:** Bir biyosensörde anahtar unsurdur. Biyolojik tanıma olayını, kimyasal veya biyolojik bir hedefin miktarı veya mevcudiyeti ile bağlantılı olan ölçülebilir bir sinyale dönüştürür. Bu enerji dönüştürme işlemi, sinyalizasyon olarak bilinir. Dönüştürücüler, analit-biyoreseptör etkileşimlerinin sayısıyla orantılı olarak sinyal üretirler ve çalışma prensibine göre genel olarak elektrokimyasal, optik, termal, elektronik ve gravimetrik olarak sınıflandırılırlar.
d) **Elektronik Modül:** Dönüştürülen sinyalin işlendiği kısımdır. Dönüştürücüden elde edilen elektrik sinyalleri çoğaltılır ve sayısal verilere dönüştürülür.

e) **Görüntüleme:** Görüntüleme birimi, analit miktarı ve türüne göre üretilen yanıtın kullanıcı tarafından okunabilmesi ve anlaşılabilmesi için çıktı oluşturan bir bilgisayar veya yazıcı gibi bir kullanıcı yorumlama sisteminden oluşur. Son kullanıcı ön koşuluna bağlı olarak, çıktı sayısal, grafiksel veya tablo şeklinde bir değer veya bir şekil şeklinde olabilir (Naresh & Lee, 2021).

Bütün bu birimleri içeren tipik bir biyosensöre ait şematik gösterim Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5 Bir biyosensörün şematik diyagramı

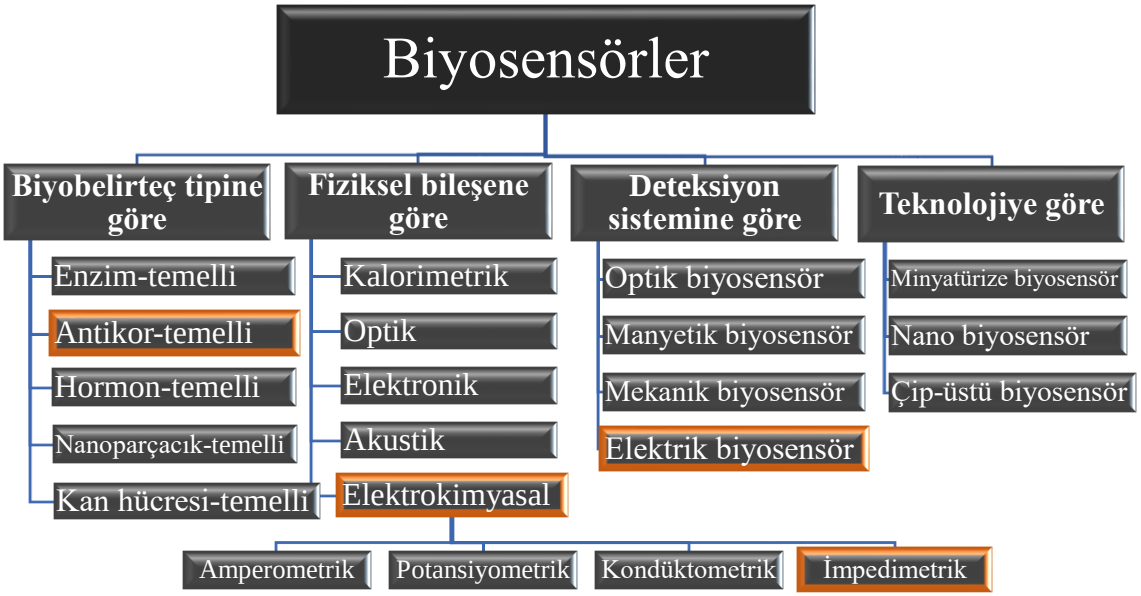
Etkili bir biyosensör sistemi geliştirmek için belirli statik ve dinamik gereksinimlere ihtiyaç vardır. Bu spesifikasyonlara dayanarak, biyosensörlerin performansı ticari kullanımlar için optimize edilebilir.

- **Seçicilik:** Seçicilik, bir biyosensör için bir biyoreseptör seçerken dikkate alınması gereken çok önemli bir özelliktir. Bir biyoreseptör, girişimlere sebep olabilecek maddelerden oluşan bir numunede belirli bir hedef analit molekülünü tespit edebilir.
- **Hassasiyet:** Numunede analit varlığını doğrulamak için en az sayıda adımda ve düşük konsantrasyonlarda (ng/mL veya fg/mL) doğru şekilde saptanabilen/tanımlanabilen analit miktarı.
- **Doğrusallık:** Ölçülen sonuçların doğruluğuna katkıda bulunur. Doğrusallık ne kadar yüksek olursa, substrat konsantrasyonu tespiti o kadar yüksek doğrulukta olur.
- **Tepki süresi:** Sonuçların %95' inin elde edilmesi için geçen süre.

- **Tekrar üretilebilirlik:** Kesinlik ve doğruluk ile karakterize edilir. Biyosensörün, aynı numune birden fazla kez ölçüldüğünde aynı sonuçları üretme yeteneğidir.
- **Kararlılık:** Kararlılık, sürekli izlemenin gerekli olduğu biyosensör uygulamalarında temel özelliklerden biridir. Kararlılığı etkileyen faktörler, biyoreseptörün afinitesi ve biyoreseptörün zamanla bozulmasıdır.

2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörlerin sınıflandırılması çok-disiplinli bir alandır ve bu nedenle birçok sınıflandırma çeşidi vardır. Biyosensörlerin sınıflandırılmasında çeşitli kriterler yer almaktadır ve ana hatlarıyla sınıflandırma şeması Şekil 2.6'da verilmiştir (Naresh & Lee, 2021).



Şekil 2.6 Biyosensörlerin sınıflandırılması (Kulkarni et al., 2022)

Biyotanıma ilkesine göre, biyosensörler katalitik biyosensörler ve afinite temelli veya katalitik olmayan biyosensörler olarak sınıflandırılır (Nguyen vd., 2019). Katalitik bir biyosensörde, analit-biyobileşen etkileşimi bir biyokimyasal reaksiyonda meydana gelen değişimlerin izlenmesini esas alır. Bu tip biyosensörler, enzimlerin, mikroorganizmaların, dokuların ve tüm-hücrelerin analizine imkân verir. Afinite temelli biyosensörde, analit reseptöre geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve etkileşim sırasında

yeni bir biyokimyasal reaksiyon ürünü oluşmaz. Bu sensör tipi, tespit için hedef olarak antikorlar, hücre reseptörleri ve nükleik asitleri içerir (Naresh & Lee, 2021; Shukla vd., 2016).

- **Antikor-temelli Biyosensörler**

Antikorlar, geniş uygulama alanları ve güçlü antijen-antikor etkileşimleri nedeniyle yirmi yılı aşkın süredir kullanılan afinite biyotanıma elemanlarıdırlar. Antikorlar, disülfit bağları ile birbirine bağlanmış iki ağır ve iki hafif polipeptit zincirinden oluşan "Y" şeklinde immünoglobulin (Ig) yapısına sahiptirler. Ağır zincirlerdeki farklılıklara dayalı olarak beş antikor sınıfı tanımlanmıştır: IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE (Schroeder & Cavacini, 2010). Ligand olarak immobilize bir antikora sahip olan veya antikor-antijen etkileşimi üzerinde işlev gören biyosensörler, immünosensörler olarak adlandırılır.

İmmünosensörler etiketsiz (non-labeled) ve etiketli (labeled) olarak sınıflandırılır. Etiketlenmemiş immünosensörler, antijen-antikor etkileşiminin neden olduğu fiziksel değişiklikleri tahmin ederek antijen-antikor kompleksini spesifik olarak belirlemek için kullanılırlar. Etiketli immünosensörler ise, hassas bir şekilde tespit edilebilir bir etiket içerirler. Antijen-antikor kompleksi, etiketin analiz edilmesiyle hassas bir şekilde değerlendirilir (Lim & Ahmed, 2016, 2019; Naresh & Lee, 2021).

Çizelge 2.3'te, literatürdeki bazı antikor-temelli biyosensör çalışmalarından örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı antikor-temelli biyosensör örnekleri

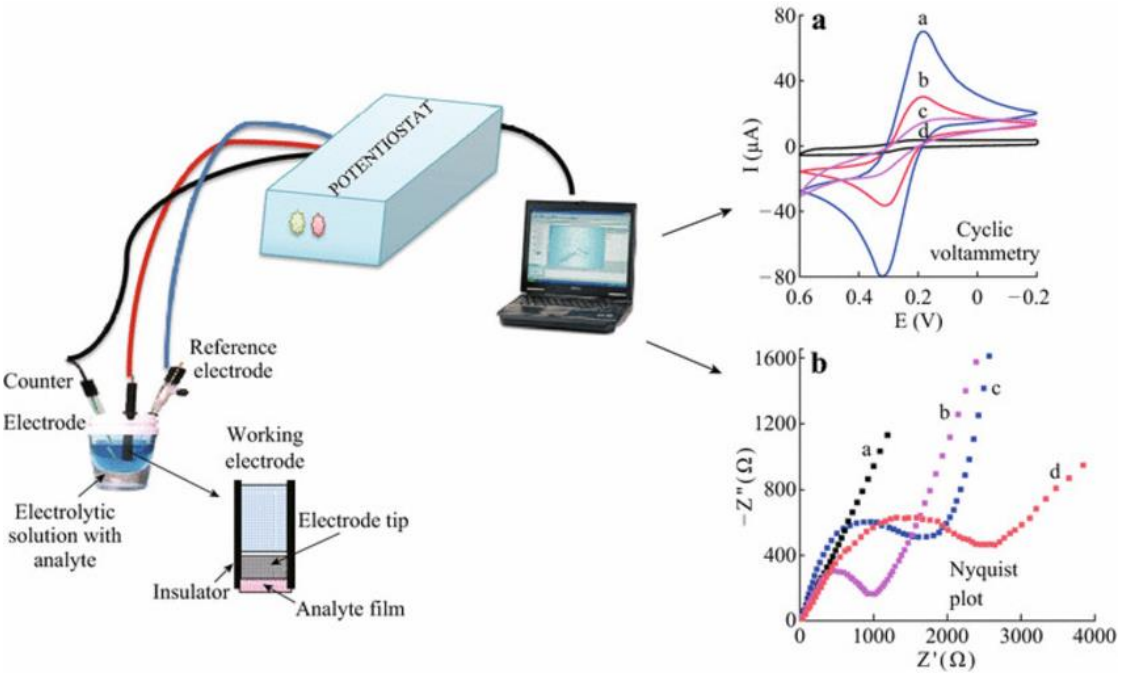
Antijen	Antikor	Ölçüm tipi	Tayin aralığı	Referans
Paratiroid hormonu (PTH)	Anti-PTH	EİS	10-60 fg/mL	(Özcan & Sezgintürk, 2015)
TNF-α	Anti-TNF-α	Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)	0.02-200 ng/mL	(Yin vd., 2011)
SARS-CoV-2	Anti-SARS-CoV-2	DPV, EİS	15.6-125 µg/mL	(Trafela vd., 2022)
Adrenokortikotropik hormon (ACTH)	Anti-ACTH	EİS	100 fg/mL-100 pg/mL	(N. Li vd., 2017)
Fumonisin B1 (FB1)	Anti-FB1	DPV	0.2-4.5 µg/mL	(Lu vd., 2016)
Sam68	Anti-Sam68	EİS	1-5 µg/mL	(Sumithra vd., 2020)
Karsinoembriyonik antijen (CEA)	Anti-CEA	TeraHertz Zaman-Alan Spektroskopisi (THz-TDS)	0.1-100 ng/ml	(Lin vd., 2021)
İnsan lökosit antijeni (HLA)	Anti-HLA	İyon duyarlı alan etkili transistör (ISFET)	1.98-40 µg/mL	(Min vd., 2022)
Leptin	Anti-Leptin	DPV	0.001-1000 pg/mL	(C. Zhang vd., 2022)
Kardiyak troponin 1 (cTnI)	Anti-cTnI	Silikon nanotel alan etkili transistör (SiNW-FET)	0.025-0.5 ng/mL	(Chang vd., 2020)

- **Elektrokimyasal Biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler en çok araştırılan ve kullanılan, analit ve dönüştürücünün elektrokimyasal özelliklerine dayanan yüksek hassasiyet, seçicilik ve algılama kabiliyetine sahip biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler yüksek hassasiyet, seçicilik ve algılama kabiliyeti sergilerler. Bu biyosensörlerde, dönüştürücü yüzeyinde biyoreseptör ile analit arasında gerilim, akım, impedans ve kapasitans açısından saptanabilir elektrokimyasal sinyaller üreten bir elektrokimyasal reaksiyon meydana gelir (Malhotra & Ali, 2018; Shanker vd., 2014). İletim ilkesine dayalı olarak, elektrokimyasal biyosensörler, amperometrik, impedimetrik, kondüktometrik ve voltametrik olarak sınıflandırılırlar (Chaubey & Malhotra, 2002; Grieshaber vd., 2008; Malhotra & Ali, 2018; Naresh & Lee, 2021; Shanker vd., 2014).

- **İmpedimetrik biyosensörler**

İmpedimetrik biyosensörler, küçük bir sinüzoidal uyarma sinyali uygulandığında elektrot/elektrolit arayüzünde üretilen elektriksel impedansı ölçer. Sensör elektrodunda düşük genlikli alternatif akım geriliminin uygulanmasını içerir ve ardından faz içi/dışı akım tepkisi, bir impedans analizörü kullanılarak frekansın bir fonksiyonu olarak ölçülür (Grieshaber vd., 2008; Naresh & Lee, 2021; Radhakrishnan vd., 2014).



Şekil 2.7. Bir impedimetrik biyosensöre ait örnek gösterim (P. Singh vd., 2016)

Biyosensörler, elektrotların yüzeyindeki biyolojik bir reaksiyonu izlemek için yapılmıştır. Çeşitli biyomoleküller, farklı derecelerde başarı ile impedimetrik biyosensörlerin temel algılama elemanları olarak kullanılmıştır. İmpedimetrik biyosensörler geliştirmek için özellikle enzimler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve mikroorganizmalar elektrotların yüzeyine immobilize edilmiştir. Potansiyel olarak faydalı impedimetrik biyosensör tasarlamak için çeşitli stratejiler uygulanmıştır (Guan vd., 2004).

Aşağıda yer alan Çizelge 2.4'te, literatürdeki bazı impedimetrik biyosensör çalışmalarından örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı impedimetri temelli biyosensör örnekleri

Analit	**Antikor**	**Ölçüm tipi**	**Tayin aralığı**	**Referans**
ST2	Anti-ST2	EİS, SFI	0.1-100 fg/mL	(Demirbakan & Sezgintürk, 2021)
Prostat spesifik antijen (PSA)	PSA aptamer	EİS	1.0-1500 fg/mL	(Özyurt vd., 2022)
Adiponektin	AdipoR1	EİS	0.025-1 µmol/L	(Brazaca vd., 2016)
Protein deglycase (DJ-1)	Anti-DJ-1	EİS, SFI	4.7-4700 fg/mL	(Sonuç Karaboğa & Sezgintürk, 2021)
CEA	Anti-CEA	EİS, DPV	10 pg/mL-100 ng/mL	(J. Zhang vd., 2022)
C-reaktif protein (CRP)	Anti-CRP	EİS, SFI	10 ng/mL-10 µg/mL	(Rajesh vd., 2017)
PTH	Anti-PTH	EİS, SFI	10-60 fg/mL	(B. Özcan vd., 2014)

Aktive olmuş C kinaz 1 reseptörü (RACK1)	Anti-RACK1	EİS	0.036-2.278 pg/mL	(Törer vd., 2018)
Vitellogenin (Vtg)	Anti-Vtg	EİS	1.0-8.0 ng/mL	(Darain vd., 2004)
İnsan serum albümini (HSA)	Anti-HSA	EİS	1,84-368,6 ng/ml	(Wu vd., 2005)

Biyosensörler için, EİS'nin amperometriye göre bazı önemli avantajları vardır. Doğrudan amperometrik biyosensörler için, bir oksidoredüktaz enzimi iletken bir elektrotta immobilize edilir ve biyolojik olarak aracılık edilen bir yükseltgeme/indirgeme reaksiyonu sırasında elektron transferi saptanır. Bununla birlikte, aktif bölge hem elektrot yüzeyine yakın olmalı hem de analit çözeltisine kolayca erişilebilir olmalıdır. Çoğu durumda, elektron transferi elektrot yüzeyinden uzakta gerçekleşir ve elektron transfer hızları mesafe ile üstel olarak azalır (Armstrong & Wilson, 2000). Bu sorun, redoks mediyatörlerinin kullanılmasıyla azaltılabilir, ancak bu durumda tespit, mediyatör kütle transferi ile sınırlı hale gelir. Dolaylı amperometrik biyosensörler, genellikle hidrojen peroksit gibi biyolojik olarak katalize edilmiş bir reaksiyonun ürününü algılarlar. Bununla birlikte, analit genellikle elektrokimyasal olarak yükseltgenebilen veya indirgenebilen ek türler (örneğin üreat veya askorbat) içerirler; bu nedenle, dolaylı amperometrik biyosensörler seçici değildir. Biyotanıma için impedans tespitinin en önemli avantajlarından biri, antikor-antijen bağlanmasının doğrudan tespit edilebilmesi ve immünosensörlerin geliştirilmesine izin vermesidir (Suni, 2008).

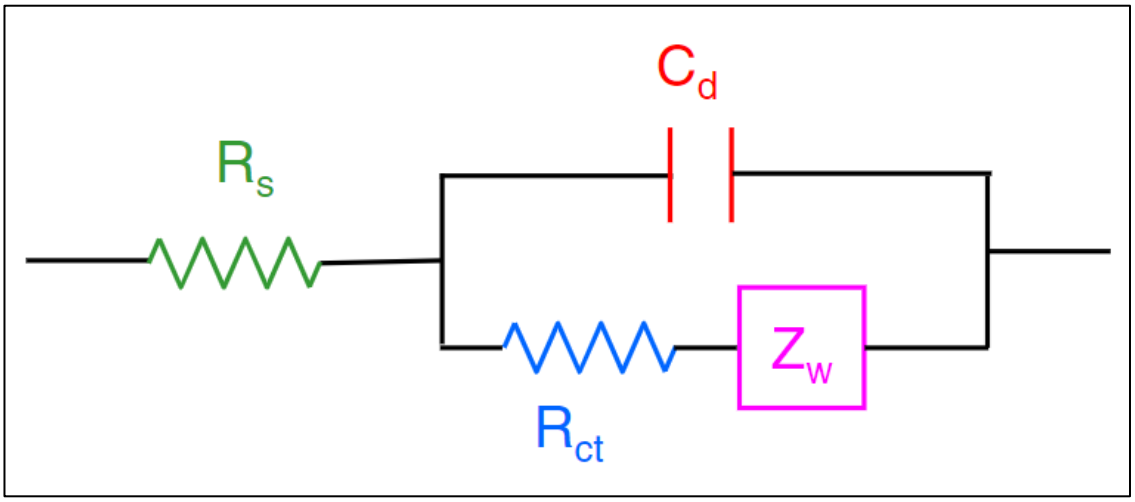
2.2.2. Elektrokimyasal yöntemler

2.2.2.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, dengedeki bir sistemin küçük genlikli bir sinüzoidal uyarma sinyaliyle pertürbasyonuna dayalı olarak, malzemelerin hem dirençli hem de kapasitif özelliklerinin analizini kapsar (Bott, 2001; Guan vd., 2004; Katz & Willner, 2003). EİS'nin potansiyeli, sistemin impedansının çok çeşitli alternatif akım frekansları üzerinden taranabilmesidir. İmpedans spektrumlarının yorumlanması için

eşdeğer devre modellerinden yararlanılır ve kaplamaların, pillerin, yakıt hücrelerinin ve korozyon olaylarının karakterizasyonu, analizi ve incelenmesi için kullanılır. Ayrıca elektrot kinetiğini, iletken polimerleri, yarı iletkenleri, sensörleri, hayvan ve bitki dokularını ve genel malzemeleri araştırmak için bir araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Guan vd., 2004). İmpedans spektroskopisi, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektriksel özelliklerini araştırmak için de etkili bir yöntem sağlar.

İmpedans sonuçları genellikle Şekil 2.8'de gösterilen, basit elektrokimyasal sistemleri yorumlamak için kullanılan sanal Randles devresi gibi eşdeğer direnç ve kapasitör devrelerine uygulanır (Randles, 1947; Suni, 2008). Bu eşdeğer devre, Şekil 2.9'da gösterilen ve sistem dinamiği hakkında görsel bilgi sağlayan Nyquist grafiğini verir. Şekil 2.8'de ve Şekil 2.9'da Rct, elektron transfer hızıyla ters orantılı olan yük transfer direncini; Cd, çift katmanlı kapasitansı; Rs, çözelti fazı direncini ve Zw, kütle transfer sınırlamalarından kaynaklanan Warburg impedansını ifade eder (Suni, 2008).



Şekil 2.8. Randles eşdeğer devre modeli (Suni, 2008)

Rs, özellikle elektrolit direncinden kaynaklanır ve esas olarak iletkenlik sensörlerinde analitik olarak kullanışlıdır. Etkili difüzyon katsayılarını ölçmek için kullanılabilen Warburg impedansı, analitik uygulamalar için nadiren kullanışlıdır. Şekil 2.8 ve Şekil 2.9'da analit tespiti için en sık kullanılan eşdeğer devre elemanları Rct ve Cd'dir. Ölçülen kapasitans genellikle, analitin bir Au elektrot (C_{Au}) üzerindeki bir algılama katmanına (C_{sens}) bağlanması (C_{anal}) gibi birkaç öğenin seri kombinasyonundan

kaynaklanır. Bu durumda, sürekli olan bir algılama katmanı ve analit katmanı için ölçülen kapasitans şu şekildedir:

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_{Au}} + \frac{1}{C_{sens}} + \frac{1}{C_{anal}} \quad i)$$

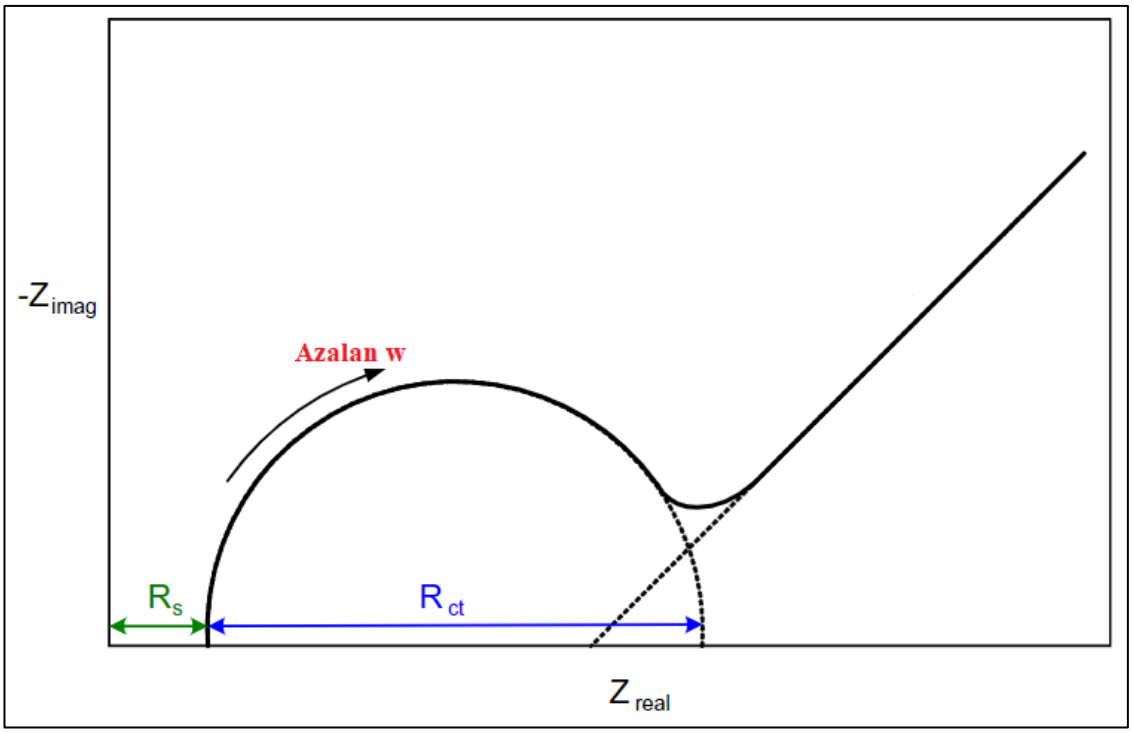
Çoğu durumda, Au elektrot - algılama katmanı arayüzündeki kapasitans büyüktür ve ihmal edilebilir. Bu durumda, hassasiyet analit tabakasının ve algılama tabakasının göreli kapasitansı ile belirlenir. Her bir dielektrik katman için, birim alan başına kapasitans, aşağıdakilere göre katman kalınlığına (t) bağlıdır:

$$\frac{C}{A} = \frac{\varepsilon_d}{t} \quad ii)$$

Burada d, dielektrik katmanın dielektrik sabitidir, bu durumda kapasitans, proteinler veya hücreler gibi büyük analitlerin bağlanmasına karşı en hassastır (Suni, 2008).

Ortaya çıkan verileri göstermenin yaygın bir yolu, impedansın hayali (Z″) bileşenlerine karşı gerçek (Z') bileşenlerinin çizildiği karmaşık düzlem veya Nyquist Grafiğidir (Şekil 2.9).

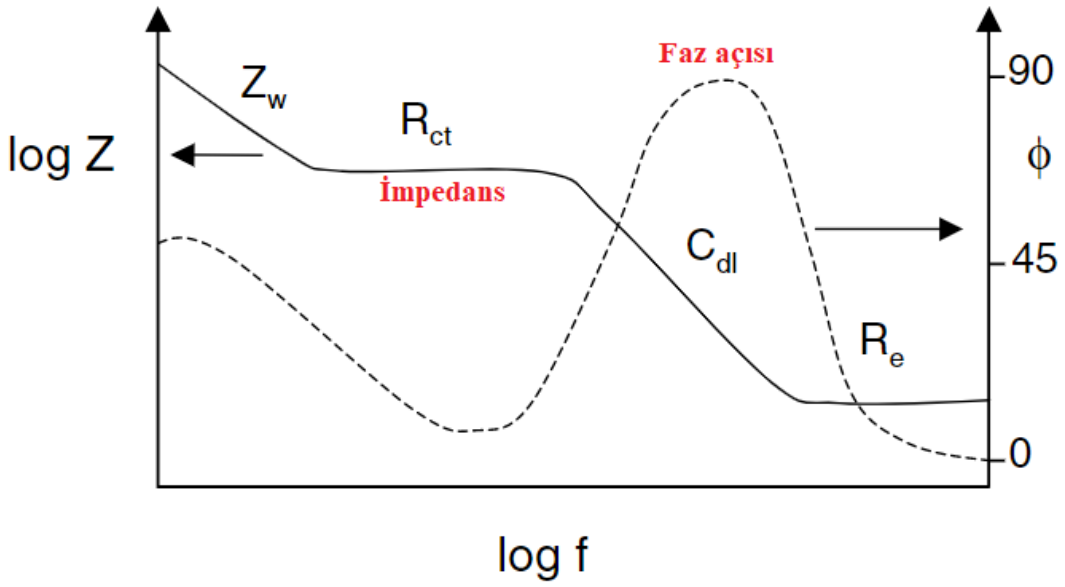
Bu çizimde, yük aktarımı kontrollü bir sürece ilişkin bir yarım daire ile, X ekseni üzerinde Rs ve Rct değerlerini veren ve Zw'den dolayı eğimi 1 olan düz bir çizginin kesişimine ait iki ayrı süreç çok iyi bir şekilde ayırt edilmiştir. Z″'nin maksimum olduğu yarım dairenin tepesindeki frekanstan, faradaik süreç için zaman-gevşeme sabiti (τ) de hesaplanabilir (Fernández-Sánchez vd., 2005).



Şekil 2.9. Randles devresinden ortaya çıkan Nyquist grafiği (Suni, 2008)

İmpedans verilerini sunmanın başka bir yolu, Z'nin mutlak değerinin logaritmasının ve fazın (φ) frekansın (f) logaritmasına karşı çizildiği Bode Grafiğidir (Fernández-Sánchez vd., 2005).

Nyquist grafiği, frekans değiştiğinde impedansın gerçek ve sanal kısımları arasındaki ilişkiyi gösterir. Nyquist grafiğinin birincil dezavantajı, frekans bilgisinin doğrudan gösterilememesidir. Büyüklük ve faz açısı Bode grafikleri, sırasıyla impedansın büyüklüğünün ve faz açısının frekansın bir fonksiyonu olarak nasıl değiştiğini gösterir (Şekil 2.10) (Huang vd., 2016).



Şekil 2.10. Basit bir elektrokimyasal hücrenin impedans davranışını tanımlayan Bode Grafiği

2.2.2.2. Tek nokta frekansta impedans spektroskopisi (SFI)

Tek nokta frekansta impedans, impedansın zamana karşı sabit bir frekansta ölçümüdür. Antikor-antijen arasındaki etkileşimin izlenmesinde sık kullanılan oldukça önemli bir tekniktir. SFI tekniği, biyosensör yüzeyinde zamana bağlı olarak gerçekleşen değişimlerin değerlendirilmesinde kullanılır.

Tek nokta frekansta impedans ölçümünde uygulanacak olan sabit frekans değeri, impedans ölçümü ile elde edilen Bode (Şekil 2.10) grafiğindeki faz kaymasının en yüksek olduğu frekans değeridir (B. Özcan vd., 2014).

SFI tekniği, literatürde yer alan biyosensör çalışmalarının karakterizasyon çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Demirbakan & Sezgintürk, 2020, 2021; Ehzari vd., 2022; Sonuç Karaboğa & Sezgintürk, 2021; Törer vd., 2018).

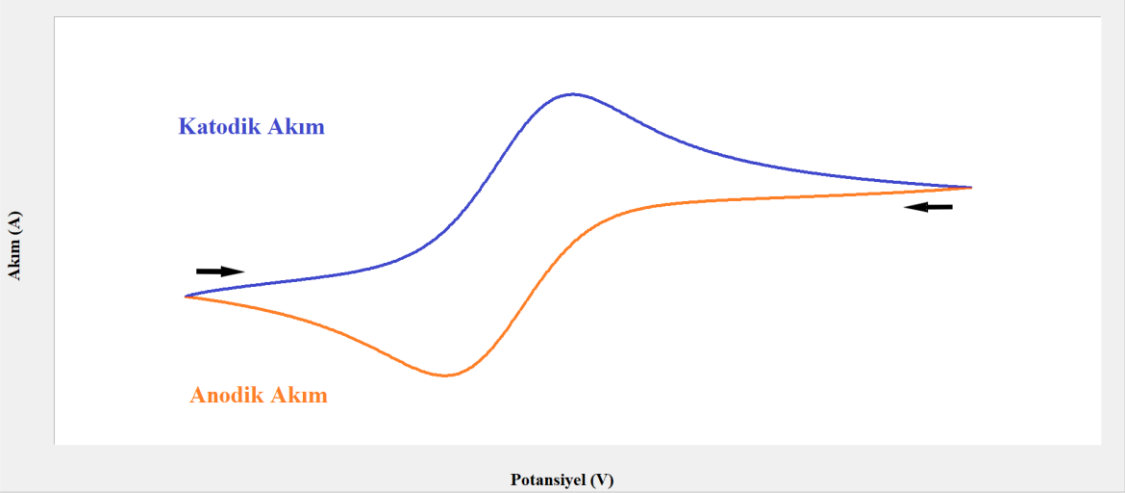
2.2.2.3. Döngüsel voltametri (CV)

Döngüsel voltametri, elektroaktif türlerin incelenmesi için çok yönlü bir elektroanalitik tekniktir. Ölçüm kolaylığı ile birleşen çok yönlülük CV'nin elektrokimya, inorganik kimya, organik kimya ve biyokimya alanlarında yaygın olarak kullanılmasına

neden olmuştur. Döngüsel voltametri genellikle bir bileşik, biyolojik bir malzeme veya bir elektrot yüzeyinin elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesinde gerekli olan ilk tekniktir (Kissinger & Heineman, 1983).

CV, bir tür potansiyodinamik elektrokimyasal ölçüm olup, karıştırılmamış bir çözeltiye daldırılan bir elektrotun potansiyelinin belirli zaman periyotlarında sürekli olarak değiştirilmesi ve ortaya çıkan akımın ölçülmesinden oluşur. Çalışma elektrotunun potansiyeli, doymuş kalomel elektrot veya gümüş/gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl) gibi bir referans elektrota göre kontrol edilir. Döngüsel voltametride, çalışma elektrodu potansiyeli zamana karşı doğrusal olarak artar. Lineer Sweep Voltametrisinden (LSV) farklı olarak, döngüsel voltametride ayarlanan potansiyele ulaşıldıktan sonra, çalışma elektrodu potansiyeli başlangıç potansiyeline geri dönmek için ters yönde hareket eder. Potansiyeldeki bu değişim döngüleri gerektiği kadar tekrar edilebilir. CV ölçümünde, döngüsel voltamogram, çalışma elektrodundaki akımın, uygulanan potansiyele karşı çizileren grafiği olarak elde edilir. Döngüsel voltamogram örneğine ait görüntü Şekil 2.11'de verilmiştir.

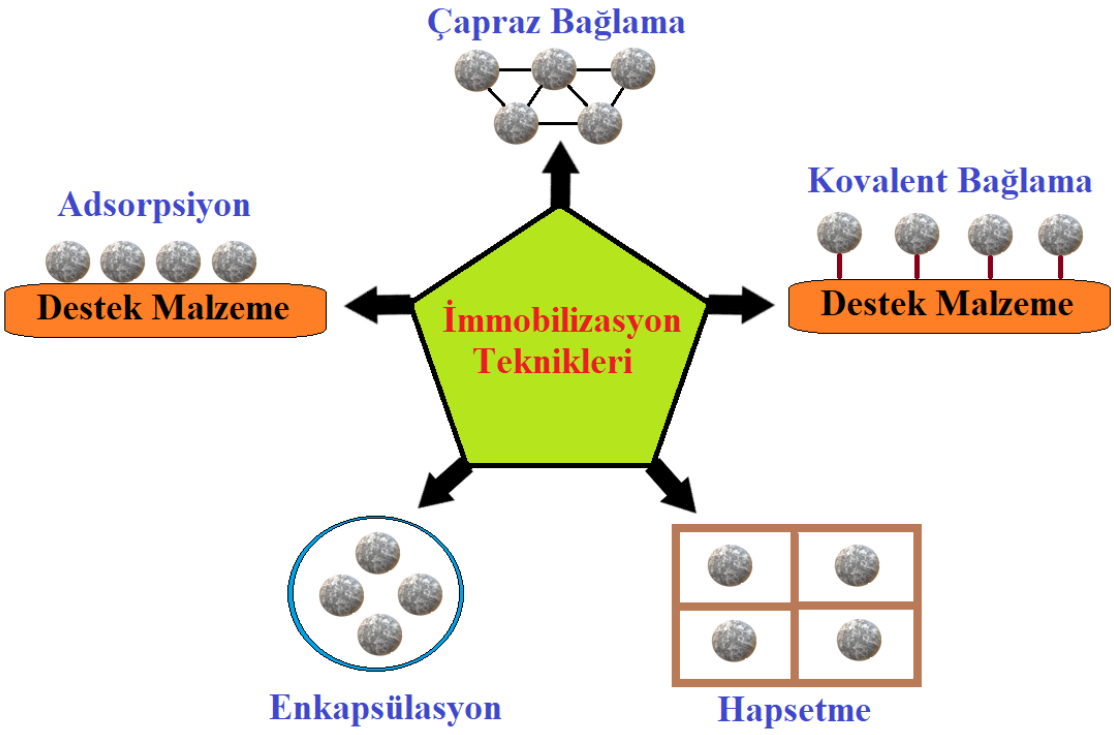
Döngüsel voltametri genellikle çözelti içindeki bir analitin veya elektrot üzerine adsorbe edilmiş bir molekülün elektrokimyasal özelliklerini incelemek için kullanılır (Elgrishi vd., 2018; Heinze, 1984; Kissinger & Heineman, 1983; Nicholson & Shain, 1964).



Şekil 2.11. Döngüsel voltamogram örneği

2.3. Biyosensör oluşturmada kullanılan immobilizasyon yöntemleri

Bir biyosensörün biyotanıma kısmını tasarlamak için biyolojik elementlerin dönüştürücünün yüzeyine immobilize edilmesi gerekmektedir. Sensör hazırlığının en önemli kısımlarından biri, uygun immobilizasyon tekniğinin seçilmesidir. Bunun nedeni, immobilizasyondan sonra biyotanıma elemanının/molekülünün inaktive olma veya sızarak uzaklaşma olasılığının olmasıdır. Biyomoleküller, biyosensör kullanımı sırasında yapılarını, işlevlerini ve biyolojik aktivitelerini koruyabilmelidirler. İmmobilizasyon yöntemleri, fiziksel (geri dönüşümlü) ve kimyasal (geri dönüşümsüz) olmak üzere yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Uygun tekniğin seçimi, seçilen biyotanıma elemanına, dönüştürücüye, fiziksel-kimyasal ortama ve analitin özelliklerine bağlıdır (Arya vd., 2019; Martinkova vd., 2017; Naresh & Lee, 2021). Biyosensörlerde en sık kullanılan immobilizasyon teknikleri Şekil 2.12'de verilmiştir.



Şekil 2.12. Sık kullanılan immobilizasyon teknikleri

Şekil 2.12'de verilen tekniklerden kovalent bağlama, biyotanıma elemanının ya elektrot/dönüştürücü yüzeyine ya da zarın inert matrisine sıkıca bağlandığı en yaygın kullanılan immobilizasyon tekniğidir. Membran matrisi yoluyla immobilizasyon işlemi

iki adım içerir: Fonksiyonel polimerin sentezi ve kovalent immobilizasyon. Bağlanma mekanizması, biyolojik tanıma elemanı ile fonksiyonel protein grupları (genellikle amino asitlerin yan zincirleri) ve dönüştürücü/membran matris yüzeyinin reaktif grupları arasındaki etkileşime bağlıdır. Doğrudan kovalent bağlamanın avantajları arasında çevresel değişikliklere karşı güçlü direnç, biyotanıma elemanının sızıntı ile kaybının az olması ve biyotanıma elemanı ile matris arasında güçlü bağ oluşumu yer alır. Bu yöntemin ana dezavantajları, aktif kimyasalların kullanılması ve geliştirilen matrisin bir kez kullanıldıktan sonra yeniden üretilememesidir (Arya vd., 2019; Martinkova vd., 2017; Naresh & Lee, 2021; Nguyen & Kim, 2017; Sassolas vd., 2012).

2.3.1. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM)

Günümüzde, yüzey işlevselleştirme için kendiliğinden oluşan tek tabakalar yaklaşımı, özellikle biyomoleküllerin immobilizasyonunda ve yeni supramoleküler mimarilerin üretiminde çok kullanışlı ve ilgi çekici olarak kabul edilmektedir. Biyosensörler hakkında son zamanlarda yayınlanan bilimsel makalelerin çoğu, antikorlar, proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin immobilizasyonu için farklı yüzey fonksiyonel grupları oluşturmak için SAM kavramını kullanmaktadır. Oluşum sürecinin basitliği ve pahalı araçlara gereksinim olmaması nedeniyle, bu yaklaşım yüzey işlevselleştirme ve biyoalgılama cihazları alanında çalışan araştırmacılar arasında öne çıkmaktadır (M. Singh vd., 2020). SAM'ler, moleküler birleşme, kendiliğinden oluşum ve substratın öncü moleküllerle bir çözeltiye daldırılmasıyla oluşum gibi büyük avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Bain & Whitesides, 1989; Bigelow vd., 1946; Fox & Zisman, 1950).

SAM'ler, yüzeye bağlanan bir baş grup, SAM oluşumundan sonra yüzeyin özelliklerini belirleyen bir uç grup ve baş ve uç grupları birbirine bağlayan bir ayırıcı gruptan oluşur. Baş grup silan, fosfonik asit ve tiyol grubu içerirken, son grup amin, metil ve tiyol grubu içerebilir. Ayırıcı grup esas olarak alkil karbon zincirlerinden oluşur. SAM'ler, arayüzde oluşan kimyasal bağlar sayesinde son derece güçlü bir molekül-substrat etkileşimi sağlarlar. Bu güçlü kimyasal etkileşimler sayesinde SAM'ler, özellikle düzenli bir kimyasal bileşen alanı gerektiren çeşitli uygulamalarda kullanılabilirler (Bain & Whitesides, 1989; Bigelow vd., 1946; Fox & Zisman, 1950; Kim & Yoo, 2021).

2.3.1.1. SAM oluşumunda merkapto karboksilik asitlerin kullanımı

Organik tiyoller ve disülfitler ve daha az ölçüde sülfitler, altın ve gümüş gibi soy metaller üzerindeki çözeltilerden kendiliğinden kimyasal olarak emilerek iyi derecede tekrarlanabilir bir şekilde kararlı tek katmanlı tabakalar oluştururlar (Bain vd., 1989; Briand vd., 2006; Langmuir, 1990; Nuzzo vd., 1990). Genellikle kendiliğinden oluşan tek tabakalar olarak adlandırılan bu filmler, kükürt içeren moleküllerin alkil zincirinin yeterince uzun olması şartıyla, yoğun bir şekilde paketlenmiş, kristal benzeri bir yapıya sahiptir. Bu özellik sayesinde, alkil tiyolün ana grup işlevselliği doğru seçilerek, biyomoleküllerin kontrollü bağlanması için yeni yüzey özelliklerine sahip malzemeler tasarlanabilmektedir (Briand vd., 2006; Ulman, 1996).

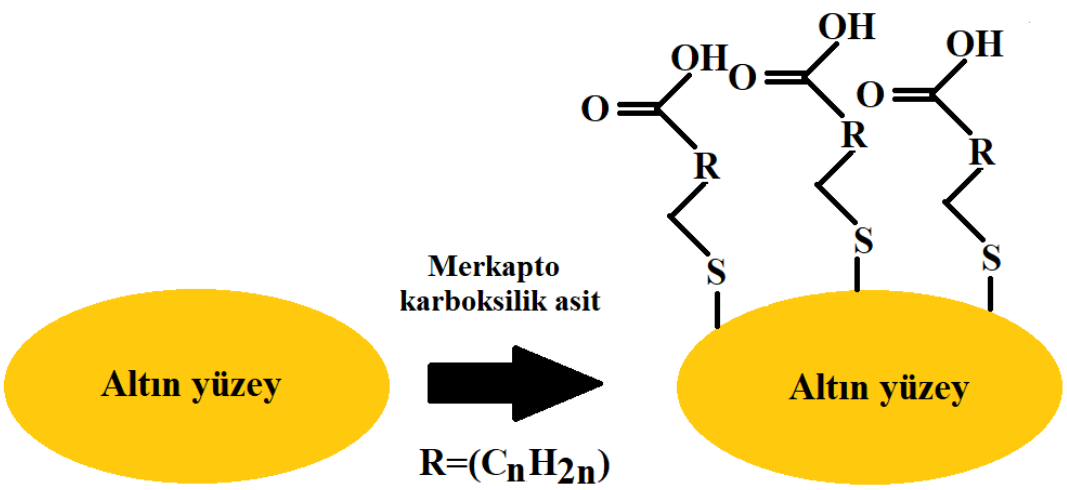
Biyosensörler, güvenilir birer tespit sistemleri olabilmeleri için hızlı tespit ve cevap süresine, dayanıklılığa ve düşük konsantrasyonlu hedeflerin tespiti gibi çok önemli işlevlere sahip olmalıdırlar. Bu işlevleri gerçekleştirmek için, analitleri (hedef antikorları ve enzimleri) sabitlemek üzere aktif katman ile analitler arasına sıralı bir alana sahip bir bağlayıcı yerleştirilmelidir. Moleküler düzenekler, SAM'lerin aktif katman üzerinde sıkıca paketlenmesine ve yönlendirilmesine izin verdiğinden, yoğun bir analit alanı oluşturulabilir (Kim & Yoo, 2021).

Literatürde, tiyol grubu içeren karboksilli asitlerin kullanımı ile SAM oluşturma tekniğinin, biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılmasının birçok örneği mevcuttur.

Özcan ve Sezgintürk hiperparatiroidizm, hipoparatiroidizm ve tiroid kanserinin tanı ve tedavisinin izlenmesi için serumdaki PTH seviyesini belirlemek üzere geliştirdikleri hormon bazlı impedimetrik biyosensörde, altın elektrot yüzeyinde 12-Merkaptododekanoik asit (12-MDDA) ile oluşturdukları SAM'ler üzerine poli amidoamin dendrimer (PAMAM) ve ardından da Antiparatiroid hormonunu immobilize etmişlerdir (H. M. Özcan & Sezgintürk, 2015).

Bir diğer çalışmada, Rasanang ve arkadaşları, altın prizma yüzeyi üzerinde 11-Merkaptoundekanoik asit (11-MUA) kullanarak SAM'ler meydana getirmiş ve SPR temelli biyosensör için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir (Rasanang vd., 2022).

Altın yüzey üzerinde SAM oluşumuna ait gösterim Şekil 2.13'te verilmiştir.

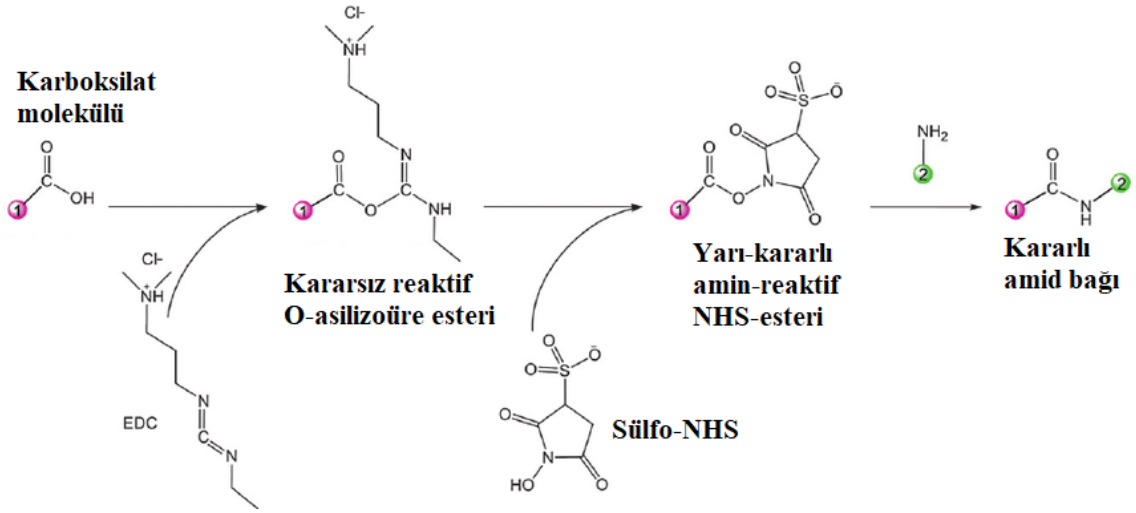


Şekil 2.13. SAM'lerin altın yüzey üzerinde oluşumu

2.3.1.2. EDC/NHS ile uç grupların aktivasyonu

1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) suda çözünür bir karbodiimid olup, genellikle birincil aminlerin amid bağları verecek şekilde birleştirilmesi için bir karboksil grubu aktive edici madde olarak kullanılır. EDC yaygın olarak peptit sentezinde, nükleik asitlere proteinlerin çapraz bağlanmasında ve ayrıca immünokonjugatların hazırlanmasında kullanılır. EDC genellikle büyük biyomoleküllerin immobilizasyonu için N-hidroksi süksinimid (NHS) ile beraber kullanılmaktadır (Pottorf & Szeto, 2001).

NHS'nin, peptit sentezinde aktif esterlerin oluşumunda ve karboksilik asitler için aktive edici bir reaktif olarak kullanımı organik kimya veya biyokimyada yaygın olarak kabul görmektedir (Şekil 2.14). Aktif asitler (karboksilatlar), örneğin amidleri oluşturmak için aminlerle reaksiyona girebilirken, normal bir karboksilik asit sadece bir amin ile bir tuz oluşturur (Anderson vd., 1963; Knight, 2001).



Şekil 2.14. EDC-NHS ile karboksilat moleküllerinin reaksiyon mekanizması (Bart vd., 2009)

EDC-NHS kullanımı, karboksilik asit gruplarını aktive ederek bu gruplarla protein, antikor gibi moleküllerin kararlı amid bağı yaparak immobilizasyonunu mümkün kılar. Bu sebeple, biyosensör çalışmalarında, elektrot yüzeyinin modifikasyonunda en sık kullanılan yardımcı moleküllerdendir (H. M. Özcan & Sezgintürk, 2015; Rasanang vd., 2022; Sinha, 2021; Yoon vd., 2011).

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Biyosensör tasarımında kullanılan kimyasallar ve malzemeler

<u>Omentin biyosensörünün tasarımında:</u>

- Analit olarak Omentin (intelectin-1; ITLN1) aktif proteini (MyBioSource, San Diego, ABD)
- Omentin proteinine özgü sentezlenmiş antikor olarak monoklonal Anti-Omentin (ITLN1 monoclonal antibody) (MyBioSource, San Diego, ABD)
- Screen Printed Electrode 250 AT (Dropsense)
- 1X Serum replacement solution
- Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)
- Potasyum klorür (KCl)
- Sodyum klorür (NaCl)

<u>Chemerin biyosensörünün tasarımında:</u>

- Analit olarak; *E. coli*'de üretilmiş Human Chemerin (RARRES2) aktif proteini (MyBioSource, San Diego, ABD)
- Antikor olarak; Chemerin proteinine özgü farede üretilmiş Human Chemerin (CMKLR1 monoclonal antibody) (MyBioSource, San Diego, ABD)
- Formlabs Clear Resin

- İzopropil alkol (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD)
- İnsan serumu (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD)

Her iki biyosensör tasarımında:

- Fosfat tamponunun hazırlanmasında; disodyum hidrojen fosfat hepta hidrat ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ve sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)
- Elektrokimyasal ölçümler için kullanılacak redoks probunun hazırlanmasında; potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$)
- Elektrot yüzeyinde SAM oluşumu için ara kol görevi görmek üzere, 12-Merkaptododekanoik asit (12-MDDA)
- SAM'lerin karboksil uçlarının aktif hale getirilmesi için 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve N-hidroksi süksinimid (NHS)
- Biyosensör yüzeyindeki antikorlar üzerinde meydana gelebilecek istenmeyen bağlanmaların engellenmesi için sığır serum albümini (BSA)
- Ultra saf su
- Etanol, Hypergrade for LC-MS

Kullanılmıştır. Ultra saf su dışındaki bütün kimyasallar Sigma Aldrich (St Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir.

3.1.1.1. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışları

Omentin biyosensörünün tasarımında:

- 12-MDDA ara kol çözeltisi: 6.05 mg 12-Merkaptododekanoik asit tartılır ve 5 mL saf etanol içerisinde çözülür.
- 50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu: 7,744 g disodyum hidrojen fosfat hepta hidrat ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ve 3.292 g sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) tartılarak 900 mL saf su içerisinde çözülür. pH 7.0'a ayarlanır; ardından çözelti 1 litreye tamamlanır.
- EDC-NHS çözeltisi (1:1): 5.94 mg 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) tartılır ve 100 µL 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözülür. 2.88 mg N-hidroksi süksinimid (NHS) tartılır ve 500 µL 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözülür. Hazırlanan bu iki çözelti 1:1 oranında karıştırılır.

- %1 BSA (w/v) çözeltisi: 1 BSA tartılarak 100 µL saf su içerisinde çözülür.
- Yapay serum çözeltisi: Serum replacement çözeltisi (1x) içerisinde 4.5 mM KCl, 5 mM $CaCl_2$, 145 mM NaCl içerecek şekilde hazırlanmış ve çalışmada kullanılacak Omentin proteini bu çözelti ile seyreltilerek porsiyonlanmıştır.
- Redoks probu çözeltisi: 0.8231 gram potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$), 1.056 g potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$) ve 3.72 g potasyum klorür (KCl) tartılır ve 500 mL 50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözülür.

<u>Chemerin biyosensörünün tasarımında:</u>

- 12-MDDA ara kol çözeltisi: 6.05 mg 12-Merkaptododekanoik asit tartılır ve 5 mL saf etanol içerisinde çözülür.
- 10 mM, pH: 7.4 fosfat tamponu: 1.01 g disodyum hidrojen fosfat hepta hidrat ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ve 0.384 g sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) tartılarak 900 mL saf su içerisinde çözülür. pH 7.4'e ayarlanır; ardından çözelti 1 litreye tamamlanır.
- EDC-NHS çözeltisi (1:1): 5.94 mg 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) tartılır ve 100 µL 10 mM pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde çözülür. 2.88 mg N-hidroksi süksinimid (NHS) tartılır ve 500 µL 10 mM pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde çözülür. Hazırlanan bu iki çözelti 1:1 oranında karıştırılır.
- %1 BSA (w/v) çözeltisi: 1 mg BSA tartılarak 100 µL saf su içerisinde çözülür.
- İnsan serumu çözeltisi: Satın alınan insan serumu çözeltisi saf su ile 10^6 kat seyreltilerek çalışmada kullanılan Chemerin proteini bu çözelti ile seyreltilerek porsiyonlanmıştır.
- Redoks probu çözeltisi: 0.8231 gram potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$), 1.056 gram potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$) ve 3.72 gram potasyum klorür (KCl) tartılır ve 500 mL 10 mM, pH: 7.4 fosfat tamponu içerisinde çözülür.

3.1.2. Biyosensör tasarımında kullanılan cihazlar

- Potansiyostat/galvanostat, Gamry Instruments Interface 1010 E (Warminster, ABD)
- pH Metre, Mettler Toledo Seven Contact (Columbus, Ohio, ABD)
- Ultrasonik banyo, Daihan WiseClean (Wonju, Gangwon, Güney Kore)

- Mikropipetler, Eppendorf (Hamburg, Almanya)
- Hassas terazi, Shimadzu AUW220D (Kyoto, Japonya)
- Ultra saf su cihazı, ELGA Purelab Option DV25 (Paris, Fransa)
- Altın kaplama cihazı, Agar Sputter Coater (Jiangsu, Çin Halk Cumhuriyeti)
- Taramalı elektron mikroskobu & Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi, Zeiss Evo LS10 (Stuttgart, Almanya)
- Üç boyutlu yazıcı, Formlabs 3+ (Somerville, Massachusetts, ABD)
- Taramalı elektron mikroskobu, FEI QUANTA FEG 250 (Hillsboro, Oregon, ABD)
- FTIR, Bruker, VERTEX 70 ATR (Billerica, Massachusetts, ABD)

3.1.3. Biyosensör tasarımında kullanılan elektrotlar

3.1.3.1. Yüzey baskılı elektrotlar (Screen printed electrode, SPE)

Omentin biyosensörünün tasarımındaki çalışmalarda yüzey baskılı elektrotlar kullanılmıştır. Dropsense 250 AT modeli tercih edilen SPE'ler, üzerinde altın çalışma elektrotu, platin karşıt elektrot ve Ag referans elektrot olmak üzere üçlü elektrot sistemini bir arada bulunduran seramik yapılı elektrotlardır. Daire şeklindeki altın çalışma elektrotu yüzeyi 4 mm yarıçap, 0.125 cm^2 yüzey alanına sahiptir. SPE'ye ait resim Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Dropsense 250 AT yüzey baskılı elektrot

3.1.3.2. Üç boyutlu yazıcı ile üretilmiş altın elektrotlar (3D-printed gold electrode, 3DPGE)

Chemerin biyosensöründe kullanılan 3DPGE'lerin üretimi, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

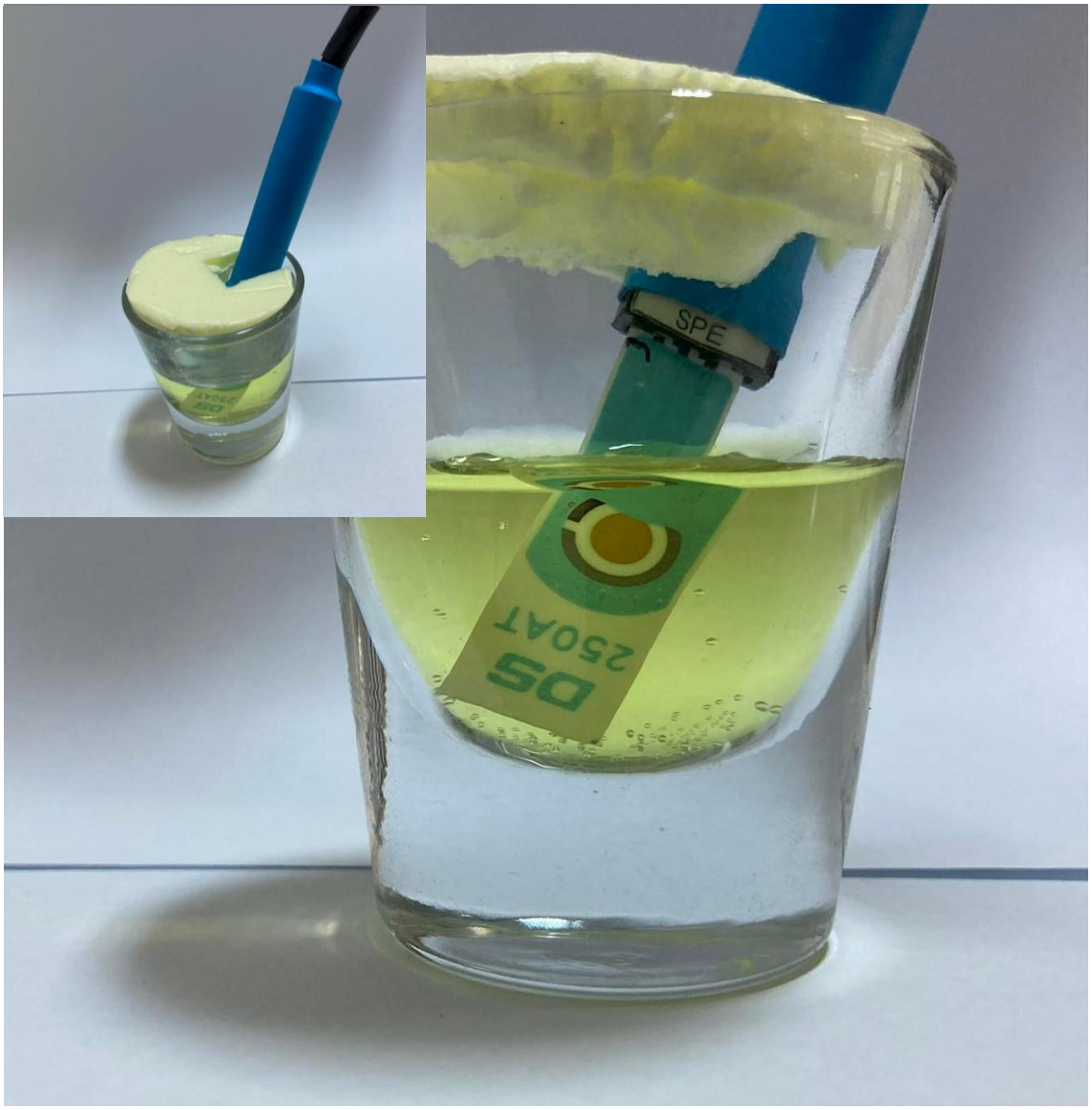
Chemerin biyosensörünün tasarımında kullanılan elektrotlar üç boyutlu yazıcı ile üretilmiş, yüzeyi altın kaplanarak iletken hale getirilmiş fotopolimer reçine temelli çalışma elektrotlarıdır. 3DPGE'lerin altın çalışma elektrotu yüzeyi 4 mm yarıçap, 0.125 cm^2 yüzey alanına sahiptir. Çalışmalarda alınmış olan bütün elektrokimyasal ölçümler Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel karşıt elektrot ile beraber üçlü elektrot sistemi oluşturularak gerçekleştirilmiştir.



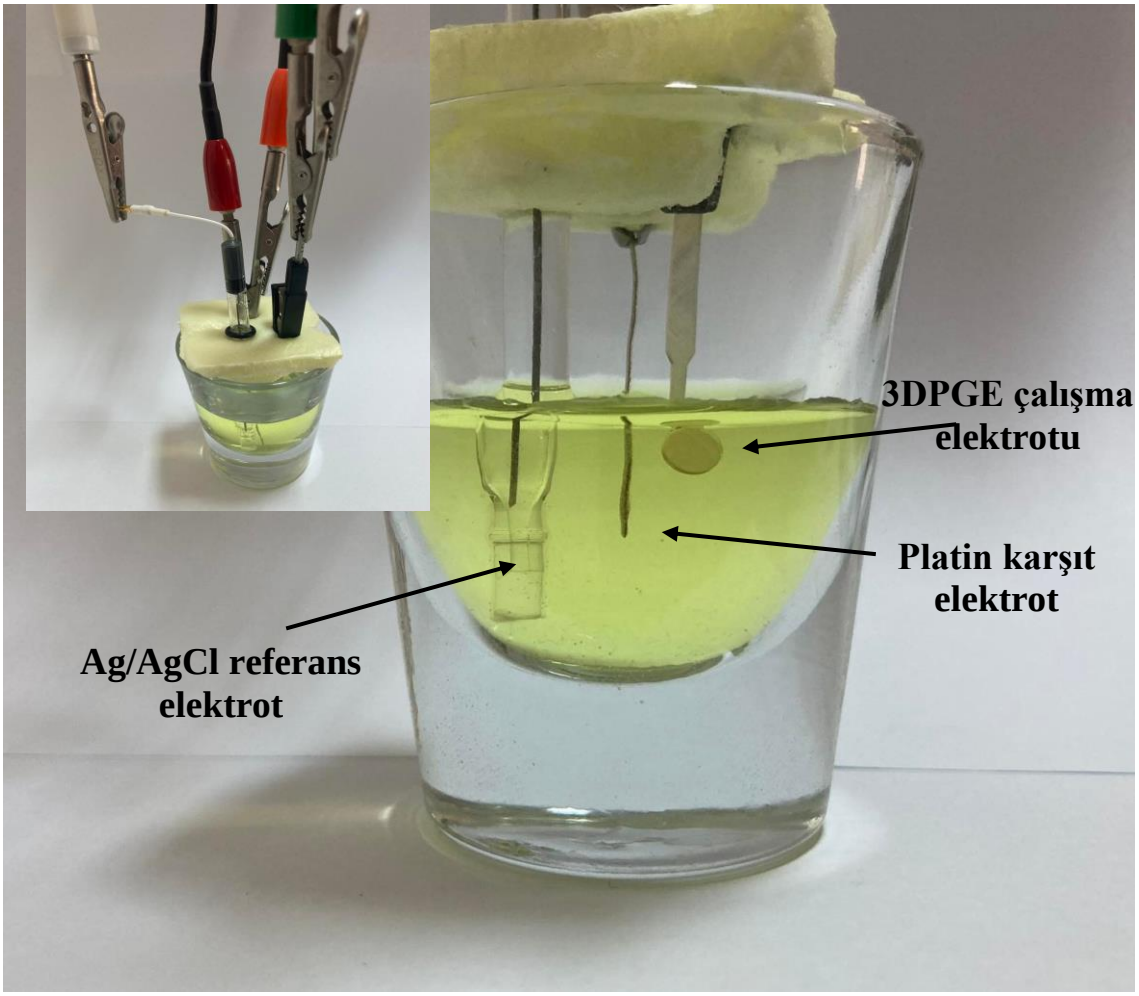
Şekil 3.2. Üç boyutlu yazıcı ile üretilmiş altın elektrotlar

3.1.4. Elektrokimyasal ölçümlerin parametreleri

Geliştirilen biyosensörlerin tasarım aşamalarında alınan bütün elektrokimyasal ölçümler, içerisinde 10 mL $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ redoks probu bulunduran çalışma hücresinde üçlü elektrot sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan her iki biyosensörde de, Ag/AgCl referans elektrot, platin karşıt elektrot kullanılmıştır. Omentin biyosensörü ve Chemerin biyosensörü çalışmalarında kullanılan üçlü elektrot sistemi ve çalışma hücrelerine ait fotoğraflar sırasıyla Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Omentin biyosensörüne ait çalışma hücresi



Şekil 3.4. Chemerin biyosensörüne ait çalışma hücresi

Biyosensörlerin tasarım aşamalarının başarılarını teyit etmek amacıyla her aşama sonrası alınan CV ve EİS ölçümleri Gamry Framework yazılımı bulunduran, bilgisayar destekli Gamry potansiyostat/galvanostat, Interface 1010 E cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Gamry Echem Analyst programı kullanılmıştır.

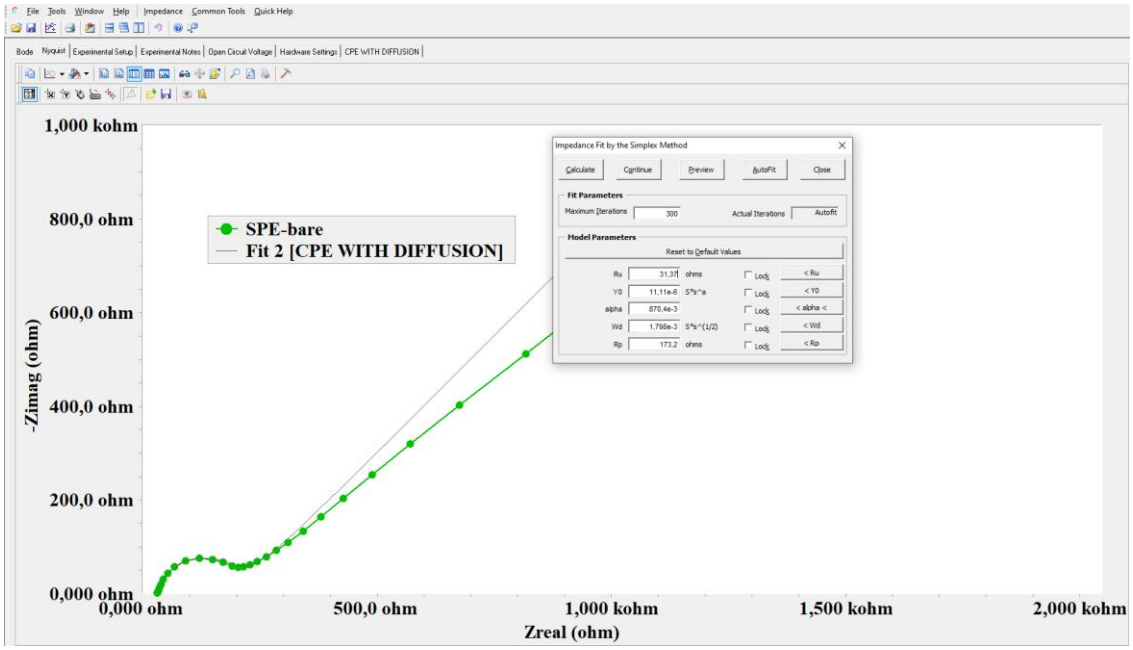
Her iki biyosensör için de EİS ölçümlerinde, 50.000-0.05 Hz frekans aralığı, 10 mV alternatif akım kullanılmıştır.

CV ölçümleri, -0,1 V-0,5 V aralığında, 50 mV/s tarama hızında, 1 mV adım yüksekliği ile 5 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma elektrotu yüzey alanları her iki biyosensör için 0.125 cm^2'dir.

3.1.5. Nyquist eğrilerinden yük transfer dirençlerinin (ΔRct) hesaplanması

Alınan EİS ölçümleri sonrası, elde edilen Nyquist eğrilerindeki ΔRct (eğrideki yarım dairenin çapı) değerlerini hesaplamak için Gamry Echem Analyst yazılımında sayfanın üst kısmında yer alan sekmelerden Impedance>Fit a Model (Simplex method)>CPE with defusion seçilmiştir. ΔRct değerlerinin hesaplamasına ait yazılımdaki ekran görüntüsü Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Gamry Echem Analyst yazılımı ile impedans hesaplama

Bu hesaplama her bir EİS ölçümü sonrası yapılmıştır. Geliştirilen her iki biyosensör için de, doğrusal tayin aralığında alınan her bir ölçüm sonrası mutlak ΔRct değerini hesaplamak için, protein ölçümüne ait Rct ($Rct_{(Omentin/Chemerin)}$)'den BSA sonrası alınan EİS ölçümünün Rct değeri çıkarılmıştır.

- $\Delta Rct = Rct_{(Omentin/Chemerin)} - Rct_{(BSA)}$

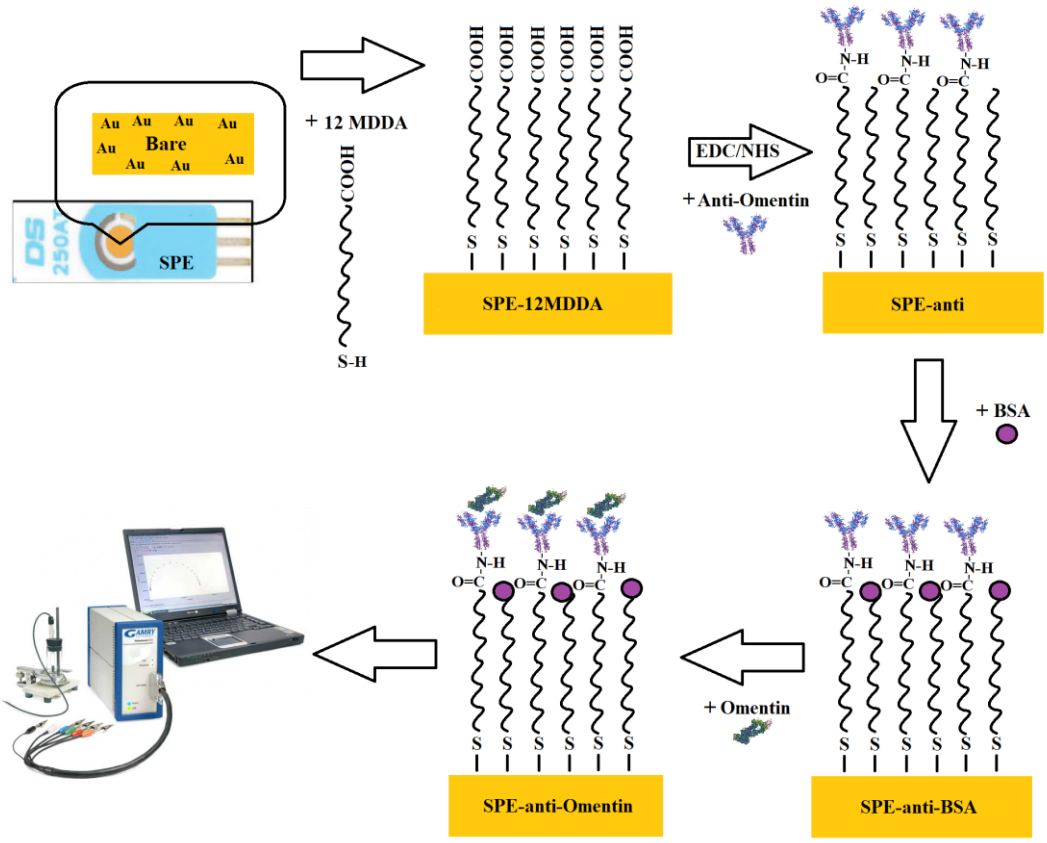
3.2. Yöntem

3.2.1. Omentin biyosensörünün tasarım kimyası

Omentin biyosensörünün tasarımı için öncelikle SPE'lerin altın çalışma yüzeyi üzerinde 12-MDDA kullanılarak SAM'ler meydana getirilmiş (Şekil 2.13), oluşan SAM'lerin karboksilik asit uçları Anti-Omentin immobilizasyonunu mümkün kılabilmek için EDC/NHS ile aktive edilmiş (Şekil 2.14) ve ardından bu aktive edilen uçlara Anti-Omentin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyonun ardından yüzeyde, Anti-Omentin immobilizasyonu aşamasında Anti-Omentin bağlanmamış olan SAM'lerin boşta kalan aktiflenmiş uçları, protein inkübasyonu aşamasında istenmeyen bağlanmaların önüne geçilmesi amacıyla BSA ile bloke edilmiştir. Her bir aşama sonrası CV ve EİS ölçümleri alınarak immobilizasyon basamaklarının başarılarının doğrulaması yapılmıştır. Omentin biyosensörünün tasarım stratejisine ait adımlar Şekil 3.6'da verilmiştir.

Omentin biyosensörünün baştan sona her bir hazırlık aşamasındaki isimlendirmeleri aşağıdaki gibidir;

- **SPE-bare**: SPE yalın haldeki elektrot,
- **SPE-12MDDA**: 12-MDDA ile yüzeyde SAM oluşumu sonrasına ait elektrot,
- **SPE-anti**: EDC/NHS aktivasyonu ardından Anti-Omentin immobilize edilmiş elektrot,
- **SPE-anti-BSA**: Anti-Omentin immobilizasyonu ardından BSA inkübasyonu gerçekleştirilmiş elektrot,
- **SPE-anti-Omentin**: BSA inkübasyonu ardından Omentin proteini inkübasyonu sonrasına ait elektrot.



Şekil 3.6. Omentin biyosensörünün tasarım stratejisi

3.2.2. Omentin biyosensörünün tasarımına ait optimizasyon çalışmaları

Omentin tayini için geliştirilen biyosensörün, 12-MDDA konsantrasyonunun, Anti-Omentin konsantrasyonunun, Omentin inkübasyon süresinin ve BSA konsantrasyonunun optimizasyon çalışmaları yapıldı. Biyosensör tasarımı toplam 4 ana basamaktan meydana gelmektedir. Bunlar, 12-MDDA ara kol çözeltisi ile elektrotun altın yüzeyinde SAM oluşumu, SAM'lerin karboksilik asit uç gruplarının EDC/NHS ile aktivasyonu, Anti-Omentin immobilizasyonu ve BSA inkübasyonudur. Yalın SPE'ler ultra saf su ardından saf etanol ile de daldırma yöntemi ile yıkandı. Diğer tüm aşamaların sonrasında SPE'ler ultra saf su bulunduran bir behere daldırma yöntemi ile yıkandı ve ultra saf argon gazı ile kurutuldu. Yüzeyde SAM oluşumunu takiben uygulanan bütün inkübasyonlar, yüzeye damlatılan çözeltinin buharlaşma göstererek miktarının azalmasını ve konsantrasyonunun değişmesini engellemek adına içerisinde nemli ortam

sağlaması için ıslak pamuk bulunduran kapağı kapalı bir köpük kutu içinde gerçekleştirildi.

Biyosensör tasarımının her bir aşamasının ardından SPE'ler, uygulanan basamağın başarısının teyidi için, içinde 10 mL $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ redoks probu bulunduran çalışma hücresine alınarak CV ve EİS ölçümleri gerçekleştirildi. Çizelge 3.1'de Omentin biyosensörünün hazırlık aşamaları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Omentin biyosensörünün genel hazırlık aşamaları

Aşama	**Yapılan işlem**	**İnkübasyon süresi**
1a.	Yüzey baskılı elektrotlar	
1b.	ultra saf su + etanol ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
1c.	CV ve EİS ölçümleri	
1d.	ultra saf su + etanol ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
2a.	12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon	16 saat
2b.	etanol + ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
2c.	CV ve EİS ölçümleri	
2d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
3a.	EDC / NHS çözeltisi ile inkübasyon	30 dakika
3b.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
3c.	CV ve EİS ölçümleri	
3d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
4a.	Anti-Omentin inkübasyonu	1 saat
4b.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
4c.	CV ve EİS ölçümleri	
4d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	

5a.	BSA çözeltisi ile inkübasyon	1 saat
5b.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
5c.	CV ve EİS ölçümleri	
5d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	

3.2.2.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu

SPE'lerin altın yüzeyi üzerinde ara kol olarak görev yapacak olan 12-MDDA molekülünün konsantrasyonunun optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla 2.5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM olmak üzere dört farklı 12-MDDA konsantrasyonlarında hazırlanan farklı biyosensörler ile denemeler gerçekleştirildi. Saf etanolde hazırlanan 12-MDDA çözeltileri, ince uzun cam viallere alındı ve hazırlanan SPE'ler bu viallere daldırılarak 16 saat inkübe edildi.

Bir sonraki aşamada, SAM'ler üzerine Anti-Omentin immobilizasyonunu mümkün kılabilmek için EDC/NHS çözeltisinin 1:1 karışımının 10 µL'si SPE'lerin altın yüzeylerine damlatılarak 30 dakika inkübe edildi ve yüzeyde bulunan SAM'lerin karboksilik asit uç grupları aktive edildi.

EDC/NHS inkübasyonu ile aktivasyon işleminin ardından Anti-Omentin molekülünün immobilizasyonu aşamasına geçildi. Bu amaçla, 5 µg/mL Anti-Omentin içeren porsiyonların 10 µL'si SPE'lerin altın yüzeyine damlatıldı ve 60 dakika inkübe edildi.

Anti-Omentin / Omentin proteini etkileşimine geçilmeden önce altın yüzeyde boşta kalan aktiflenmiş SAM'ler üzerinde gerçekleşebilecek istenmeyen spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için SPE'lerin BSA inkübasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla hazırlanan %0.5 BSA (w/v) çözeltisinin 10 µL'si SPE'lerin altın yüzeyi üzerine damlatılarak 60 dakika inkübe edildi.

BSA inkübasyonunun ardından tasarımı tamamlanan biyosensörle Omentin tayinleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL Omentin konsantrasyonlarına karşı EİS ölçümleri alındı. İmpedans ölçümlerinden elde edilen

Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak bir standart grafikler oluşturuldu ve 12-MDDA molekülünün optimum konsantrasyonu belirlendi.

Biyosensöre ait hazırlık aşamaları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları

Aşama	Yapılan işlem	İnkübasyon süresi
1	SPE'lerin ultra saf su + etanol ile yıkaması +(CV ve EİS)	-
2	4 farklı 12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon **(2.5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM)** +(CV ve EİS)	16 saat
3	EDC / NHS aktivasyonu +(CV ve EİS)	30 dakika
4	5 µg/mL Anti-Omentin konsantrasyonu ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
5	%0.5 BSA (w/v) çözeltisi ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
6	100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat

3.2.2.2. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonu

12-MDDA ara kol molekülünün konsantrasyonunun optimizasyonu ardından elektrot yüzeyindeki Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/mL olmak üzere dört farklı Anti-Omentin konsantrasyonu kullanılarak dört farklı biyosensör Çizelge 3.1'deki gibi hazırlandı. Her bir biyosensör ile 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL Omentin konsantrasyonlarına karşı EİS ölçümleri alındı. İmpedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden

ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve optimum Anti-Omentin konsantrasyonu belirlendi. Biyosensöre ait hazırlık aşamaları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları

Aşama	Yapılan işlem	İnkübasyon süresi
1	SPE'lerin ultra saf su + etanol ile yıkaması +(CV ve EİS)	-
2	5 mM 12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon +(CV ve EİS)	16 saat
3	EDC / NHS aktivasyonu +(CV ve EİS)	30 dakika
4	4 farklı Anti-Omentin konsantrasyonu ile inkübasyon **(2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/mL)** +(CV ve EİS)	1 saat
5	%0.5 BSA (w/v) çözeltisi ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
6	100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat

3.2.2.3. Omentin'in inkübasyon süresinin optimizasyonu

SPE'lerin altın yüzeyleri üzerinde Anti-Omentin / Omentin proteini etkileşimi için gerekli olan en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, biyosensörlerin hazırlanması aşamasında optimum 12-MDDA konsantrasyonu ve Anti-Omentin konsantrasyonu kullanıldı. Anti-Omentin / Omentin proteini etkileşimi basamağında 15, 30, 45 ve 60 dakika olmak üzere dört farklı inkübasyon süresi çalışıldı. Biyosensör hazırlığı Çizelge 3.1'deki gibidir.

Bu amaçla 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarında Omentin proteini porsiyonlarının 10 µL'si dört farklı biyosensörün yüzeyine damlatılarak sırasıyla 15, 30, 45 ve 60 dakika inkübe edildi. Artan Omentin proteini konsantrasyonlarına karşı her bir inkübasyon süresinin bitiminde EİS ölçümü alındı. İmpedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve Anti-Omentin / Omentin etkileşimi için optimum inkübasyon süresi belirlendi.

Biyosensöre ait hazırlık aşamaları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Omentin inkübasyon süresinin optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları

Aşama	Yapılan işlem	İnkübasyon süresi
1	SPE'lerin ultra saf su + etanol ile yıkaması +(CV ve EİS)	-
2	5 mM 12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon +(CV ve EİS)	16 saat
3	EDC / NHS aktivasyonu +(CV ve EİS)	30 dakika
4	7.5 µg/mL Anti-Omentin konsantrasyonu ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
5	%0.5 BSA (w/v) çözeltisi ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
6	100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL ile inkübasyon +(CV ve EİS)	**15, 30, 45 ve 60 dakika**

3.2.2.4. BSA konsantrasyonunun optimizasyonu

Omentin biyosensörü hazırlığında kullanılan BSA çözeltisinin konsantrasyonunun optimizasyonu çalışıldı. SPE'lerin altın yüzeyleri üzerinde

oluşturulan aktif SAM uçlarına BSA proteini bağlanmasıyla spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilmesi amaçlandı. Bu amaçla belirlenen optimum koşullarda %0.25, %0.5, %0.75 ve %1 (w/v) olmak üzere dört farklı BSA konsantrasyonu kullanılarak dört farklı biyosensör hazırlandı. Biyosensör hazırlığı Çizelge 3.1'deki gibidir.

Bu çalışma için biyosensörler farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltisi ile 60 dakika inkübe edildi. Anti-Omentin / Omentin etkileşimi sonrası alınan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve optimum BSA konsantrasyonu belirlendi.

Biyosensöre ait hazırlık aşamaları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. BSA konsantrasyonunun optimizasyonunda kullanılan biyosensörlerin hazırlık aşamaları

Aşama	Yapılan işlem	İnkübasyon süresi
1	SPE'lerin ultra saf su + etanol ile yıkaması +(CV ve EİS)	-
2	5 mM 12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon +(CV ve EİS)	16 saat
3	EDC / NHS aktivasyonu +(CV ve EİS)	30 dakika
4	7.5 µg/mL Anti-Omentin konsantrasyonu ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
5	**%0.25, %0.5, %0.75 ve %1** BSA (w/v) çözeltisi ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
6	100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL ile inkübasyon +(CV ve EİS)	30 dakika

3.2.3. Omentin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmaları

Omentin biyosensörünün tasarımında kullanılan immobilizasyon parametrelerin optimizasyonlarının ardından biyosensöre ait analitik karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, Omentin biyosensörünün tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik çalışmaları, yapay serum analizi ve SFI analizi çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Bölüm 3.2.2'de optimum olarak belirlenen parametrelerle hazırlanan Omentin biyosensörleri ile 100-1000 ng/mL arası altı farklı Omentin konsantrasyonu aralığında CV ve EİS ölçümleri alındı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak bir standart grafik oluşturuldu.

Bir biyosensör için tespit limiti (LOD), biyosensörün bir örnek içinde miktar tayini gerekmeksizin tespit edebileceği en düşük analit konsantrasyonu değeridir. Tayin limiti (LOQ) ise analitin, yüksek kesinlik ve doğruluk ile miktar tayininin yapılabileceği konsantrasyon değeridir. LOD ve LOQ değerleri aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanabilir (Shrivastava & Gupta, 2011).

- LOD = 3 X Standart Sapma / Standart grafiğin eğimi
- LOQ = 10 X Standart Sapma / Standart grafiğin eğimi

Bu eşitlikler doğrultusunda biyosensöre ait LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

3.2.3.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Omentin biyosensörü ile belirli sabit Omentin konsantrasyonlarında yapılan ölçümlerin tekrarlanabilirliğini incelemek adına 400, 600 ve 800 ng/mL Omentin proteini konsansantrasyonlarında 4'er tekrar ölçüm alındı. Alınan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden biyosensörün bu seçilen konsantrasyonlarda ölçtüğü Omentin miktarlarının ortalaması alınarak standart sapmaları ve geri kazanımları hesaplandı.

Tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla, optimum koşullarda hazırlanan 8 farklı biyosensör ile 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL Omentin konsantrasyonlarına karşı EİS ölçümleri alındı. Nyquist eğrilerinden ΔRct

değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği test edildi.

3.2.3.3. Omentin biyosensörünün yapay serum analizi

Omentin biyosensörünün ticari olarak satılan yapay serumda Omentin proteinini tespit edebilirliği çalışıldı. Bu amaçla, optimum olarak belirlenen parametreler kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile ticari olarak satılan yapay serum içerisinde porsiyonlaması yapılan Omentin proteinine karşı ölçümler alındı.

Yapay serum çözeltisi son konsantrasyon olarak 1X Serum replacement solution, 4.5 mM KCl, 5 mM $CaCl_2$, 145 mM NaCl içerecek şekilde hazırlandı ve Omentin proteini bu yapay serum çözeltisi içerisinde yeniden porsiyonlandı. Biyosensörler, Çizelge 3.1'deki yöntem izlenerek optimum parametreler ile hazırlandı. Anti-Omentin / Omentin etkileşimi aşamasına gelindiğinde 200, 400, 600 ve 800 ng/mL konsantrasyonlarında Omentin içeren yapay serum çözeltisinin 10 µL'si SPE'lerin altın yüzeyi üzerine damlatılarak 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde EİS ölçümleri alındı ve elde edilen Nyquist eğrileri üzerinden ΔRct değerleri hesaplandı.

3.2.3.4. Omentin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu

Tasarlanan Omentin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu için SEM görüntüleme analizi, EDS analizi, FTIR analizi ve CV ile yüzey alanı hesaplamaları yapıldı. SEM görüntüleme analizi, EDS analizi ve FTIR analizleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (NABİLTEM) gerçekleştirildi.

3.2.3.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Omentin biyosensörünün tasarımı esnasında, her inkübasyon aşaması ardından yüzeyde meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek adına SEM analizleri yapıldı. Bu amaçla, elektrot yüzeyinde SAM oluşumu öncesi, SAM oluşumu sonrası ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası SEM görüntüleri alındı. Yapılan analizler, düşük vakumda 5 kV hızlandırma potansiyeli kullanılarak 20000 kat büyütme oranında gerçekleştirildi.

3.2.3.4.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDS)

Omentin biyosensörünün tasarımı esnasında, her inkübasyon aşaması ardından yüzeyde meydana gelen elementel değişiklikleri gözlemlemek için EDS analizleri yapıldı. Elektrot yüzeyinde SAM oluşumu öncesi, SAM oluşumu sonrası ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası bulunan elementlerin yüzde miktarları EDS analizi ile belirlendi.

3.2.3.4.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Omentin biyosensörünün tasarımı esnasında, elektrot yüzeyinde oluşan kimyasal bağların incelenmesi amacıyla 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla elektrot yüzeyinde SAM oluşumu öncesi ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası FTIR spektrumları elde edildi.

3.2.3.4.4. Omentin biyosensörünün yüzey alanına ait hesaplamalar

Omentin biyosensörünün hazırlığında, kullanılan çalışma elektrodunun hangi oranda Anti-Omentin ile kaplandığını belirlemek amacıyla SPE'lerin yalın hallerinin ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası CV ölçümleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 mV-100 mV potansiyel aralığında 10 mV'luk artışlarla toplam 10 farklı potansiyelde CV ölçümleri gerçekleştirildi. CV ölçümlerinden elde edilen veriler Laviron eşitliğine ($Q = n \times F \times A \times r$) uygulanarak çalışma elektrodu olarak kullanılan SPE yüzeyinin hangi oranda Anti-Omentin kaplandığı belirlendi. Çizelge 3.6'da Laviron eşitliğinde yer alan birimler verilmiştir.

Çizelge 3.6. Laviron eşitliğinin elemanları

Q	Yük miktarı
A	Elektrot alanı (0.125 cm^2)
n	10 farklı tarama hızında elde edilen CV verileriyle hazırlanan katodik akım-potansiyel grafiklerinin eğimi

F	Faraday sabiti (96485 C/mol)
Γ	Kaplanan yüzey alan (mol/cm^2)

3.2.4. Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretimi

Çalışmada kullanılacak olan Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu tasarımı yapıldı. Çalışma elektrotunun tasarımına ait farklı boyut ve şekillere sahip çizimler Solid Works yazılımını bulunduran bir bilgisayar aracılığı ile yapıldı ve bu tasarımların baskılanması için Formlabs 3+ üç boyutlu yazıcı kullanıldı. Basımı yapılacak çalışma elektrotu için baskı malzemesi olarak kullanılan Clear Resin (şeffaf reçine), ürün geliştirmede yüksek dayanım, yüksek hassasiyet, yüksek çözünürlük ve düşük maliyete sahip olmasından dolayı tercih edildi. Çalışma elektrotu olarak kullanılacak uygun tasarımın seçilmesinin ardından üç boyutlu yazıcı üzerinde farklı basım açıları çalışıldı ve bunun tasarımın üretiminde bir etkiye sahip olup olmadığı araştırıldı. Uygun basım açısının da belirlenmesinin ardından üretilen parçaya iletkenlik kazandırılması adına altın kaplama çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon çalışmalarına geçmeden önce, üretilen çalışma elektrotu tasarımı üzerinde inkübasyon aşamalarında karşılaşılabilecek hataları en aza indirmek ve elektrokimyasal ölçümleri kolaylaştırmak adına bazı modifikasyonlar yapılarak tasarıma son hali verildi.

Çalışma elektrotunun üretimi sonrasında gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında alınan bütün elektrokimyasal ölçümler, üretilen çalışma elektrotu, Ag/AgCl referans elektrot ve platin karşıt elektrot üçlü elektrot sistemini bulunduran çalışma hücresi içerisinde, 10 mL $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ redoks probu varlığında gerçekleştirildi.

Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretiminde kullanılan cihazlar ile gerçekleştirilen bütün çalışmalar Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Şekil 3.7'de çalışma elektrodu üretiminde kullanılan üç boyutlu yazıcının fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 3.7 Formlabs 3+ üç boyutlu yazıcı

3.2.4.1. Üç boyutlu yazıcı ile uygun çalışma elektrotu tasarımının belirlenmesi

Chemerin biyosensörü üretiminde çalışma elektrotu olarak kullanılmak üzere düşük maliyet, yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirliğe sahip yeni bir elektrot geliştirilmesi planlandı. Bu amaçla, piyasada ticari olarak satılan katı çalışma elektrotları ve yüzey baskılı elektrotlardan esinlenildi ve tasarıma ait çizimler Solid Works yazılımı bulunduran bir bilgisayar aracılığı ile oluşturuldu. Planlanan tasarımlardan, çalışma elektrotu olarak kullanılmaya ve çalışma hücresi içerisinde referans elektrot ve karşıt elektrot ile üçlü elektrot sisteminin bir parçası olarak kullanıma en uygun şekil ve boyuta sahip tasarım tercih edildi. Bu amaçla, üç boyutlu yazıcı ile beş farklı tasarım basılıp birbirleri ile karşılaştırılarak en uygun boyuta, dayanıma ve maliyete sahip olan tasarımın Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu olarak kullanılmasına karar verildi.

3.2.4.2. 3DPGE tasarımındaki modifikasyonlar

Chemerin biyosensörü çalışmalarında çalışma elektrotu olarak kullanılmak üzere üretilmesi planlanan 3DPGE tasarımını üzerinde bazı modifikasyonlar gerçekleştirildi. Yapılan modifikasyonların, biyosensör hazırlık aşamalarındaki inkübasyonlar sırasında kolaylık sağlayacağı ve EİS ölçümlerinde karşılaşılabilecek hataları en aza indireceği düşünüldü. Bu amaçla, 3DPGE'lerin, çalışma hücresine daldırılacak alan ile elektrotun boyun kısmının kesiştiği bölgeye 0.1 mm boyutunda eşik ilavesi yapıldı. Ayrıca, elektrokimyasal ölçümlerde 3DPGE'lerin potansiyostata bağlanacağı sap kısımlarına, her ölçümde aynı bölge üzerinden bağlanabilmeleri için 0.5 mm boyutunda başka bir eşik ilave edildi.

3.2.4.3. Üç boyutlu yazıcı ile oluşturulan bileşenlerin altın kaplama çalışmaları

Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleşeceği çalışma hücresi için uygun boyutlara ve şekle sahip olacak şekilde üretilen parçanın altın kaplamasına ait çalışmalar yapıldı. Elektrokimyasal ölçümlerde çalışma elektrotu olarak kullanılabilmesini mümkün kılmak ve elektrot yüzeyinde SAM oluşturabilmek amacıyla, üretilen parçaya altın kaplama uygulaması yapılarak parçaya iletkenlik kazandırılması amaçlandı. Bu amaçla, kaplama malzemesi olarak altın target bulunduran Agar Sputter Coater altın kaplama cihazı kullanıldı. Şekil 3.8'de üç boyutlu yazıcı ile üretilen elektrotların altın kaplanması amacıyla kullanılan cihaz gösterilmiştir.

Üretilen parçaların altın kaplaması için 40, 80 ve 120 saniye olmak üzere üç farklı zaman dilimi kullanıldı ve en iyi altın kaplama süresi belirlendi. Altın kaplama süresinin belirlenmesinde, yüzeye kaplanan altın miktarının yanı sıra, kullan at tipi bir biyosensör üretimi için oldukça önemli olan düşük maliyete sahip olması da göz önüne alındı. Bu amaçla optimum altın kaplama süresi, en düşük maliyet ile en yeterli altın kaplama oranına bakılarak seçildi. Altın kaplama uygulamasının başarısının teyidi için kaplaması gerçekleştirilen parçaların EİS ölçümleri alındı ve EDS tekniği ile yüzeyde bulunan element yüzdeleri belirlendi.



Şekil 3.8 Agar Sputter Coater altın kaplama cihazı

3.2.4.4. 3DPGE'lerin üç boyutlu yazıcı üzerinde farklı açılarda basılması

Üretilen parçalar için en iyi altın kaplama süresinin belirlenmesi ardından, parçalar üç boyutlu yazıcı içerisinde yer alan istasyon üzerinde farklı baskı açıları kullanılarak basıldı ve bu sayede yüzeyde meydana gelebilecek farklı desen ve değişiklikler gözlemlendi.

Üç boyutlu yazıcı, üretilecek her parçayı tabandan tepe noktasına kadar (kullanılacak fotopolimer reçinenin özelliğine göre değişim gösterebilen) 50 μm'lik yatay katmanları üst üste koymak suretiyle üretmektedir. Bu yüzden baskılamanın gerçekleştiği üç boyutlu yazıcı istasyonu ile üretimi yapılacak olan malzeme tasarımı arasındaki farklı baskı açıları, üretilen parçanın yüzeyinde farklılıklara (farklı desenlere) sebep olur.

Bu amaca yönelik sırasıyla, istasyon yüzeyi ile 90^o, istasyon yüzeyine paralel (180^o), istasyon yüzeyi ile 45^o, istasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90^o, X ekseni ile 45^o olmak üzere 4 farklı baskı açısı ile parçalar üretildi. Üretilen parçalara 120 saniye altın kaplama

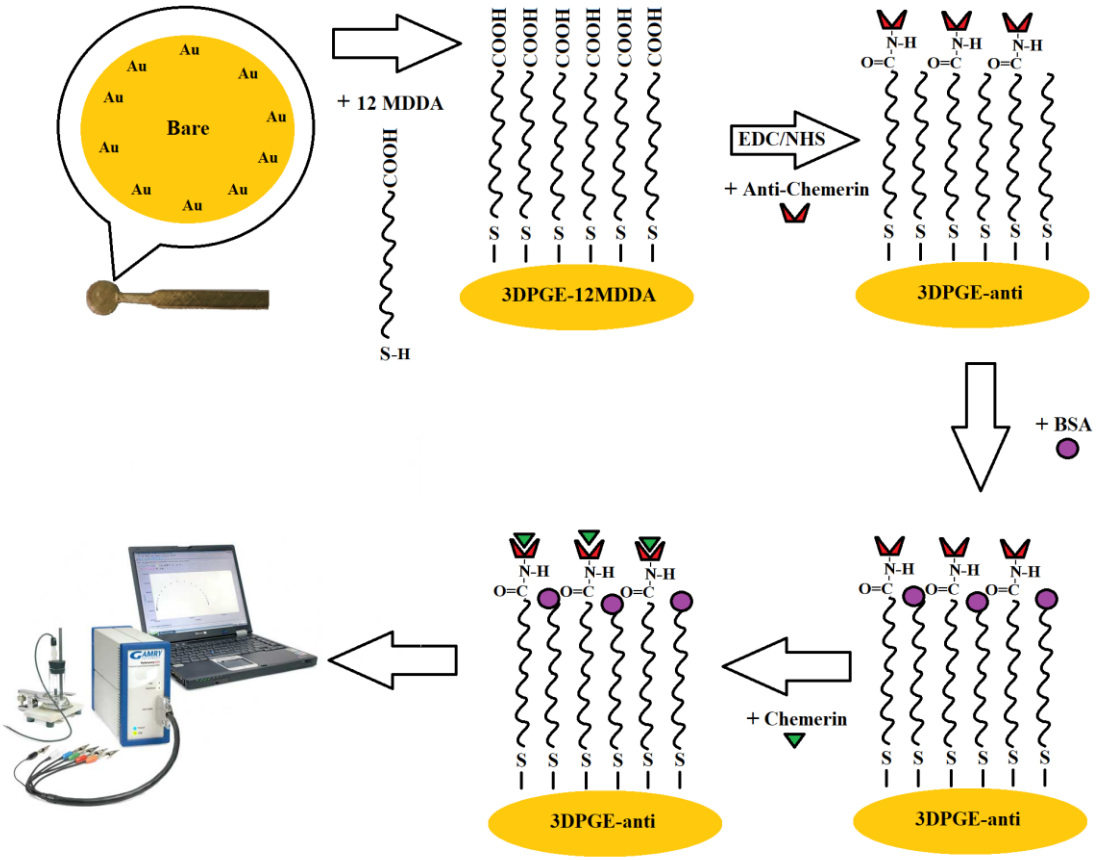
uygulanarak meydana getirilen 3DPGE'lerin yüzeyleri SEM ile incelendi ve çalışma elektrotu olarak kullanılmaya en uygun 3DPGE üretimi için optimum baskı açısı belirlendi.

3.2.5. Chemerin biyosensörünün tasarım kimyası

Chemerin biyosensörünün hazırlığında Bölüm 3.2.1'de yer alan Omentin biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan yöntem izlendi. Her bir immobilizasyon aşaması ardından CV ve EİS ölçümleri alınarak immobilizasyon basamaklarının başarılarının doğrulaması yapıldı. Chemerin biyosensörünün tasarım stratejisine ait adımlar Şekil 3.9'da verilmiştir.

Chemerin tayini için tasarlanan biyosensörün aşamalara göre isimlendirmeleri aşağıdaki gibidir;

- **3DPGE-bare**: 3DPGE yalın haldeki elektrot,
- **3DPGE-12MDDA**: 12-MDDA ile yüzeyde SAM oluşumu sonrasına ait elektrot,
- **3DPGE-anti**: EDC/NHS aktivasyonu ardından Anti-Chemerin immobilize edilmiş elektrot,
- **3DPGE-anti-BSA**: Anti-Chemerin immobilizasyonu ardından BSA inkübasyonu gerçekleştirilmiş elektrot,
- **3DPGE-anti-Chemerin**: BSA inkübasyonu ardından Chemerin proteini inkübasyonu sonrasına ait elektrot.



Şekil 3.9. Chemerin biyosensörünün tasarım stratejisi

Yapılan deneysel çalışmalarda biyosensörler, Omentin biyosensörünün tasarımında başarısı doğrulanmış olan ve optimum olarak belirlenen 5 mM 12-MDDA konsantrasyonu, 30 dakika protein inkübasyon süresi ve %1 BSA (w/v) konsantrasyonu kullanılarak hazırlandı. Biyosensör hazırlığında izlenilen yöntem Çizelge 3.7'deki gibidir.

Çizelge 3.7. Chemerin biyosensörünün genel hazırlık aşamaları

Aşama	Yapılan işlem	İnkübasyon Süresi
1a.	Üç boyutlu yazıcı ile çalışma elektrotu basımı	
1b.	Basılan parçaların altın kaplanması	
2a.	3DPGE'ler	
2b.	ultra saf su + etanol ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
2c.	CV ve EİS ölçümleri	
2d.	ultra saf su + etanol ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
3a.	5 mM 12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon	16 saat
3b.	etanol + ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
3c.	CV ve EİS ölçümleri	
3d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
4a.	1:1 EDC / NHS çözeltisi ile inkübasyon	30 dakika
4b.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
4c.	CV ve EİS ölçümleri	
4d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
5a.	1 ug/mL Anti-Chemerin inkübasyonu	1 saat
5b.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
5c.	CV ve EİS ölçümleri	
5d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
6a.	BSA çözeltisi ile inkübasyon	1 saat
6b.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	
6c.	CV ve EİS ölçümleri	
6d.	ultra saf su ile yıkama + Ar gazı ile kurutma	

Anti-Chemerin miktarı, Omentin biyosensöründe başarısının teyidi sağlanmış olan Anti-Omentin molekülü ile Omentin proteini arasındaki kat sayıdan yola çıkılarak 1 µg/mL olarak seçildi Tüm denemeler, piyasada ticari olarak satılan Chemerin ELISA testi kitlerinin tayin aralıkları ve bu kitler kullanılarak yapılan literatür çalışmalarından elde edilen insana ait kanda bulunan ortalama Chemerin miktarları göz önünde bulundurularak 2-20 ng/mL Chemerin konsantrasyonu aralığında gerçekleştirildi.

Biyosensör tasarımının her bir aşamasının ardından, uygulanan basamağın başarısının teyidi için, CV ve EİS ölçümleri 10 mL $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ redoks probu bulunduran çalışma hücresi içinde gerçekleştirildi.

3.2.6. Chemerin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmaları

Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretiminin tamamlanmasının ardından, Chemerin biyosensörüne ait analitik karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Bu amaçla, Chemerin biyosensörünün doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, insan serumunda analiz çalışmaları ve tek nokta frekansta impedans analizi çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Çizelge 3.7‘ye göre hazırlanan Chemerin biyosensörleri ile 2-20 ng/mL arası altı farklı Chemerin konsantrasyonu aralığında CV ve EİS ölçümleri alındı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak bir standart grafik oluşturuldu.

3.2.6.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Biyosensörünün belirli sabit bir Chemerin konsantrasyonunda tekrarlanabilir sonuçlar verip vermediğini incelemek amacıyla 4, 8, 12 ve 16 ng/mL Chemerin konsansantrasyonları seçildi ve hazırlanan biyosensörler ile bu konsantrasyonlarda 4’er tekrar ölçüm alındı. Alınan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden biyosensörün bu seçilen konsantrasyonlarda ölçtüğü Chemerin miktarlarının ortalaması alınarak standart sapmaları ve geri kazanımları hesaplandı.

Chemerin biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, Chemerin biyosensörünün tasarımı için belirlenen parametreler kullanılarak hazırlanan 8

farklı biyosensör ile 2-20 ng/mL Chemerin konsantrasyonu aralığında 6 farklı konsantrasyonda EİS ölçümleri alındı ve Nyquist eğrilerinden hesaplana ΔRct değerleri kullanılarak standart grafikler oluşturuldu ve tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği incelendi.

3.2.6.3. Chemerin biyosensörünün insan serumu analizi

Chemerin biyosensörünün ticari olarak satılan insan serumunda Chemerin proteinini tespit edebilirliği çalışıldı. Bu amaçla, optimum olarak belirlenen parametreler kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile ticari olarak satılan insan serumu içerisinde porsiyonlaması yapılan Chemerin proteinine karşı ölçümler alındı.

Biyosensörler, karakterizasyon çalışmalarında kullanılan protokol takip edilerek hazırlandı ve Anti-Chemerin / Chemerin proteini etkileşimi basamağına gelindiğinde 4, 8, 12 ve 16 ng/mL konsantrasyonlarında Chemerin proteinini içeren insan serumu çözeltilerinin 10 µL'si 3DPGE'lerin altın yüzeyi üzerine damlatılarak 30 dakika inkübe edildi. Her inkübasyon süresinin bitiminde EİS ölçümleri alındı ve elde edilen Nyquist eğrileri üzerinden ΔRct değerleri hesaplandı.

3.2.6.4. Tek nokta frekansta impedans analizi

Chemerin biyosensörünün hazırlığında, 3DPGE'lerin yüzeyindeki Anti-Chemerin / Chemerin etkileşiminin zamana karşı değişimini gözlemlemek amacıyla SFI ölçümü gerçekleştirildi. Bu amaçla, karakterizasyon çalışmalarında kullanılan protokol takip edilerek hazırlanan biyosensörün BSA inkübasyonu sonrası impedans ölçümü alınıp, elde edilen Bode grafiğindeki en yüksek faz kaymasının olduğu faz açısı değeri olan 33 Hz frekans, sabit frekans olarak uygulanarak tek nokta frekansta impedans ölçümü yapıldı. Ölçüm 10 mM, pH: 7.4 fosfat tamponu içeren çalışma hücresinde gerçekleştirildi.

3.2.6.5. Chemerin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu

Tasarlanan Chemerin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu için SEM görüntüleme analizi, EDS analizi ve FTIR analizleri yapıldı. Yapılan analizler Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (NABİLTEM) gerçekleştirildi.

3.2.6.5.1. Taramalı elektron mikroskobu

Chemerin biyosensörünün tasarımı esnasında, her inkübasyon aşaması ardından yüzeyde meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek adına SEM analizleri yapıldı. Bu amaçla 3DPGE'lerin altın yüzeylerinin, yüzeyde SAM oluşumu öncesi, SAM oluşumu sonrası ve anti-Chemerin immobilizasyonu sonrası SEM görüntülemeleri alındı. Yapılan analizler, düşük vakumda 5 kV hızlandırma potansiyeli kullanılarak 20000 kat büyütme oranında gerçekleştirildi.

3.2.6.5.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi

Chemerin biyosensörünün tasarımı esnasında, her inkübasyon aşaması ardından yüzeydeki element miktarlarındaki değişimleri gözlemlemek için EDS analizleri yapıldı. Bu amaçla 3DPGE'lerin, yüzeyde SAM oluşumu öncesi, SAM oluşumu sonrası ve anti-Chemerin immobilizasyonu sonrası, altın yüzeylerinde bulunan elementlerin yüzde miktarları EDS analizi ile belirlendi.

3.2.6.5.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Chemerin biyosensörünün tasarımı esnasında, her inkübasyon aşaması ardından elektrot yüzeyinde oluşan kimyasal bağların incelenmesi amacıyla 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 3DPGE'lerin, yüzeyde SAM oluşumu öncesi ve anti-Chemerin immobilizasyonu sonrası FTIR spektrumları elde edildi.

BÖLÜM 4

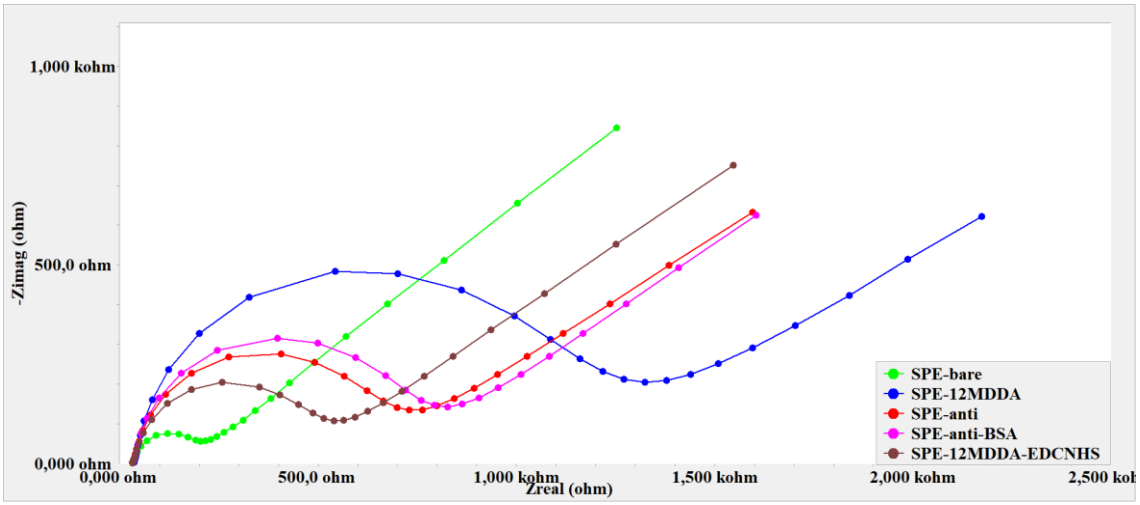
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Omentin Biyosensörüne Ait Deneysel Sonuçlar

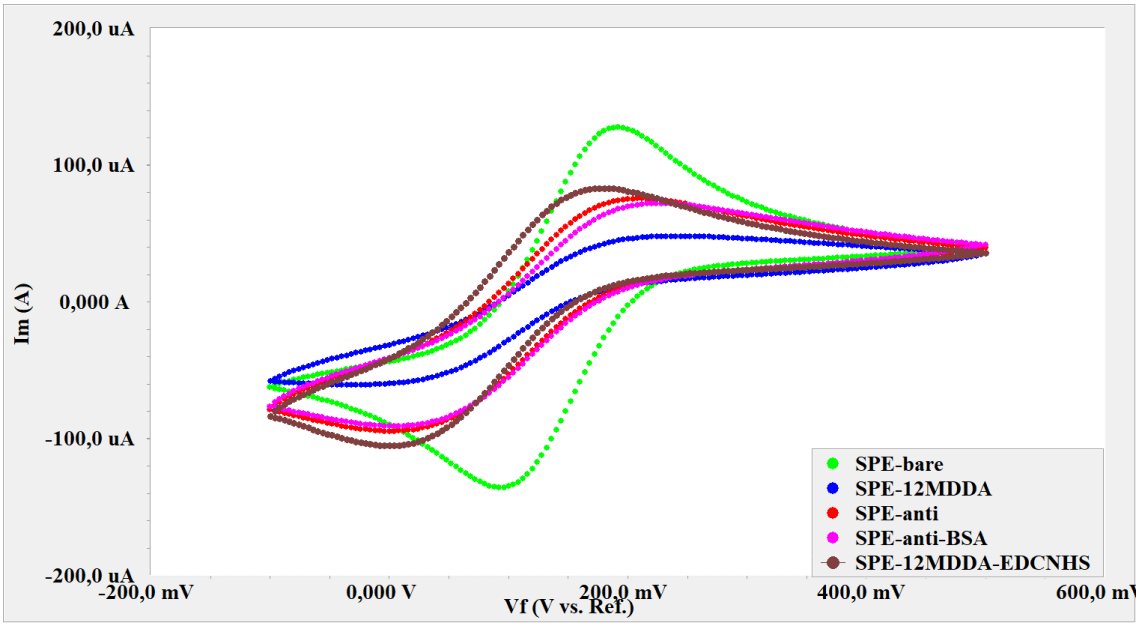
Omentin biyosensörünün tasarımında yer alan bütün optimizasyon çalışmalarında, her bir immobilizasyon basamağı ardından basamağın başarısının teyidi için EİS ve CV ölçümleri alındı. Her bir ölçüm sonrası elde edilen EİS ve CV grafikleri sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de yer alan immobilizasyon adımlarındaki elektrotların isimlendirmeleri aşağıdaki gibidir:

- **SPE-bare**: SPE yalın haldeki elektrot,
- **SPE-12MDDA**: 12-MDDA ile yüzeyde SAM oluşumu sonrasına ait elektrot,
- **SPE-12MDDA-EDCNHS:** SAM'lerin EDC/NHS aktivasyonu sonrasına ait elektrot,
- **SPE-anti**: EDC/NHS aktivasyonu ardından Anti-Omentin immobilize edilmiş elektrot,
- **SPE-anti-BSA**: Anti-Omentin immobilizasyonu ardından BSA inkübasyonu gerçekleştirilmiş elektrot,



Şekil 4.1. Omentin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.2. Omentin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen döngüsel voltamogramlar

Şekil 4.1'de, Omentin biyosensörünün EİS ölçümleri sonucu elde edilen Nyquist eğrileri verilmiştir. Bu eğriler üzerinde yer alan yarım dairelerin çapları yük transfer dirençlerini ifade etmektedir. Şekil 4.2'de verilen döngüsel voltamogramlardaki pik yükseklikleri ise elektrot yüzeyinin elektrik iletkenliği ile doğru orantılıdır.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2‘ye bakıldığında SPE-bare elektrot, en düşük yük transfer direncine ve en geniş döngüsel voltamogram pikine sahiptir. Bu durum bare elektrodun en yüksek iletkenliğe sahip olduğunun göstergesidir. 12-MDDA inkübasyonu sonrası elektrot yüzeyinde SAM oluşumu ardından, SPE-12MDDA elektrotuna ait Nyquist eğrisinin yarım daire çapında büyük bir artış meydana gelmiş ve bu durum elektrotun yük transfer direncinde büyük bir artış gerçekleştiğini doğrulamıştır. Dirençteki bu artışı, SPE-12MDDA elektrotunun döngüsel voltamogram pikinin daralması, yani elektrot iletkenliğinin azalması desteklemektedir. Bu durum beklenen bir sonuçtur.

Elektrot yüzeyindeki SAM’lerin, EDC/NHS ile aktivasyonunun, elektrot yüzeyinin iletkenliğini arttırması beklenen sonuçtur. Şekil 4.1 incelendiğinde, EDC/NHS aktivasyonu sonrasına ait elektrotun Nyquist eğrisinin yarım daire çapında büyük ölçüde azalış meydana gelmesi bu durumu teyit etmektedir. EDC/NHS’ye ait döngüsel voltamogramın da genişliğinin artarak bare elektrota yakınlaşması, bu iletkenlik artışını doğrulamaktadır.

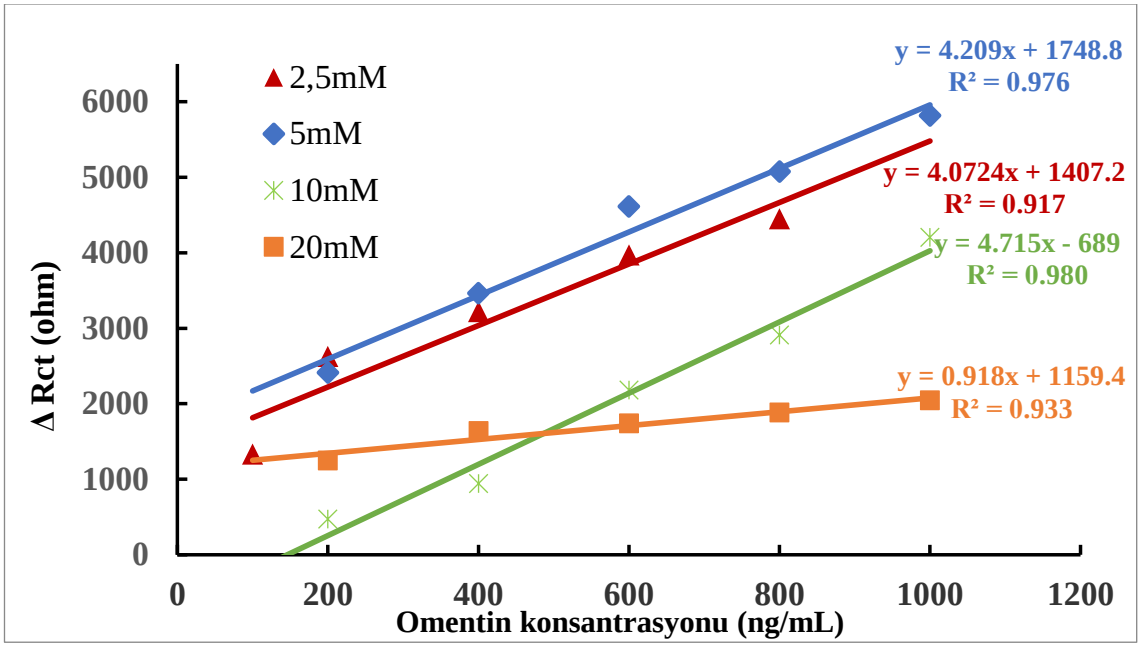
EDC/NHS aktivasyonu ardından Anti-Omentin immobilizasyonunun yapılması SPE-anti elektrotunun Nyquist eğrisindeki yarım daire çapını, EDC/NHS elektrotuna ait yarım daire çapına göre daha da arttırmış ve yük transfer direncinde artışa sebep olmuştur. Şekil 4.2‘de yer alan SPE-anti elektrotuna ait döngüsel voltamogram piki de bunu desteklemektedir. Bu durum, yüzeye bağlanan antikorların elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron transferine engel olduğunun kanıtı ve aynı zamanda başarılı antikor immobilizasyonunun doğrulaması olarak değerlendirilebilir.

Son olarak, Omentin proteininin elektrot yüzeyine spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek için BSA inkübasyonu gerçekleştirilmiş ve inkübasyon sonrası elde edilen Nyquist eğrisinin (SPE-anti-BSA) yarım daire çapında bir artış meydana geldiği gözükmektedir. Bu durum, elektrot yüzeyindeki yük transfer direncinin arttığının ve döngüsel voltamogram pikinden görüldüğü üzere elektrot iletkenliğinin azaldığının göstergesidir ve beklenen bir sonuçtur.

4.1.1. Omentin biyosensörünün optimizasyonuna ait deneysel sonuçlar

4.1.1.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu

SPE'lerin altın yüzeyi üzerinde ara kol olarak görev yapacak olan 12-MDDA molekülünün konsantrasyonunun optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla 2.5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM olmak üzere dört farklı 12-MDDA konsantrasyonlarında hazırlanan farklı biyosensörler ile denemeler gerçekleştirildi. Biyosensör hazırlığında, Çizelge 3.1'de verilen genel protokol kullanıldı. 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL olmak üzere altı farklı artan Omentin proteini konsantrasyonlarında inkübasyonların her biri ardından CV ve EİS ölçümü alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve Omentin biyosensörün için 12-MDDA molekülünün optimum konsantrasyonu belirlendi. Oluşturulan standart grafik Şekil 4.3'deki gibidir. Grafikte yer alan her bir doğruya ait doğru denklemi ve R^2 değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi (▲: 2.5 mM 12-MDDA, ♦: 5 mM 12-MDDA, ж: 10 mM 12-MDDA, ■: 20 mM 12-MDDA)

Çizelge 4.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri

12-MDDA konsantrasyonu	Doğru denklemi	R^2
2.5 mM	y = 4.0724x + 1407.2	R^2 = 0.9177
5 mM	y = 4.209x + 1748.8	R^2 = 0.976
10 mM	y = 4.715x - 689	R^2 = 0.9808
20 mM	y = 0.918x + 1159.4	R^2 = 0.9339

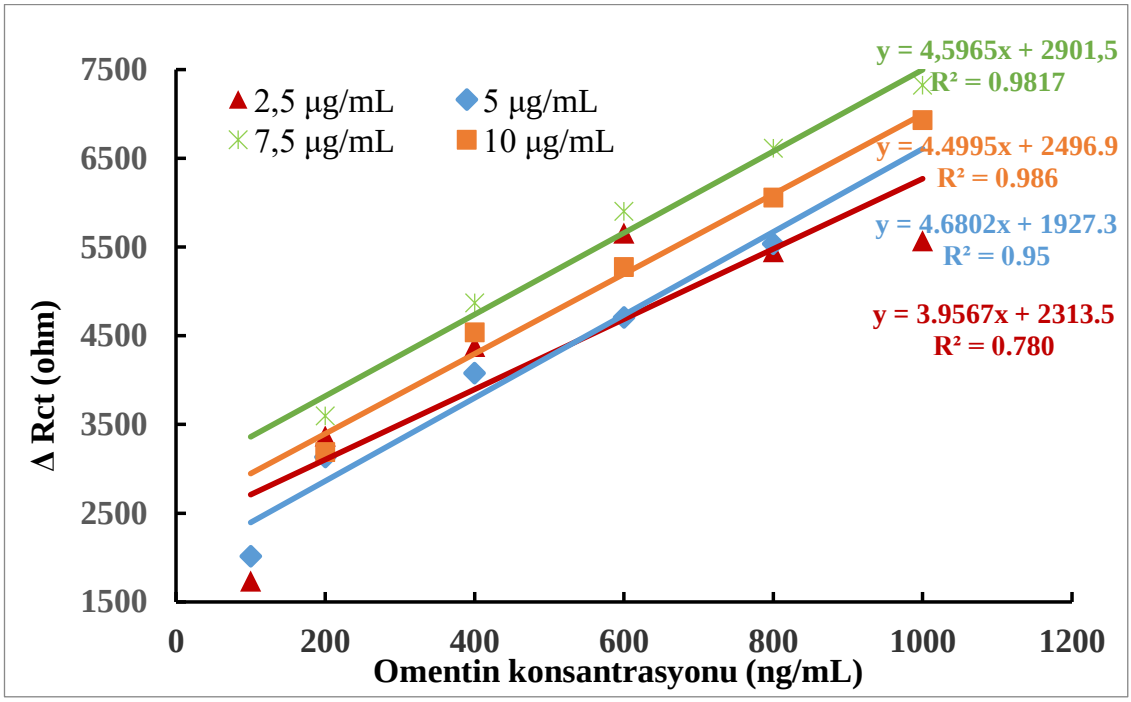
4 farklı 12-MDDA konsantrasyonuna ait impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleri ile çizilen standart grafik incelendiğinde SPE'lerin yüzeyine immobilize edilmiş Anti-Omentin molekülleri üzerine bağlanan Omentin protein miktarındaki her artış SPE'lerin yüzeyindeki yük transfer direncinin de doğrusal artışına sebep olmuştur. SPE'lerin yüzeyindeki SAM tabakası oluşumunda kullanılan 12-MDDA konsantrasyonunun 2.5 mM ve 5 mM olduğu denemelerde konsantrasyondaki artışın biyosensör cevabında bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Bu artışın 12-MDDA konsantrasyonunun 2.5 mM'dan 5 mM'a çıkarılması ile daha düzenli SAM oluşumuna neden olduğu ve antikor immobilizasyonu için daha uygun ortam sağladığı söylenebilir. Fakat konsantrasyonun daha da arttırılarak 10 mM ve 20 mM olarak kullanıldığı denemelerde ise biyosensör cevabında bir azalış olduğu gözlenmiştir. Bu durum, yüksek 12-MDDA konsantrasyonlarının SAM tabakasının oluşumunu olumsuz etkilemesi ile açıklanabilir. Biyosensör cevaplarındaki gözlenen düşüş ve doğrusallıktan sapmalar, 5 mM'dan yüksek konsantrasyonlarda 12-MDDA kullanımı ile oluşan SAM tabakası üzerine antikor immobilizasyonunun da düzensiz olduğunun bir göstergesidir.

Bu sonuçlardan yola çıkılarak SPE'lerin altın yüzeyleri üzerinde SAM oluşturmak üzere kullanılan 12-MDDA ara kol molekülünün optimum konsantrasyonu 5 mM olarak seçildi. Bundan sonra hazırlanan tüm biyosensörlerde bu konsantrasyon kullanıldı.

4.1.1.2. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonu

12-MDDA ara kol molekülünün konsantrasyonunun optimizasyonu ardından elektrot yüzeyindeki Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla Anti-Omentin immobilizasyonu basamağında 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/mL olmak üzere dört farklı Anti-Omentin konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile artan Omentin proteini konsantrasyonlarına karşı EİS ölçümleri alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve Omentin biyosensörü için optimum Anti-Omentin konsantrasyonu belirlendi. Oluşturulan standart grafik Şekil 4.4'de verilmiştir.

Grafikte yer alan her bir biyosensöre ait doğru denklemi ve R^2 değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Anti-Omentin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi (▲: 2.5 µg/mL anti-Omentin, ♦: 5 µg/mL anti-Omentin, ж: 7.5 µg/mL anti-Omentin, ■: 10 µg/mL anti-Omentin)

Çizelge 4.2. Anti-Omentin konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri

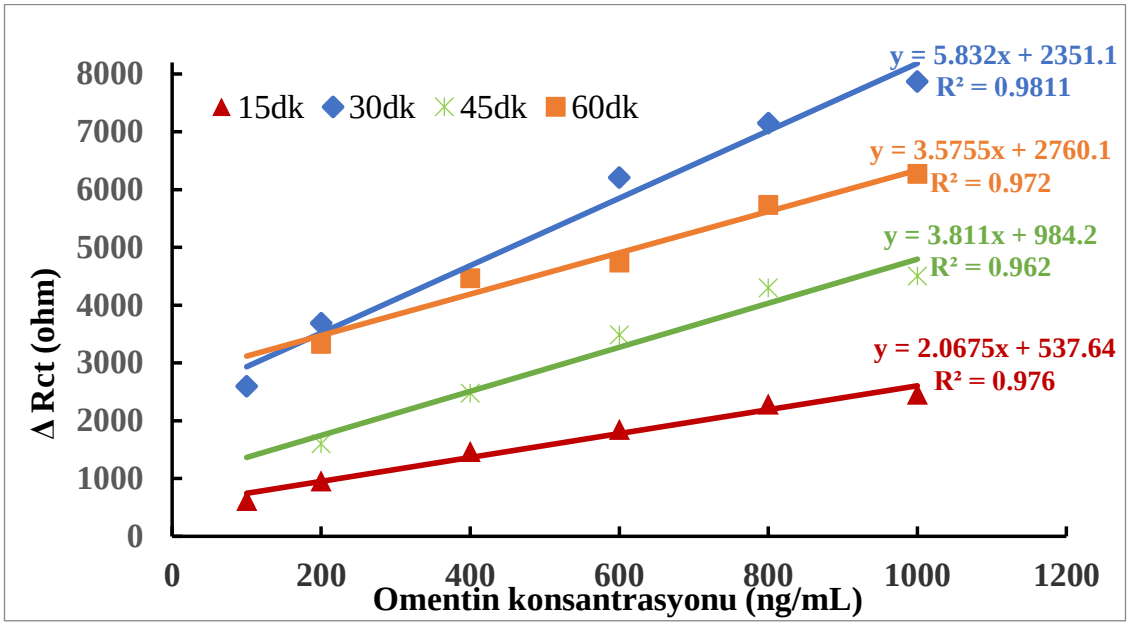
Anti-Omentin konsantrasyonu	Doğru denklemi	R^2
2.5 µg/mL	y = 3.9567x + 2313.5	R^2 = 0.7803
5 µg/mL	y = 4.6802x + 1927.3	R^2 = 0.958
7.5 µg/mL	y = 4.5965x + 2901.5	R^2 = 0.981
10 µg/mL	y = 4.4995x + 2496.9	R^2 = 0.9861

Şekil 4.4'deki standart grafikler incelendiğinde SPE'lerin yüzeyine immobilize edilen Anti-Omentin miktarındaki azalışın biyosensör cevabında düşüşe sebep olduğu, konsantrasyonun 2.5 µg/mL olduğu denemelerde artan Omentin protein konsantrasyonuna karşı yapılan ölçümlerde doğrusallıkta da ayrıca bozulma olduğu eğim çizgisinin R^2 değerindeki azalmadan da açıkça gözükmektedir. 5 µg/mL Anti-Omentin konsantrasyonunda biyosensör cevabının 2.5 µg/mL konsantrasyona kıyasla çok da farklı olmadığı ama artan Anti-Omentin miktarı ile doğru orantılı olarak ölçümler arası doğrusallığın da arttığı gözükmektedir. Anti-Omentin konsantrasyonunun 7.5 µg/mL'ye çıkarılmasıyla en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği ve artan Omentin proteini konsantrasyonuna karşı yapılan ölçümlerde doğrusal cevap alındığı gözükmektedir. Yüzeydeki Anti-Omentin konsantrasyonunun 10 µg/mL 'ye çıkarılmasıyla biyosensör cevaplarında düşmeler gözlenmiştir. Çalışma elektrotu yüzeyindeki Anti-Omentin miktarının gereğinden fazla miktarda olması, SAM yüzeyinde antikor immobilizasyonunun çok sıkı olmasına neden olabilir, bu durumun antijenin bağlanması için bir sterik engel oluşturması olasıdır. Ayıca fazla miktardaki antikor SAM tabakasında çökmeler meydana getirebilir, bu da biyosensör cevabındaki düşmelerin olası sebeplerinden biri olabilir. Bütün bu sonuçlar incelendiğinde SPE'lerin yüzeyinde bulunması gereken optimum Anti-Omentin konsantrasyonunun 7.5 µg/mL olmasına ve çalışmanın geri kalan parametrelerindeki denemelerde bu Anti-Omentin konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.1.3. Omentin'in inkübasyon süresinin optimizasyonu

SPE'lerin altın yüzeyleri üzerinde Anti-Omentin / Omentin proteini etkileşimi için gerekli olan inkübasyon süresinin optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, Anti-Omentin / Omentin proteini etkileşimi basamağında 15, 30, 45 ve 60 dakika olmak üzere dört farklı inkübasyon süresi kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile artan Omentin proteini konsantrasyonlarına karşı EİS ölçümleri alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve Omentin biyosensörü için optimum Omentin proteini inkübasyon süresi belirlendi. Oluşturulan standart grafik Şekil 4.5'te verilmiştir.

Grafikte yer alan her bir biyosensöre ait doğru denklemi ve R^2 değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Omentin inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi (▲: 15 dakika, ♦: 30 dakika, ж: 45 dakika, ■: 60 dakika)

Çizelge 4.3. Omentin inkübasyon süresinin optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri

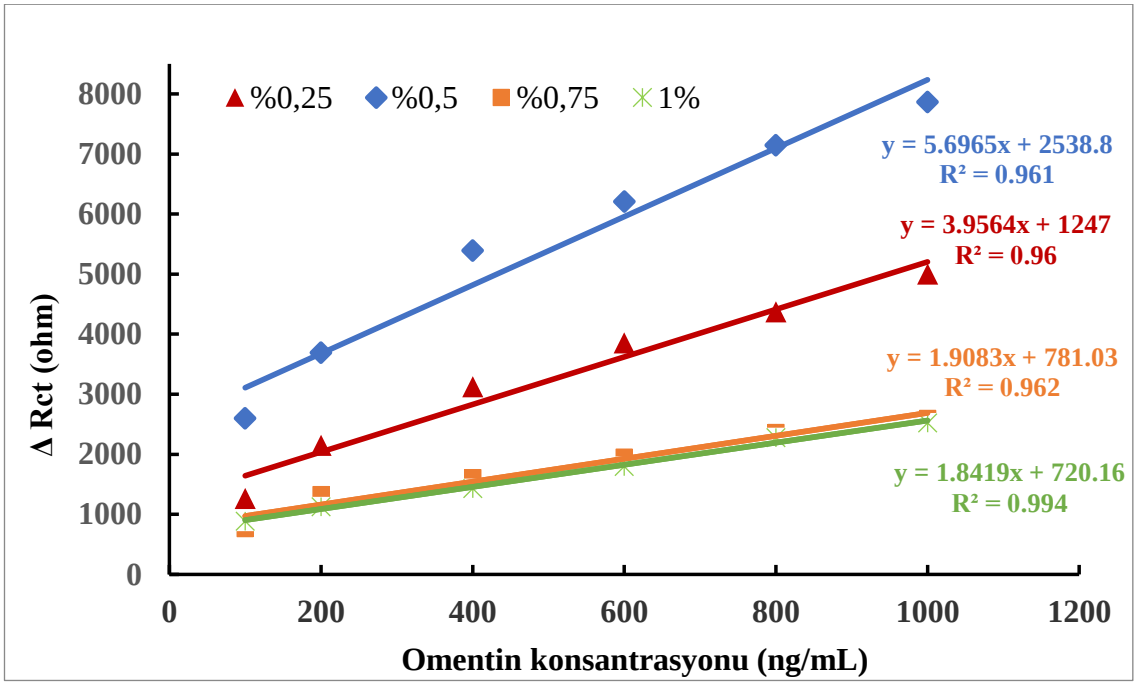
Anti-Omentin konsantrasyonu	Doğru denklemi	R^2
15 dakika	y = 2.0675x + 537.64	R^2 = 0.9769
30 dakika	y = 5.832x + 2351.1	R^2 = 0.9811
45 dakika	y = 3.811x + 984.2	R^2 = 0.9627
60 dakika	y = 3.5755x + 2760.1	R^2 = 0.9724

Şekil 4.5 incelendiğinde 15 dakika inkübasyon süresine sahip olan biyosensörün diğer biyosensörlere göre çok düşük cevap verdiği gözükmektedir. Bu durum, biyosensör yüzeyindeki anti-Omentin / Omentin etkileşimi için tanınan inkübasyon süresinin yeterli olmadığına işaret ediyor olabilir. 30 dakika inkübasyona bırakılan biyosensör en yüksek cevabı vermiştir; aynı zamanda artan Omentin konsantrasyonuna karşı yapılan ölçümler de bu inkübasyon süresinde en iyi doğrusallığa sahiptir. İnkübasyon süresi 45 ve 60 dakika olarak arttırıldığında biyosensör cevaplarında azalış görülmüştür. Bu azalış, inkübasyon süresinin arttırılmasıyla SPE yüzeyinde bulunan 10 µL Omentin porsiyonlarının artan süre ile yüzeyden buharlaşabilme veya altın yüzey dışına taşabilme riskini arttırmasından kaynaklanıyor olabilir. Her ne kadar 45 ve 60 dakika inkübasyon sürelerine ait R^2 değerleri göreceli olarak kötü olmasa da, bu sürelerin biyosensörün ölçüm süresini 30 dakika ölçüm süresine kıyasla sırasıyla %50 ve %100 oranında arttırması tercih edilen bir durum değildir. Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında Omentin proteini için optimum inkübasyon süresi 30 dakika olarak seçildi ve çalışmanın geri kalan parametrelerindeki denemelerde bu Anti-Omentin konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

4.1.1.4. BSA konsantrasyonunun optimizasyonu

Omentin biyosensörü için BSA çözeltisinin konsantrasyonunun optimizasyonu çalışıldı. Bu amaçla %0.25, %0.5, %0.75 ve %1 (w/v) olmak üzere dört farklı BSA konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile artan Omentin proteini

konsantrasyonlarına karşı EİS ölçümleri alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak standart grafikler oluşturuldu ve Omentin biyosensörü için optimum BSA konsantrasyonu belirlendi. Oluşturulan standart grafikler Şekil 4.6'daki gibidir. Grafikte yer alan her bir biyosensöre ait doğru denklemi ve R^2 değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.6. BSA konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi (▲: %0.25, ♦: %0.5, ж: %0.75, ■:% 1)

Çizelge 4.4. BSA konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen standart grafiklere ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri

Anti-Omentin konsantrasyonu	Doğru denklemi	R^2
%0.25	y = 3.9564x + 1247	R^2 = 0.9656
%0.5	y = 5.6965x + 2538.8	R^2 = 0.9614
%0.75	y = 1.9083x + 781.03	R^2 = 0.9623
%1	y = 1.8419x + 720.16	R^2 = 0.9945

Şekil 4.6 incelendiğinde BSA konsantrasyonunun gerekenden düşük miktarda kullanılması biyosensör yüzeyindeki spesifik olmayan bağlanmalarının sayısını arttıracağından dolayı biyosensör cevabında artış olması beklenen bir durumdur. Grafik üzerinde de görüldüğü üzere %0.25 ve %0.5 BSA (w/v) kullanıldığında biyosensör cevabındaki artış bu duruma desteklemektedir.

BSA konsantrasyonunun %0.75'e çıkarılmasıyla biyosensör cevabında gözlenen düşüşün yüzeydeki spesifik olmayan bağlanmaların azalmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Konsantrasyonun %0.75'den %1'e çıkarılmasının biyosensör cevabında daha fazla bir düşüşe sebep olmadığı, bunun da nedeninin biyosensör yüzeyindeki spesifik olmayan bağlanma potansiyeli bulunan pozisyonların BSA tarafından doygunluğa ulaşmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ayrıca %1 BSA konsantrasyonu kullanıldığında, artan Omentin konsantrasyonuna karşı alınan ölçümlere ait standart grafiğin R^2 değeri de ölçümlerdeki doğrusallığın işaretidir. Bu sebeple %1 BSA (w/v) konsantrasyonu optimum olarak seçildi. Bundan sonra hazırlanan bütün biyosensörlerde bu değer kullanıldı.

4.1.2. Omentin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmalarına ait deneysel sonuçlar

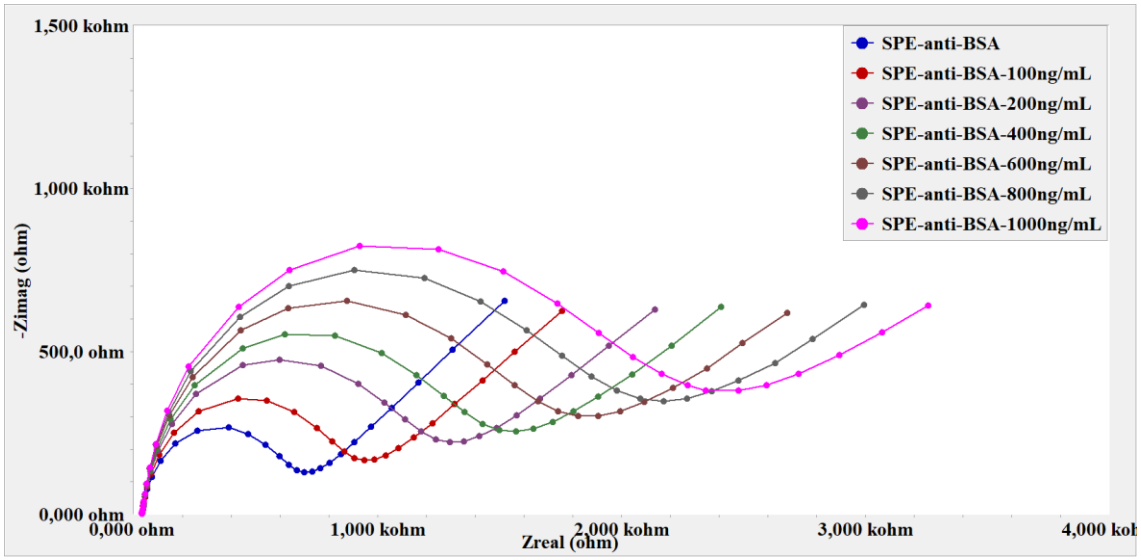
Omentin biyosensörünün tasarımında kullanılan parametrelerin optimizasyonlarının ardından biyosensöre ait karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan bütün biyosensörler optimum olarak belirlenen parametreler ile hazırlandı. Biyosensör hazırlığında izlenilen yol ve kullanılan optimum parametreler Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Omentin biyosensörünün optimum hazırlık parametreleri

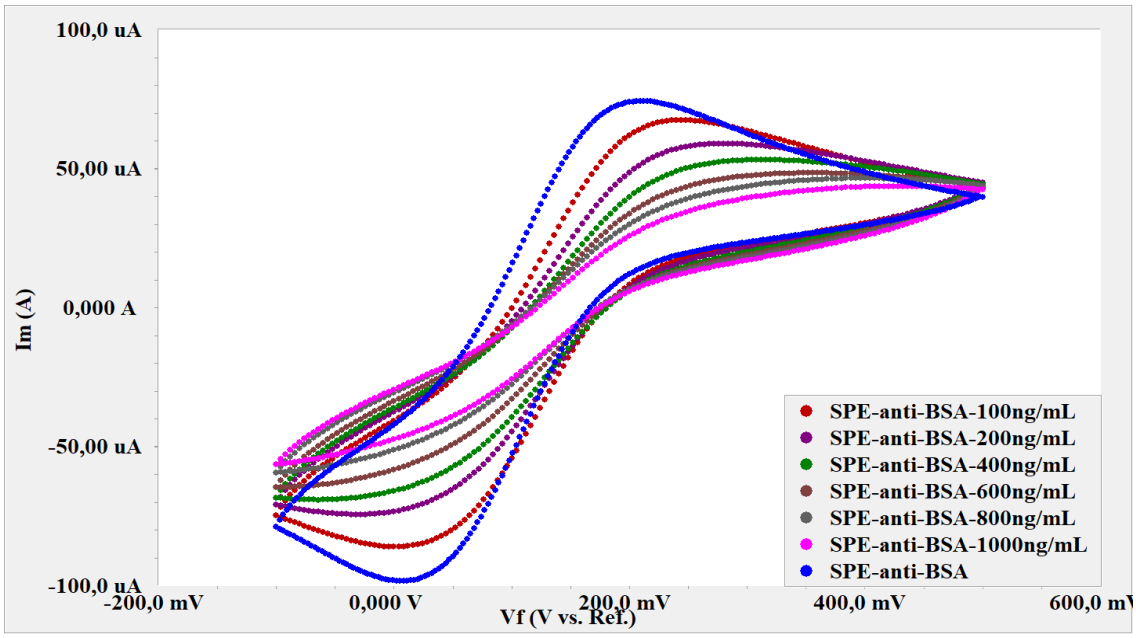
Aşama	Yapılan işlem	İnkübasyon süresi
1	SPE'lerin ultra saf su + etanol ile yıkaması +(CV ve EİS)	-
2	**5 mM** 12-MDDA konsantrasyonu içerisinde inkübasyon +(CV ve EİS)	16 saat
3	EDC / NHS aktivasyonu +(CV ve EİS)	30 dakika
4	**7.5 µg/mL** Anti-Omentin konsantrasyonu ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
5	**%1** BSA (w/v) çözeltisi ile inkübasyon +(CV ve EİS)	1 saat
6	100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/mL ile inkübasyon +(CV ve EİS)	**30 dakika**

4.1.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı

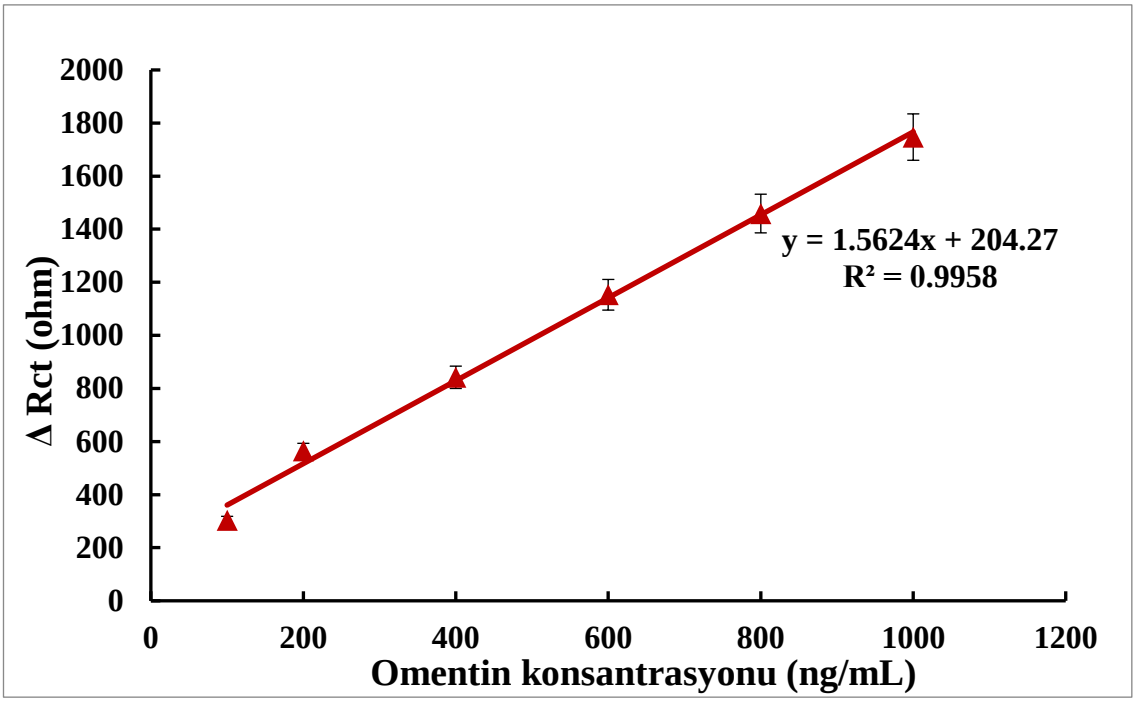
Çizelge 4.5'te verilen optimum parametreler ile hazırlanan Omentin biyosensörleri ile artan Omentin konsantrasyonlarında (100-1000 ng/mL) CV ve EİS ölçümleri alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.7'de, CV ölçümlerinden elde edilen döngüsel voltamogramlar Şekil 4.8'de ve Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleri ile oluşturulan standart grafik Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Omentin biyosensörünün 100-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki EİS ölçümlerine ait Nyquist eğrileri



Şekil 4.8. Omentin biyosensörünün 100-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları



Şekil 4.9. Omentin biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ait standart grafik

Şekil 4.7'ye bakıldığında, SPE'lerin yüzeyine immobilize edilen Anti-Omentin ile Omentin proteini etkileşimindeki artışın, Nyquist eğrilerindeki yarım daire çaplarında doğru orantılı bir artışa sebep olduğu görülmektedir. Yarım daire çaplarındaki bu artış, yüzeyde antikor / antijen kompleksinin oluşumuyla elektrot yüzeyindeki iletkenliği azalmasından kaynaklanır. Şekil 4.8'de, Omentin proteini miktarındaki artış ile döngüsel voltamogramların tepe akımlarının azalış göstermesi bunun bir diğer göstergesidir. Biyosensöre ait standart grafik (Şekil 4.9) incelendiğinde, Omentin konsantrasyonundaki artışın, biyosensör cevabını doğrusal olarak arttırdığı iyi R^2 değerinden görülmektedir.

Omentin biyosensörünün Omentin tayinine yönelik LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 14.57 ve 48.5 ng/mL olarak hesaplandı.

4.1.2.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Biyosensörün belirli sabit Omentin konsantrasyonlarında tekrarlanabilir sonuçlar verip vermediğini incelemek adına 400, 600 ve 800 ng/mL Omentin proteini konsansantrasyonlarında hazırlanan biyosensörler ile 4'er tekrar ölçüm alındı. Alınan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden biyosensörün seçilen

konsantrasyonlarda ölçtüğü Omentin miktarlarının ortalaması alınarak standart sapmaları ve geri kazanımları hesaplanmış sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Omentin biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçlarına ait tablo

Eklenen Omentin miktarı (ng/mL)	***Biyosensör ile ölçülen Omentin miktarı (ng/mL)**	**Standart Sapma**	**Geri Kazanım (%)**
400	384.962	4.7365	96
600	589.615	16.2945	98
800	810.381	11.0708	101

***4 ölçümün ortalama değeri verilmiştir.

Çizelge 4.6'daki veriler incelendiğinde Omentin biyosensörünün, 400, 600 ve 800 ng/mL Omentin konsantrasyonunda yapılan ölçümlerde Omentin miktarını sırasıyla, 384, 589 ve 810 ng/mL olarak tespit ettiği ve biyosensörün düşük standart sapmaya ve yüksek geri kazanıma sahip olduğu gösterildi.

Omentin biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini ölçmek adına optimum parametreler kullanılarak hazırlanan 8 farklı biyosensör ile doğrusal tayin aralığında EİS ölçümleri alınmış ve tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği test edilmiştir. EİS ölçümleri alınan biyosensörlerin Nyquist eğrileri üzerinden ΔRct değerleri hesaplanmıştır. Bu ΔRct değerleri ile altı farklı Omentin proteini konsantrasyonu arasında bir standart grafik çizilmiştir. Her bir biyosensör için çizilen standart grafiğin eğilim çizgisine ait denklemler ve R^2 değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Omentin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait denklemler

Biyosensör	Standart grafikteki doğru denklemi	R^2
1	y = 1.8419x + 720.16	R^2 = 0.9945
2	y = 1.929x + 1250.5	R^2 = 0.9803
3	y = 1.4235x + 635.5	R^2 = 0.9864
4	y = 1.106x + 1888.2	R^2 = 0.9906
5	y = 1.3894x + 1264.2	R^2 = 0.9818
6	y = 1.3465x + 1217.9	R^2 = 0.9817
7	y = 1.198x + 302.2	R^2 = 0.9980
8	y = 1.4905x + 258.9	R^2 = 0.9997

Çizelge 4.7'de görüldüğü üzere 8 farklı biyosensör ile yapılan tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait sonuçların iyi olduğu, biyosensörlere ait standart grafiklerin eğilim çizgilerinin denklemlerinin birbirlerine benzerliğinden ve iyi R^2 değerlerinden görülmektedir.

4.1.2.3. Omentin biyosensörünün yapay serum analizi

Omentin biyosensörünün ticari olarak satılan yapay serumda Omentin proteinini tespit edebilirliği çalışılmıştır. Ticari olarak satılan 1X yapay serum çözeltisi içerisine ek olarak, son konsantrasyonları sırasıyla 4.5 mM, 5 mM, 145 mM olacak şekilde sırasıyla KCl, $CaCl_2$ ve NaCl ilave edilmiştir. Omentin proteini, hazırlanan bu çözelti içerisinde yeniden porsiyonlanarak 200, 400, 600 ve 800 ng/mL Omentin konsantrasyonunda EİS ölçümleri alındı ve biyosensörün yapay serum içerisinde Omentin proteinini tespit edebilirliği test edildi. EİS ölçümleri sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri üzerinden ΔRct değerleri hesaplanarak biyosensöre ait geri kazanım değerleri hesaplandı. Omentin biyosensörünün yapay serum uygulamasına ait sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Omentin biyosensörünün yapay serum uygulaması

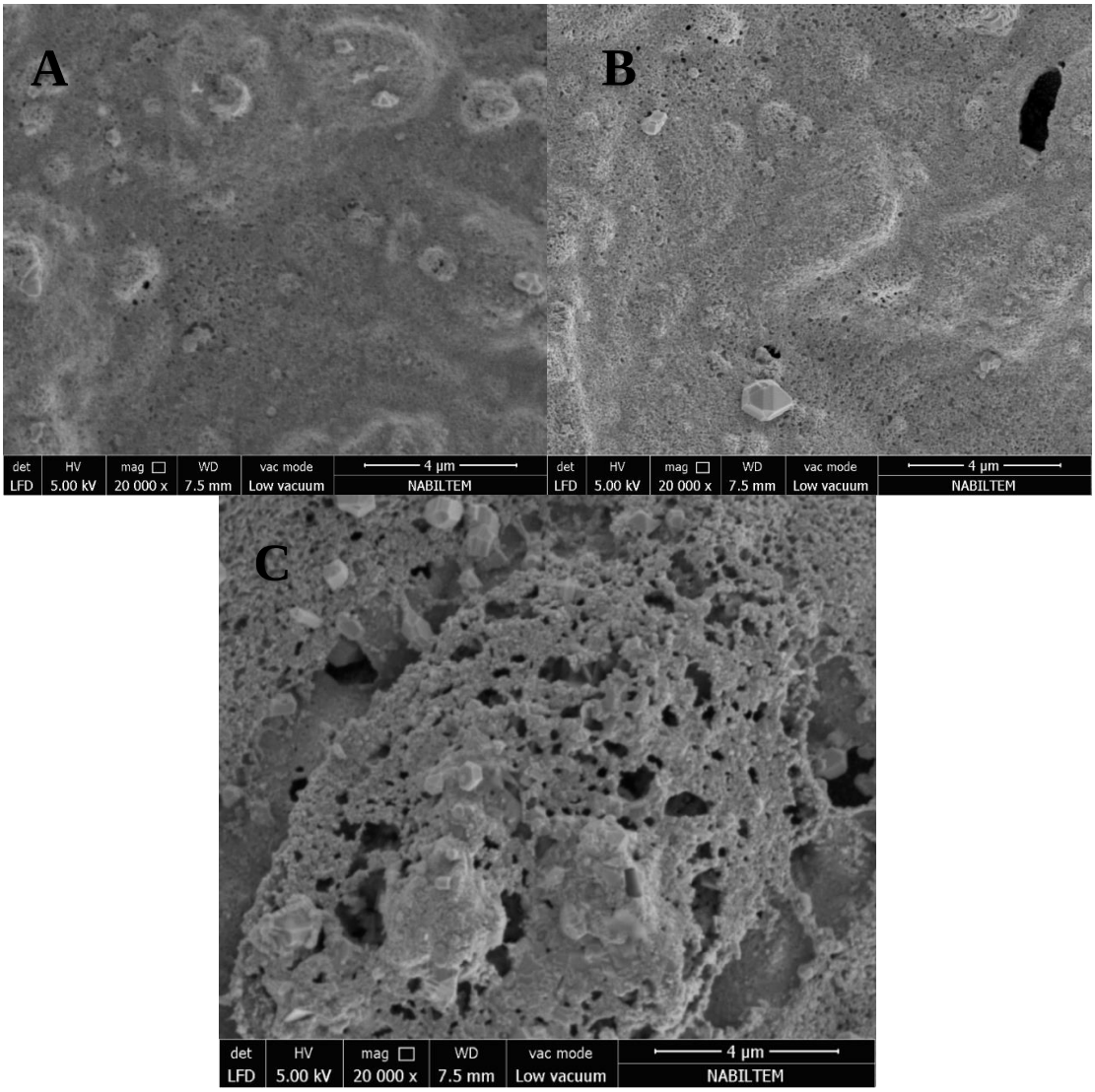
Yapay serumdaki Omentin miktarı (ng/mL)	Biyosensör ile ölçülen Omentin miktarı (ng/mL)	Geri Kazanım (%)
200	204.88	102
400	414.33	104
600	626.41	104
800	808.43	101

Yapay serum çözeltisi içerisinde hazırlanan Omentin proteininin 4 farklı konsantrasyonuna karşı alınan ölçümlerden, biyosensör cevaplarının yapay serum çözeltisinin içerdiği serum albümini, transferrin, rekombinant insülin gibi protein yapılı biyomoleküllerden ve tuz moleküllerinden etkilenmediği görülmektedir. Bu sonuç geliştirilen biyosensörün, yapay serum örneklerinde omentin proteinini spesifik olarak analizleme potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

4.1.2.4. Omentin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu

4.1.2.4.1. Taramalı elektron mikroskobu

Omentin biyosensörünün tasarımında, immobilizasyon aşamalarının SPE'lerin yüzeyinde meydana getirdiği değişiklikleri gözlemlemek için SEM görüntüleme analizleri gerçekleştirilmiştir.

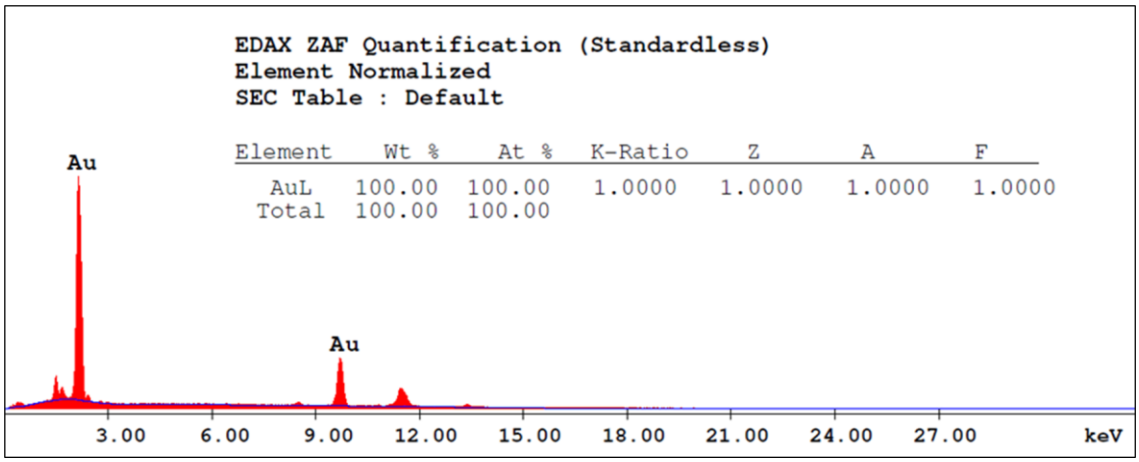


Şekil 4.10. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının SEM görüntüleri (A: SPE yalın hali, B: SPE-12MDDA, C: SPE-12MDDA-anti-Omentin)

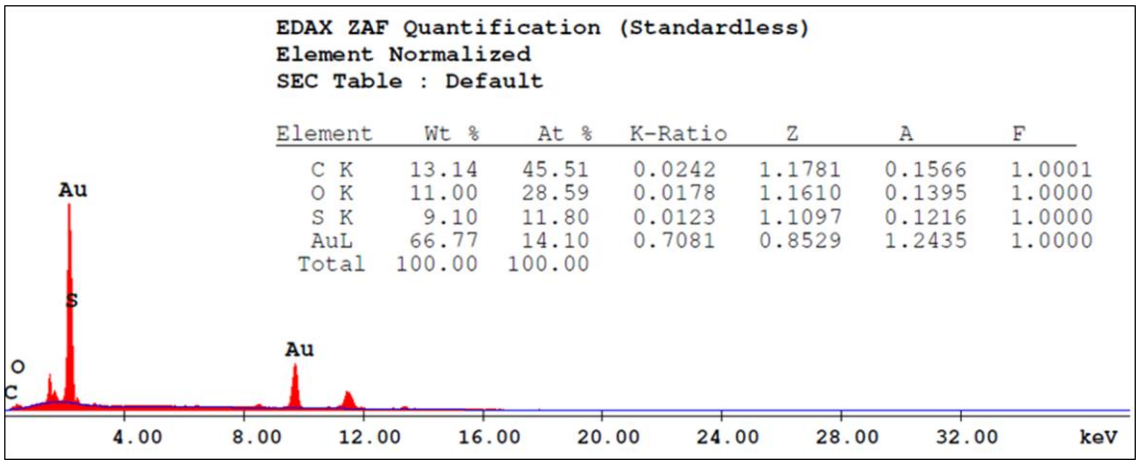
Şekil 4.10 (A) SAM oluşumu öncesi yalın haldeki SPE yüzeyini göstermektedir. Şekil 4.10 (B)'deki görüntü ise 12-MDDA kullanımı ile SPE'lerin yüzeyinde SAM oluşumu sonrasına aittir. Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası SPE yüzeyine ait görüntü ise Şekil 4.10 (C)'deki gibidir. Yalın elektrot (A) ve SAM oluşumu sonrası (B) görüntüleri incelendiğinde elektrot yüzeyinin görüntüsünde fark edilir bir değişim göze çarpmaktadır. Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası çalışma elektrodu yüzeyi (C) süngerimsi bir görünüm kazanarak SAM oluşumu sonrası elde edilen görüntüden farklanmıştır. İmmobilizasyon adımlarının her birinde elektrot yüzeyinde yüzey görüntülerinin farklı olması elektrot yüzeyindeki değişimleri desteklemektedir.

4.1.2.4.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi

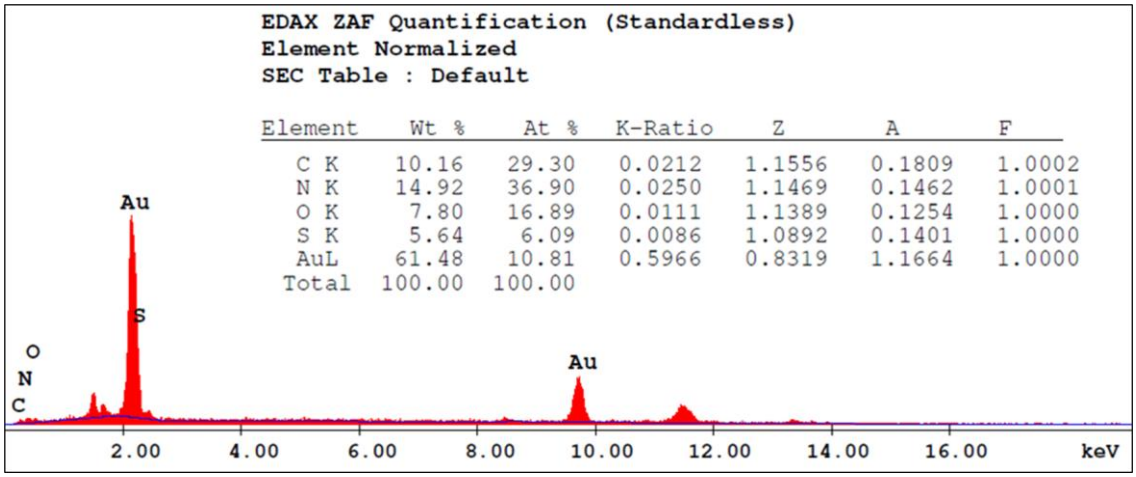
Omentin biyosensörünün tasarımında her inkübasyon aşaması ardından yüzeydeki element miktarlarındaki değişimleri gözlemlemek için EDS analizleri gerçekleştirildi. Biyosensörün altın yüzeyinin, SAM oluşumu öncesi yalın halini, 12-MDDA inkübasyonu ile SAM oluşumu sonrası ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası yüzeydeki elementel dağılımı gösteren EDS spektrumları Şekil 4.11, Şekil 4.12, ve Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları (A: SPE yalın hal)



Şekil 4.12. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları (B: SPE-12MDDA)

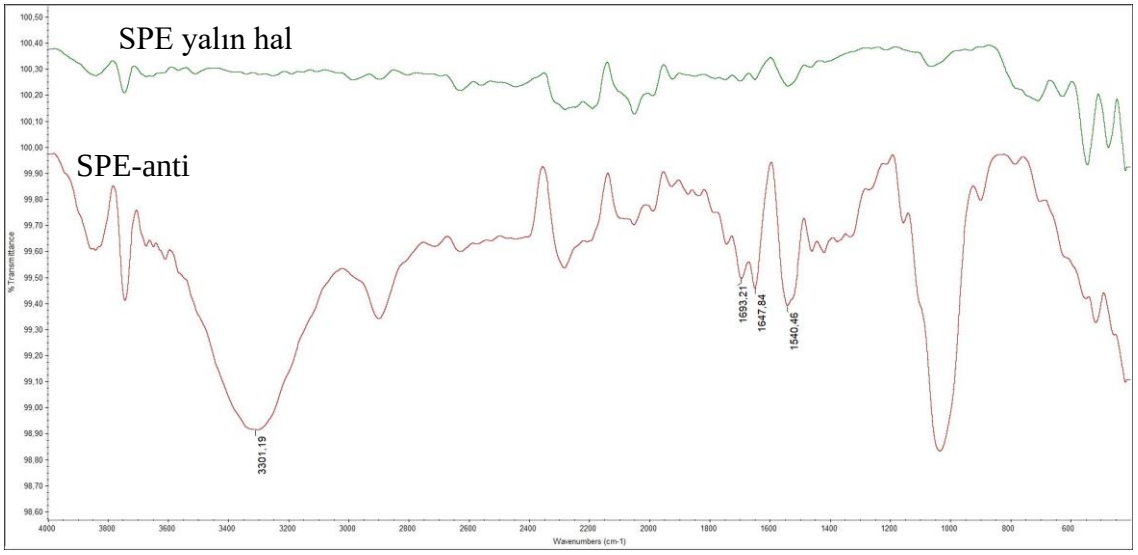


Şekil 4.13. Omentin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları (C: SPE-12MDDA-anti-Omentin)

Şekil 4.11'de verilen spektrumda SAM oluşumu öncesi yalın haldeki SPE altın yüzeyine aittir. Çalışma elektrotunun saf altın olması, spektrumda sadece altın elementine ait piklerin görülmesine sebep olmuştur. Şekil 4.12'ye bakıldığında, 12-MDDA kullanımı ile SPE'lerin yüzeyinde SAM oluşumu sonrası, spektrumda karbon, oksijen ve kükürt elementine ait piklerin belirdiği, bunun da 12-MDDA'nın yapısında bulundurduğu karboksilik asit ve tiyol gruplarından ileri geldiği düşünülmektedir. Şekil 4.13'te ise SPE yüzeyine Anti-Omentin immobilizasyonu yapılması ardından, spektrumda azot elementine ait yüzdenin arttığı, bunun da Anti-Omentin'in taşıdığı amin gruplarından ve SAM'ler ile aralarında yapmış olduğu amid bağlarındaki N atomlarından meydana gelmesi ile yorumlanabilir.

4.1.2.4.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Omentin biyosensörünün, SAM oluşumu öncesi yalın halinin ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası yüzeyine ait FTIR spektrumu Şekil 4.14'te verilmiştir.

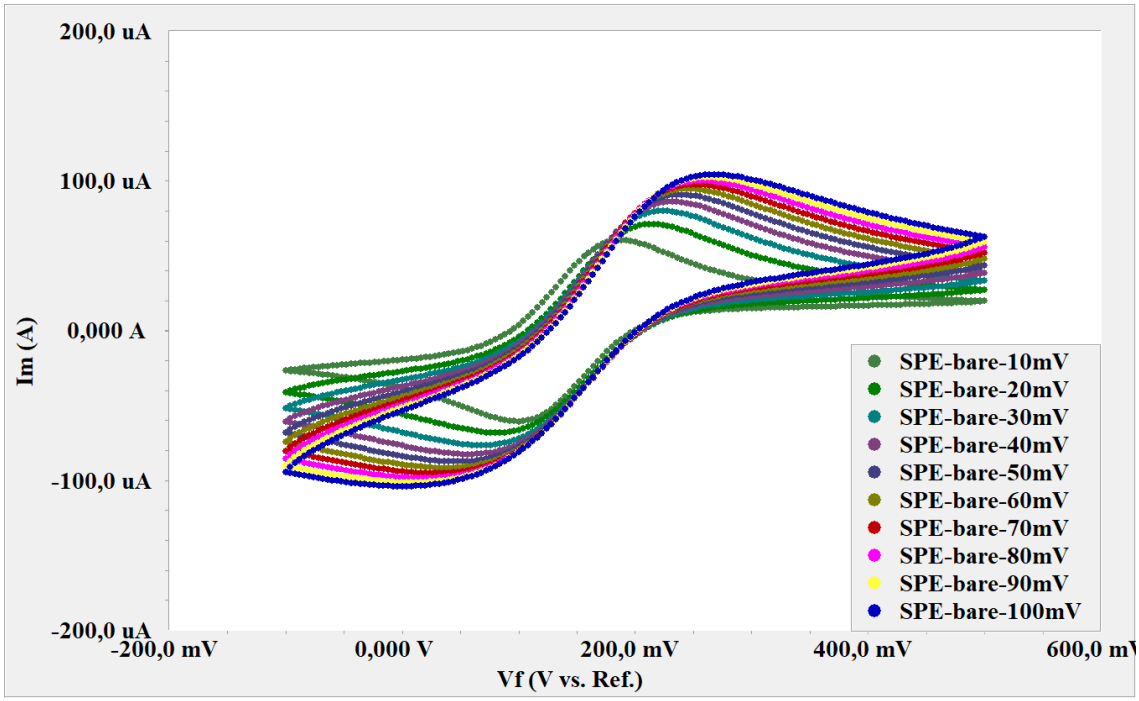


Şekil 4.14. Omentin biyosensörünün yalın halinin ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrasına ait FTIR spektrumu

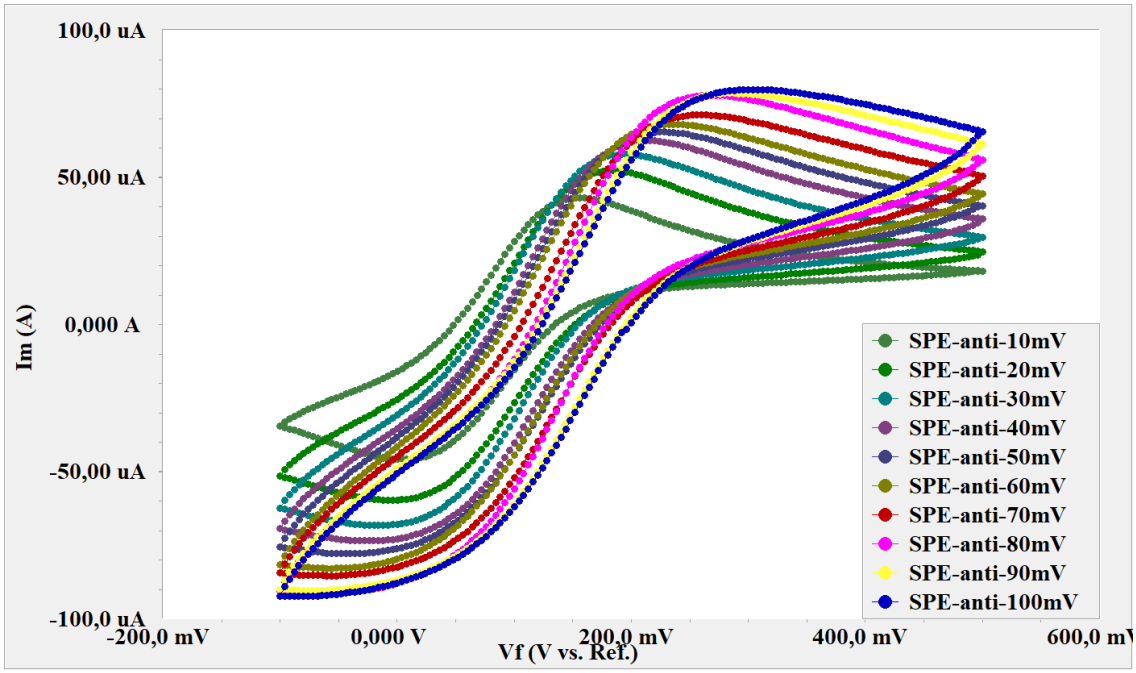
Şekil 4.14 incelendiğinde, SPE-anti spektrumu üzerinde SPE yalın hal spektrumunda bulunmayan 3301 cm^{-1} bölgesinde amid bağı gerilimine karakteristik piklerin, 1540 cm^{-1} bölgesinde amid bağı eğilmesine karakteristik piklerin, 1647 cm^{-1} amid bağı (amid II) ve 1693 cm^{-1} karbonil (amid I) bağı gerilmesine ait piklerin yer aldığı görülmektedir. Bu durum, yüzeyde amid bağı oluşumunun başarılı olarak gerçekleştiğini desteklemektedir.

4.1.2.4.4. Omentin biyosensörünün yüzey alanına ait hesaplamalar

Omentin biyosensörünün hazırlığında, çalışma elektrodunun hangi oranda Anti-Omentin ile kaplandığını belirlemek için SPE'nin yalın halinin ve Anti-Omentin immobilize edilmiş SPE'nin 10 mV-100 mV potansiyel aralığında CV ölçümleri gerçekleştirildi. CV ölçümlerinden elde edilen veriler Laviron eşitliğine (Q = n x F x A x r) uygulandı ve SPE yüzeyinin hangi oranda Anti-Omentin kaplandığı belirlendi. Omentin biyosensörünün yüzey alanı hesaplaması için 10 farklı potansiyelde alınan CV ölçümlerine ait sonuçlar Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.15. Yalın SPE'nin 10 mV-100 mV potansiyel aralığındaki CV sonuçları



Şekil 4.16. Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası SPE'nin 10 mV-100 mV potansiyel aralığındaki CV sonuçları

Uygulanan 10 farklı potansiyel sonucu elde edilen CV eğrilerinden katodik akımlar hesaplandı ve uygulanan potansiyel değerleri ile bu akım değerleri arasında bir

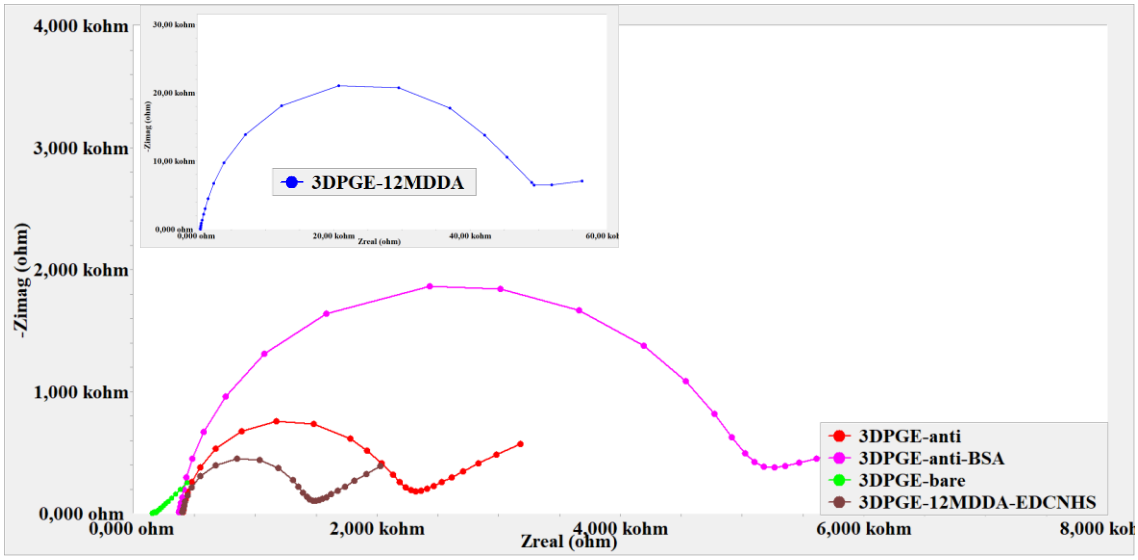
grafik çizildi. Elde edilen veriler ile grafiğin eğimi Laviron eşitliğine uygulanarak, yalın SPE yüzeyine ait alan 6.8426 x10^{-5} mol/cm^2 ve Anti-Omentin immobilizasyonu sonrasına ait yüzey alanı 6.9631 x10^{-5} mol/cm^2 olarak hesaplandı. Bu değerlere bakıldığında, Anti-Omentin immobilizasyonu sonrası yüzeye alanında bir artış gerçekleştiği görülmektedir. Bu sonuç Anti-Omentin'in SPE yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğinin göstergesidir.

4.2. Chemerin Biyosensörüne Ait Deneysel Sonuçlar

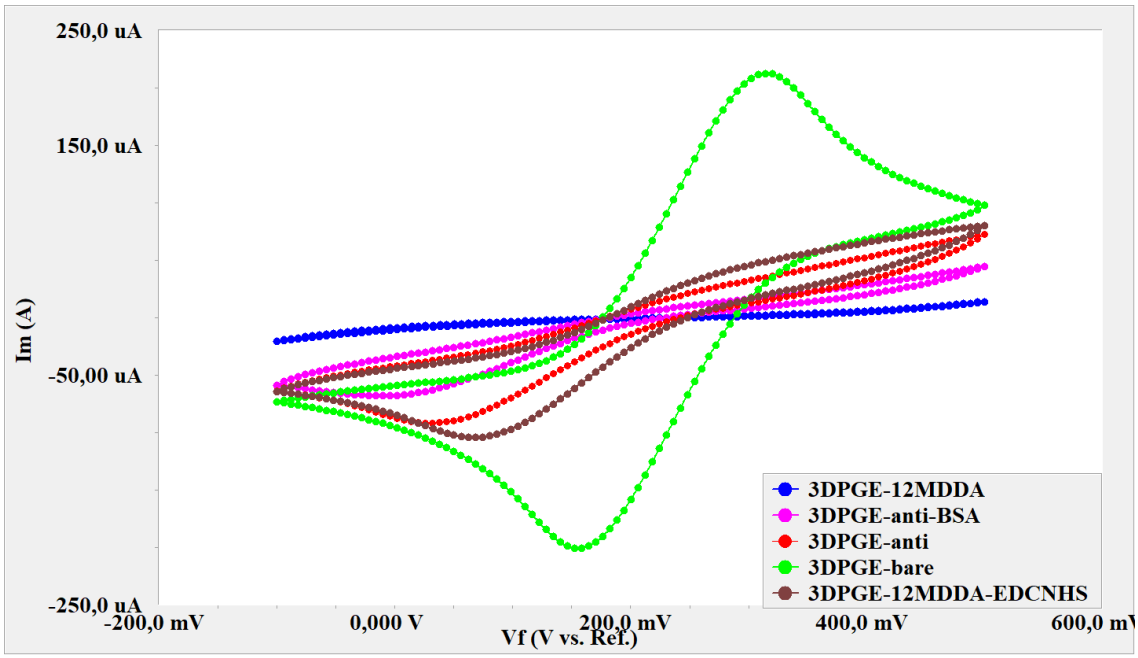
Chemerin biyosensörünün tasarımında, her bir immobilizasyon basamağı ardından basamağın başarısının teyidi için EİS ve CV ölçümleri alındı. Her bir ölçüm sonrası elde edilen EİS ve CV grafikleri sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de yer alan immobilizasyon adımlarındaki elektrotların isimlendirmeleri aşağıdaki gibidir:

- **3DPGE-bare**: 3DPGE yalın haldeki elektrot,
- **3DPGE-12MDDA**: 12-MDDA ile yüzeyde SAM oluşumu sonrasına ait elektrot,
- **3DPGE-12MDDA-EDCNHS:** SAM'lerin EDC/NHS aktivasyonu sonrasına ait elektrot,
- **3DPGE-anti**: EDC/NHS aktivasyonu ardından Anti-Chemerin immobilize edilmiş elektrot,
- **3DPGE-anti-BSA**: Anti-Chemerin immobilizasyonu ardından BSA inkübasyonu gerçekleştirilmiş elektrot,



Şekil 4.17. Chemerin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.18. Chemerin biyosensörünün immobilizasyon basamakları sonrası elde edilen döngüsel voltamogramlar

Şekil 4.17'de, Chemerin biyosensörünün EİS ölçümleri sonucu elde edilen Nyquist eğrileri verilmiştir. Bu eğriler üzerinde yer alan yarım dairelerin çapları yük transfer dirençlerini ifade etmektedir. Şekil 4.18'de verilen döngüsel voltamogramlardaki pik yükseklikleri ise elektrot yüzeyinin elektrik iletkenliği ile doğru orantılıdır.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 incelendiğinde, 3DPGE-bare elektrotun en düşük yük transfer direncine ve en yüksek iletkenliğe sahip olduğu görülmektedir. 12-MDDA inkübasyonu sonrası elektrot yüzeyinde SAM oluşumu ardından 3DPGE-12MDDA elektrotuna ait Nyquist eğrisinin yarım daire çapındaki büyük bir artışın meydana gelmesi elektrotun yük transfer direncinde büyük bir artışın olduğunun göstergesidir. Bu durumu, 3DPGE-12MDDA elektrotunun döngüsel voltamogram pikinin daralması, yani elektrot iletkenliğinin azalması desteklemektedir ve beklenen sonuçtur.

Elektrot yüzeyindeki 12-MDDA uç karboksil gruplarının EDC/NHS kullanarak aktivasyonunun, elektrot yüzeyinin iletkenliğini iyi derecede arttırması ve yük transfer direncini azaltması beklenir. Şekil 4.17 incelendiğinde, EDC/NHS aktivasyonu sonrasına ait elektrotun Nyquist eğrisinin yarım daire çapındaki büyük ölçüde azalış gerçekleşmesi bunun bir göstergesidir. EDC/NHS'ye ait döngüsel voltamogramın da genişleyerek yalın elektrota yaklaşması, bu iletkenlik artışını doğrulamaktadır.

EDC/NHS aktivasyonu sonrası Anti-Chemerin immobilizasyonunun yapılması 3DPGE-anti elektrotunun Nyquist eğrisindeki yarım daire çapını, EDC/NHS elektrotuna ait yarım daire çapına göre daha da arttırmış ve yük transfer direncinde artışa sebep olmuştur. Şekil 4.18'de yer alan 3DPGE-anti elektrotuna ait döngüsel voltamogram pikinin daralması da bunu desteklemektedir. Bu durum, antikorların SAM'ler üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini doğrulamaktadır.

Son olarak, BSA inkübasyonu gerçekleştirilmiş ve inkübasyon sonrası elde edilen Nyquist eğrisinin (3DPGE-anti-BSA) yarım daire çapında bir artış meydana geldiği gözükmektedir. Bu durum, aynı şekilde elektrot yüzeyindeki yük transfer direncinin arttığının ve döngüsel voltamogram pikinden görüldüğü üzere elektrot iletkenliğinin azaldığının göstergesidir ve beklenen bir sonuçtur.

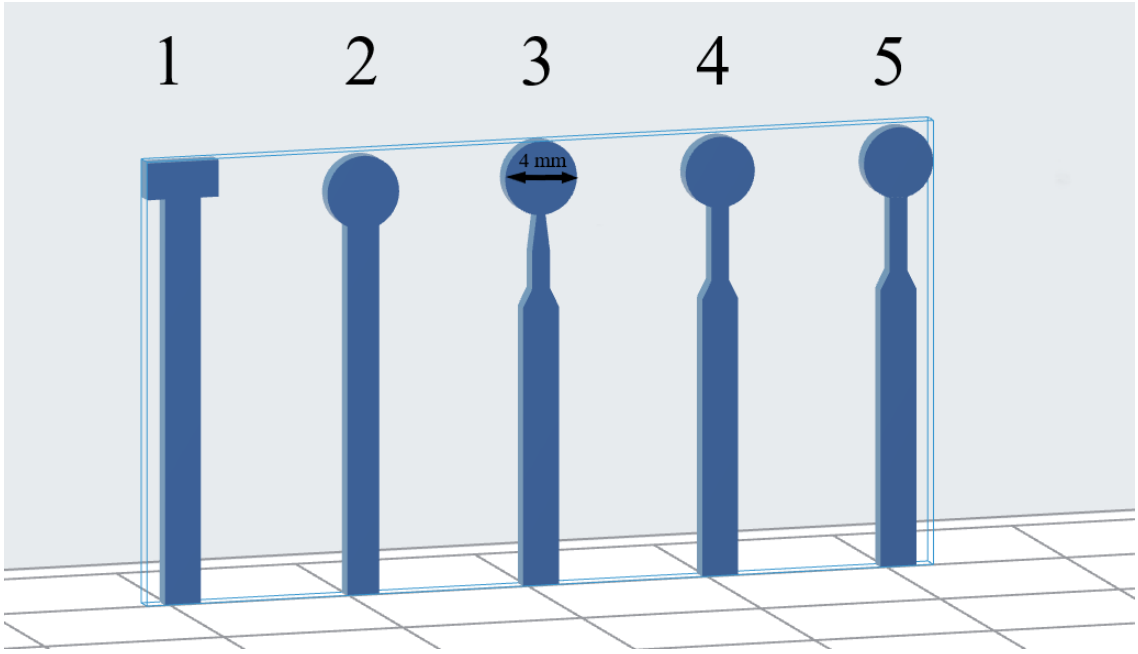
4.2.1. Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretimi

Chemerin biyosensöründe kullanılmak üzere çalışma elektrotu üretimi için Solid Works yazılımı ile bilgisayar üzerinde farklı tasarımlar yapıldı. Bunlardan en uygun olanı seçilerek üç boyutlu yazıcı ile üretildi ve üç boyutlu yazıcı üzerinde farklı basım açıları ile üretimler yapılarak bu açı değişikliklerinin çalışma elektrotu üzerindeki etkileri araştırıldı. Üretilen parçaların altın kaplama çalışmaları yapıldı ve son olarak tasarım

üzerinde bazı iyileştirici modifikasyonlar gerçekleştirilerek çalışma elektrotu son haline getirildi.

4.2.1.1. Üç boyutlu yazıcı ile uygun çalışma elektrotu tasarımının belirlenmesi

Chemerin biyosensöründe çalışma elektrotu olarak kullanılmak üzere üretilmesine karar verilen beş farklı elektrot tasarımı Solid Works yazılımı ile çizildi. Tasarımlara ait şekiller ve boyutları Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Solid Works yazılımı ile Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu tasarımları

Şekil 4.19'da sunulan, 1 numaralı tasarım Chemerin biyosensöründe çalışma elektrotu olarak kullanılması düşünülen ilk tasarımdır. Bu tasarımın, elektrokimyasal ölçümler için çalışma hücresi içerisinde kullanılmaya ve daldırma yöntemiyle ölçüm almaya şekil olarak çok müsait olmadığına karar verildi ve bu tasarımdan esinlenilerek 2 numaralı tasarım meydana getirildi. 2 numaralı tasarımın, şekil ve boyut olarak çalışma hücresi içerisinde üçlü elektrot sistemi ile çalışmaya uygun olduğu fakat inkübasyon aşamalarında damlatma yönteminin kullanılmasında sap kısmının boyun kalınlığının fazla olmasının, elektrot yüzeyine damlatılan sıvının yüzeyden uzaklaşmasına (sıvının kapiler kuvvetler nedeniyle sap kısmına doğru akıp gitmesine) sebep olduğu görüldü.

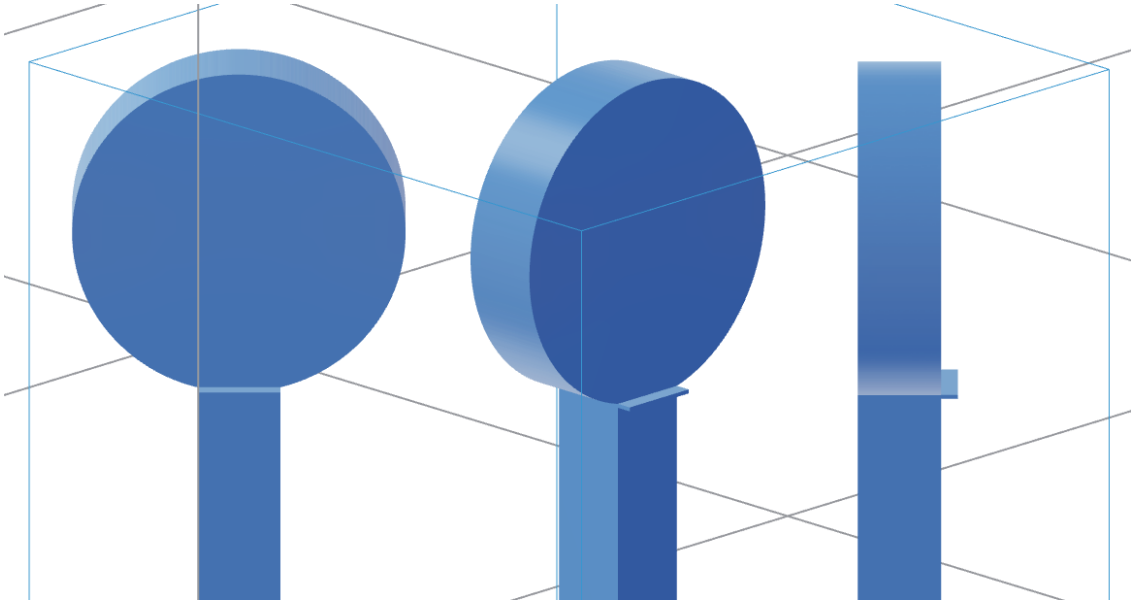
Bunun yanı sıra, bu tasarımdaki elektrotun elektrokimyasal ölçümler için çalışma hücresi içerisine alındığında redoks probu içerisine yalnızca dairesel kısmı daldırmak (boyun kısmını redoks probu üzerinde tutmak) kullanıcı tarafından çok fazla dikkat gerektirmekte ve uygulanmadığı takdirde ölçümler arası hatalara sebep olmaktadır. Bu yüzden 2 numaralı tasarımın sap kısmı inceltilerek tasarıma daha ince bir boyun bölgesi sağlandı ve 3 numaralı tasarıma geçildi. 3 numaralı tasarımda ise, tasarımın 2 numaralı tasarıma göre daha ince boyuna sahip olması elektrokimyasal ölçümler sırasında çalışma hücresi içine her ölçümde eşit daldırma imkanını kuvvetlendirdiği ve impedans ölçümlerinde karşılaşılabilecek hataları en aza indirdiği görüldü. Fakat çalışma yüzeyinin ve elektrotun boyun bölgesinin bağlandığı noktasının fazla ince olması elektrotun dayanıklılığında azalma ve tasarımın üç boyutlu yazıcı ile üretimi esnasında boyun kısmında bükülmelere sebep oldu. Bu sebeple çalışma yüzeyinin, boyun bölgesine bağlandığı yüzey biraz daha genişletilerek 4 numaralı tasarım üretildi. 4 numaralı tasarımda çalışma hücresi içerisinde ölçüm çözeltisine eşit daldırma olanağı artsa da, inkübasyon aşamalarında çalışma yüzeyine damlatılan sıvının yüzey üzerinden akıp gitmesinin ve reaksiyon hücresine daldırılan elektrotta kapiler kuvvetler nedeniyle ölçüm çözeltisinin elektrodun boyun kısmana doğru çımasının tam olarak önüne geçilemedi. Bu sebeple 4 numaralı tasarımda yer alan elektrotun en, boy, boyun bölgesi kalınlığı, çalışma yüzeyi yarıçapına ait boyutları değiştirmeden tasarım üzerinde modifikasyon yapılmasına karar verildi. Böylece 5 numaralı tasarım ortaya konuldu. 3DPGE'lerin karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak olan 5 numaralı tasarım üzerindeki modifikasyonlar Bölüm 4.2.1.2'de anlatılmıştır.

5 numaralı 3DPGE tasarımının basımında harcanan fotopolimer reçine miktarı elektrot başına 0.095 mL olup, tek bir elektrotun üretiminin ve altın kaplama uygulamasının toplam maliyeti 2022 Aralık ayı itibariyle yaklaşık 0.25$ olarak hesaplanmıştır.

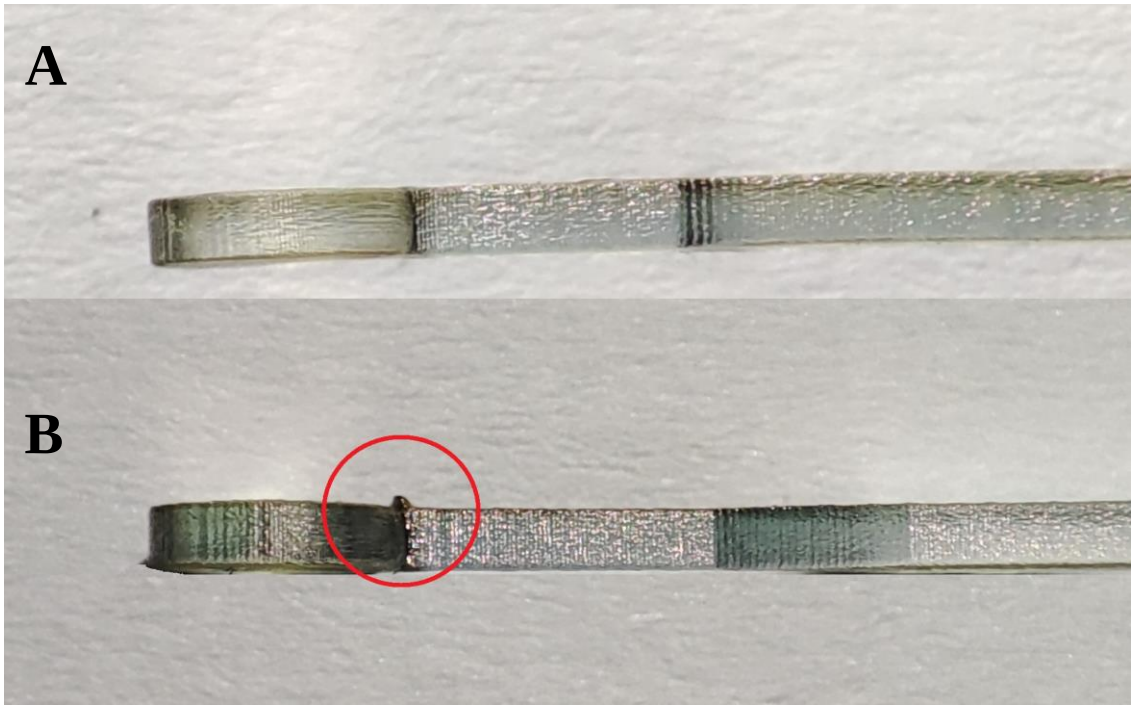
4.2.1.2. 3DPGE tasarımındaki modifikasyonlar

Chemerin biyosensörü çalışmalarında çalışma elektrotu olarak kullanılmak üzere üretilen 3DPGE'lerin, çalışma hücresine daldırılacak alan ile elektrotun boyun kısmının kesiştiği bölgeye 0.10 mm boyutunda bir eşik ilave edildi. Bu eklenen eşik, inkübasyon aşamalarında 3DPGE'lerin yüzeyine damlatılan çözeltinin, elektrotun boyun kısmına

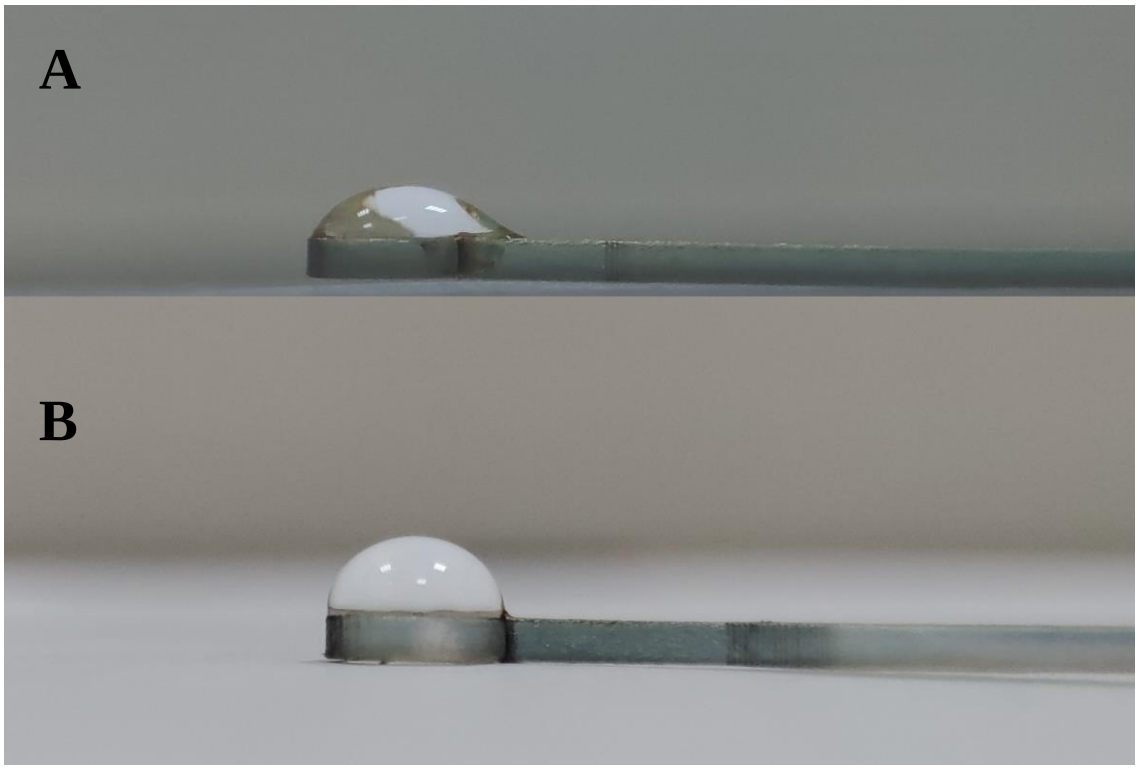
doğru ilerleyerek yüzeyden kaçmasını engellemesi ve ölçüm esnasında reaksiyon hücresine daldırılan elektrotta kapiler kuvvetler nedeniyle ölçüm çözeltisinin elektrodun boyun kısmana doğru çıkmasının tam olarak önüne geçmek amacıyla yapıldı. 3DPGE'lerin, yüzeye eklenen eşik tasarımına ait çizim Şekil 4.20'de, eşik ilavesi öncesindeki ve sonrasındaki görüntüsü Şekil 4.21'de, immobilizasyon aşamalarında kullanılan damlatma yönteminin eşik eklenmeden öncesi ve sonrasına ait görüntüsü Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.20. 3DPGE'lerin boyun bölgesine eklenen eşik tasarımına ait çizim

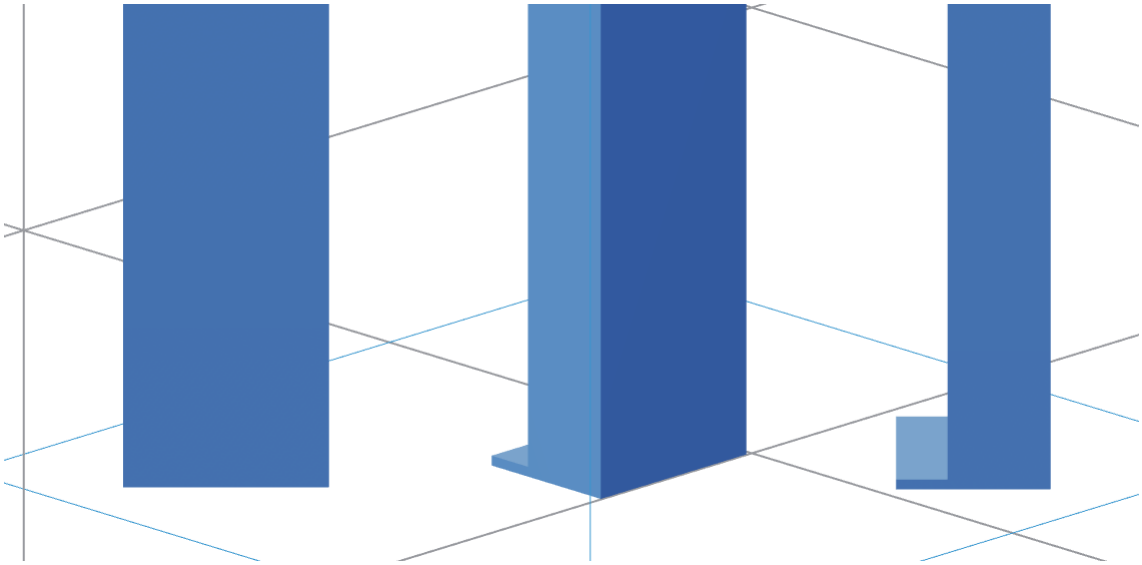


Şekil 4.21. 3DPGE'lerin çalışma yüzeylerinin iyileştirilmesi (A: Eşik ilavesi öncesi, B: Eşik ilavesi sonrası)

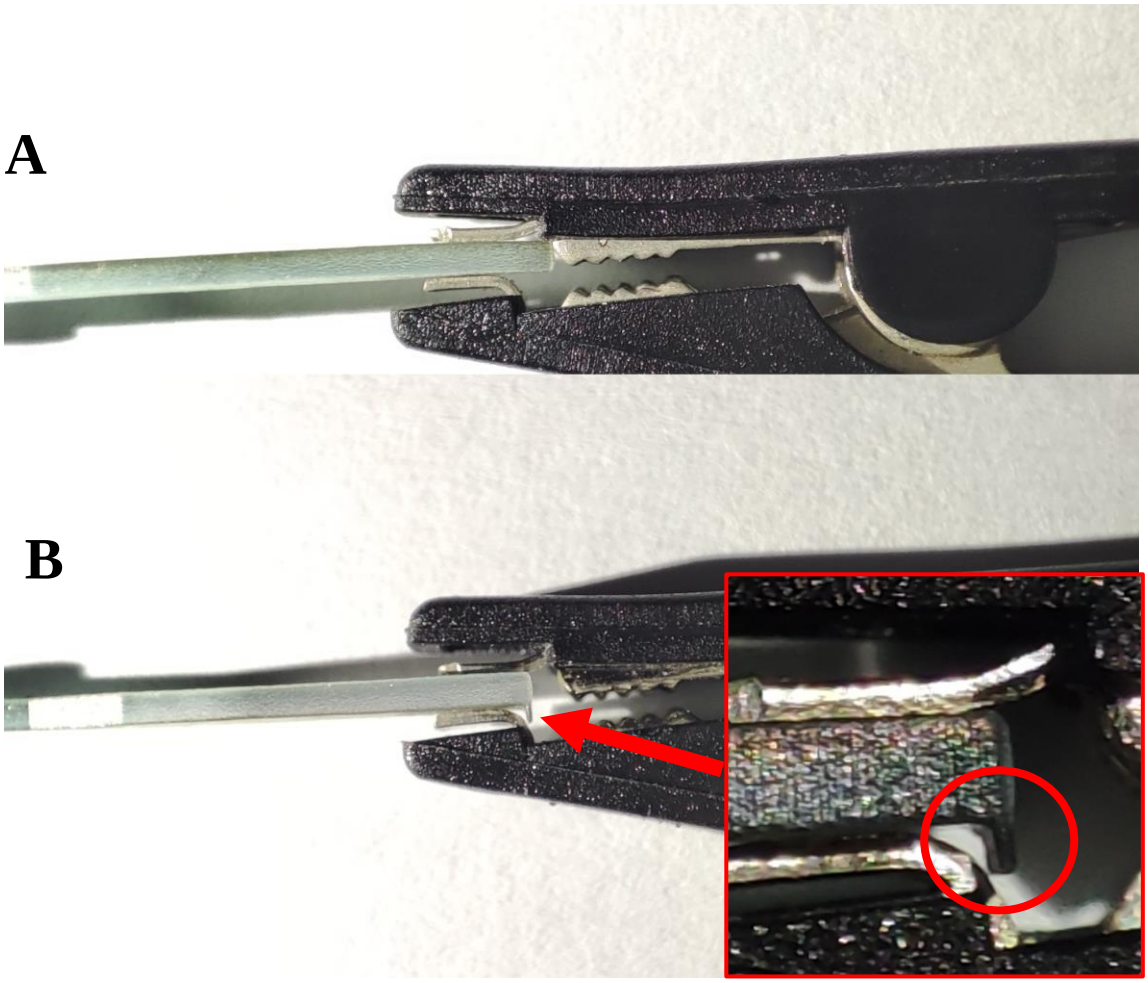


Şekil 4.22. İmmobilizasyon aşamalarında 3DPGE'lerin yüzeyine uygulanan damla yöntemi (A: Eşik ilavesi öncesi, B: Eşik ilavesi sonrası)

3DPGE tasarımını iyileştirmek amacıyla yapılan bir diğer işlem, elektrokimyasal ölçümler için krokodile bağlanacak sap kısmı üzerine 0.5 mm boyutunda eşik ilave edilmesidir. Bu ilave parça ile 3DPGE'lerin, potansiyostata ait bağlantı kablolarına her bir ölçümde aynı alan üzerinden bağlanması ve bu sayede elektrokimyasal ölçümlerde karşılaşılabilecek hataları en aza indirmesi amaçlandı. 3DPGE'lerin sap kısımları üzerine eklenen eşik tasarımına ait çizim Şekil 4.23'te, eşik ilavesinin öncesine ve sonrasına ait görüntüler Şekil 4.24'te verilmiştir.



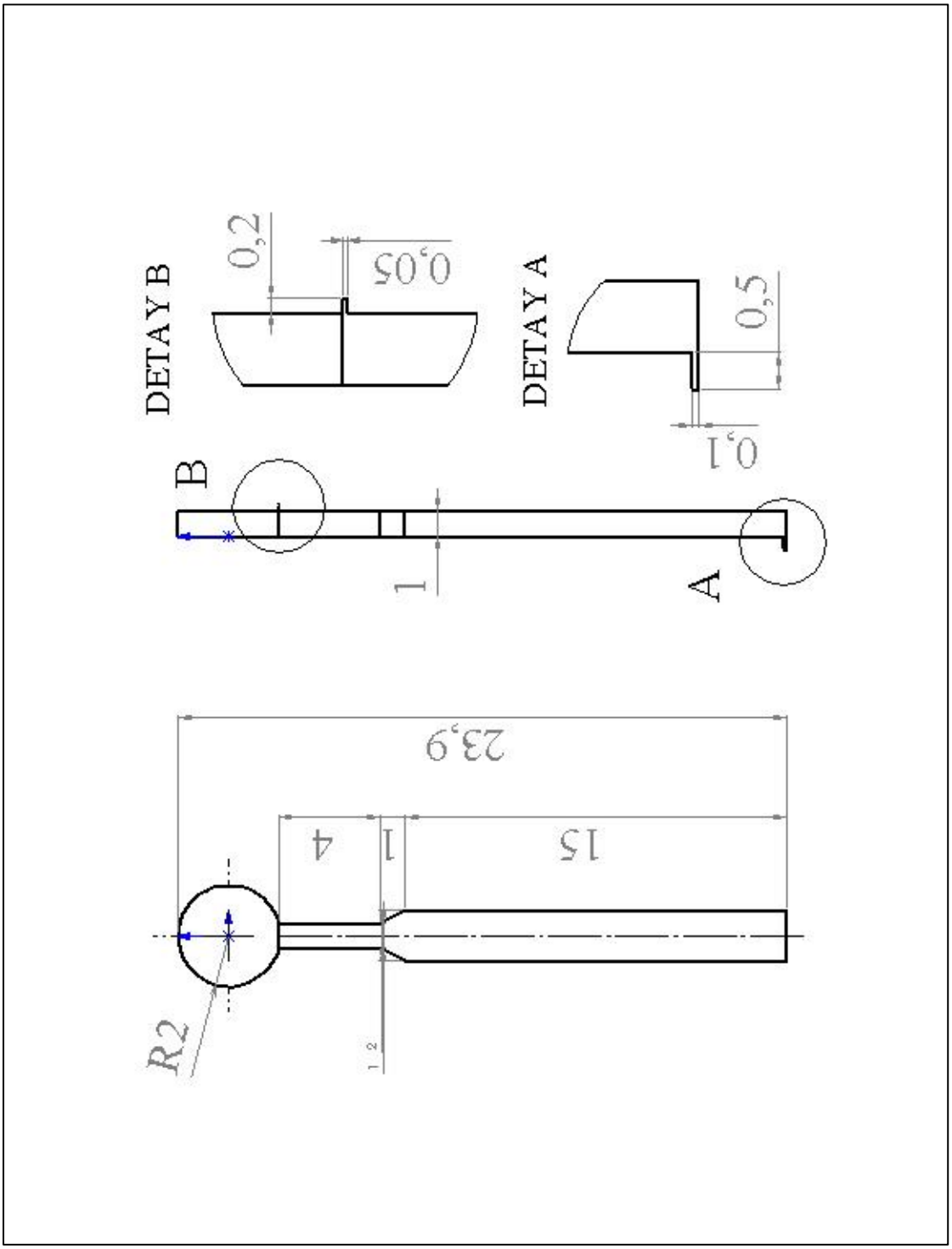
Şekil 4.23. 3DPGE'lerin potansiyostata bağlantı kısmına eklenen eşiğin çizimine ait görüntü



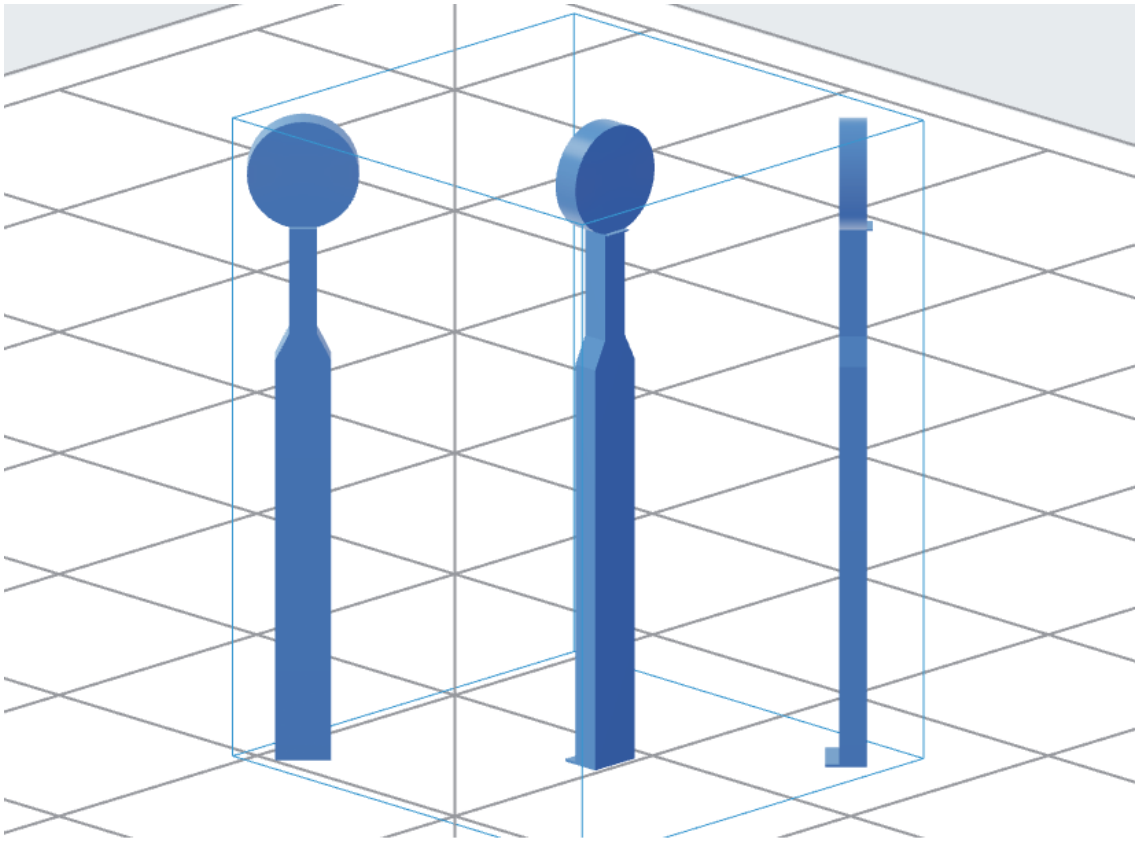
Şekil 4.24. 3DPGE'lerin potansiyostata bağlantı bölgelerinin iyileştirilmesi (A: Eşik ilavesi öncesi, B: Eşik ilavesi sonrası)

Şekil 4.23'te görülen eşiğin eklenmesi ile ölçümler sırasında potansiyostata bağlanan 3DPGE'lerin aynı bölge üzerinden bağlanma kolaylığı sağlanarak impedans ölçümlerinde karşılaşılabilecek hataların en aza indirilmesi planlandı. Şekil 4.24 (B)'de 3DPGE'yi potansiyostata bağlayan krokodile, sap bölgesine eklenen eşik sayesinde her defasında aynı bölgeden bağlanabilen 3DPGE görülmektedir.

3DPGE'lerin son haline ait teknik çizim ve üç boyutlu yazıcı üzerinde basım öncesi görüntüleri sırasıyla Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verilmiştir.



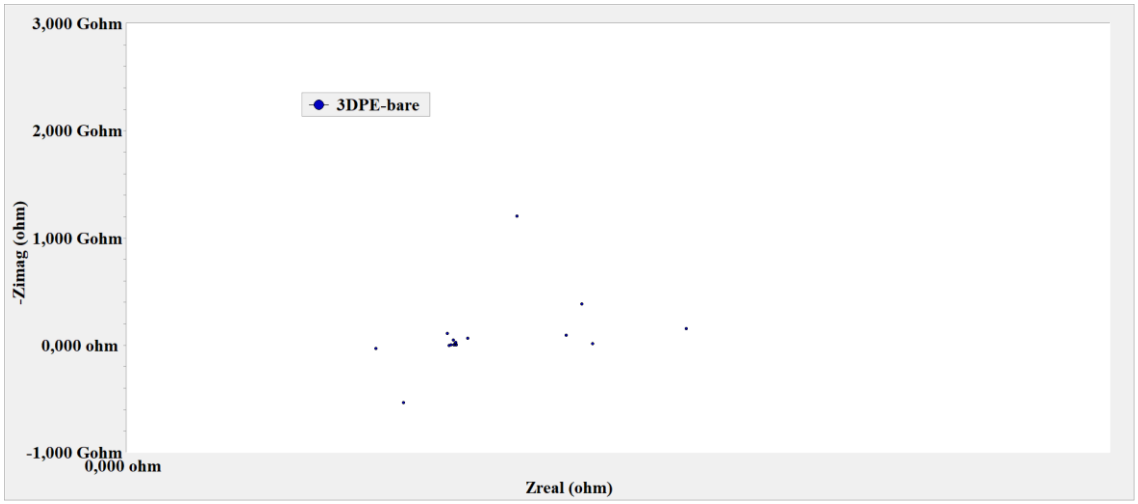
Şekil 4.25. Tüm modifikasyonlar sonrası 3DPGE'lerin teknik çizimi



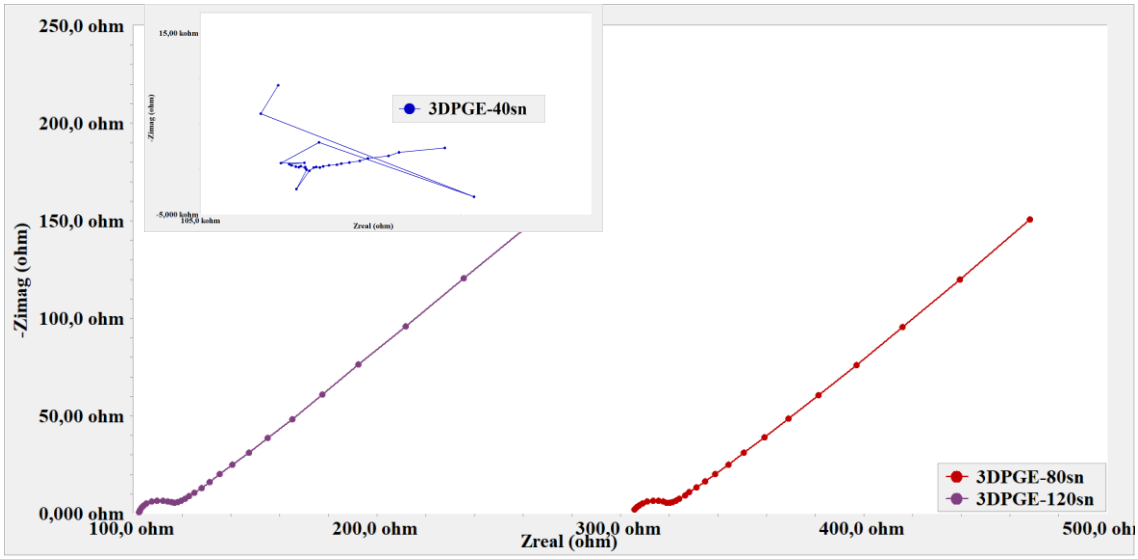
Şekil 4.26. 3DPGE'lerin üç boyutlu yazıcı üzerindeki görüntüleri

4.2.1.3. Üç boyutlu yazıcı ile oluşturulan bileşenlerin altın kaplama çalışmaları

Çalışma elektrotu olarak kullanılmasına karar verilen 3DPGE'lerin üretimi sonrası altın kaplama çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, üç boyutlu yazıcı ile basılan 3DPGE'lerin yüzeyleri Agar Sputter Coater 40, 80 ve 120 saniye olmak üzere 3 farklı süre ile altın kaplandı. Yüzeyleri altın kaplanan 3DPGE'lerin kaplama başarılarının doğrulanması amacıyla kaplama öncesi ve kaplanmalarının ardından EİS ölçümleri alındı. 3DPGE'lerin altın kaplama öncesi yüzeydeki yük transfer direncini gösteren Nyquist eğrisi Şekil 4.27'de; 40, 80 ve 120 saniye boyunca altın kaplaması yapılan 3DPGE'lerin yüzeylerindeki yük transfer dirençlerini gösteren Nyquist eğrileri Şekil 4.28'de verilmiştir. Üç boyutlu yazıcı ile basımı yapılan parçanın yüzeyinin altın kaplanması öncesi ve sonrasına ait görüntüleri Şekil 4.29'daki gibidir.

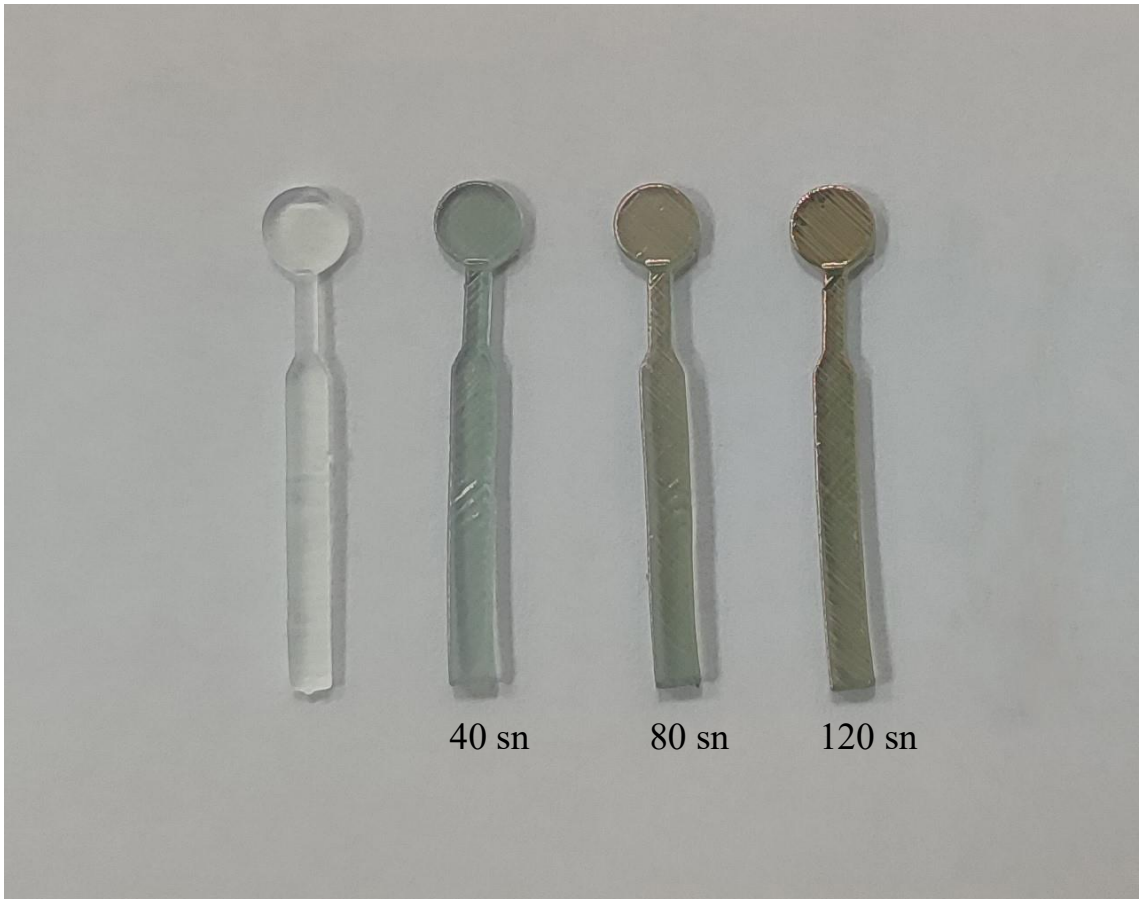


Şekil 4.27. Altın kaplama uygulaması öncesi 3DPGE yüzeyindeki yük transfer direncini gösteren Nyquist eğrisi



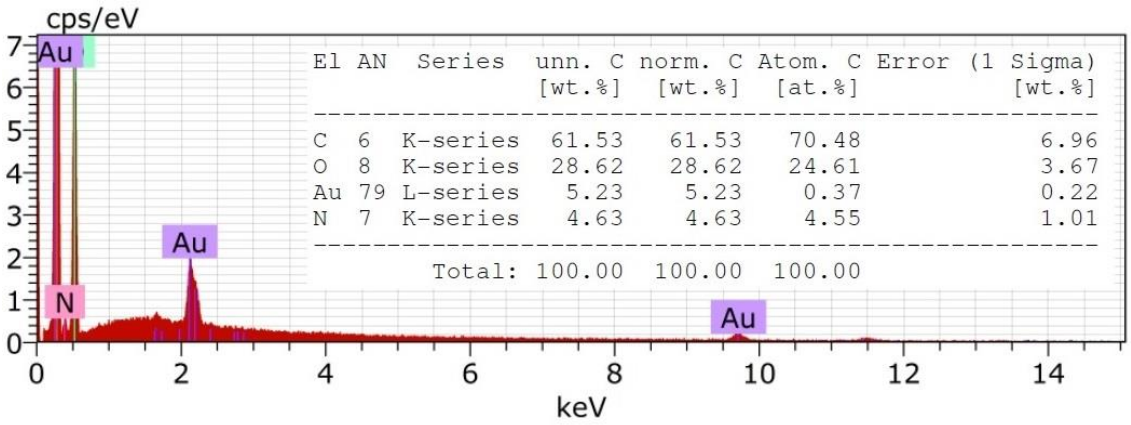
Şekil 4.28. 40, 80 ve 120 saniye boyunca altın kaplama ardından 3DPGE yüzeylerindeki yük transfer dirençlerini gösteren Nyquist eğrileri

Şekil 4.27'ye bakıldığında, altın kaplama uygulaması öncesi EİS ölçümü alınan 3DPGE yüzeyinin, ölçüm sonucu anlamlı bir Nyquist eğrisi oluşturmadığı, yüzeyin iletkenliğinin neredeyse hiç olmadığının bir göstergesidir. Şekil 4.28'de farklı altın kaplama süreleri sonrasında EİS ölçümleri alınmış 3DPGE'lerin yük transfer dirençlerinin çok ama çok az olduğu, bu sebeple iletkenliklerinin kaplama uygulaması öncesindeki hallerine göre oldukça fazla miktarda arttığı Nyquist eğrilerinden açıkça gözükmektedir.

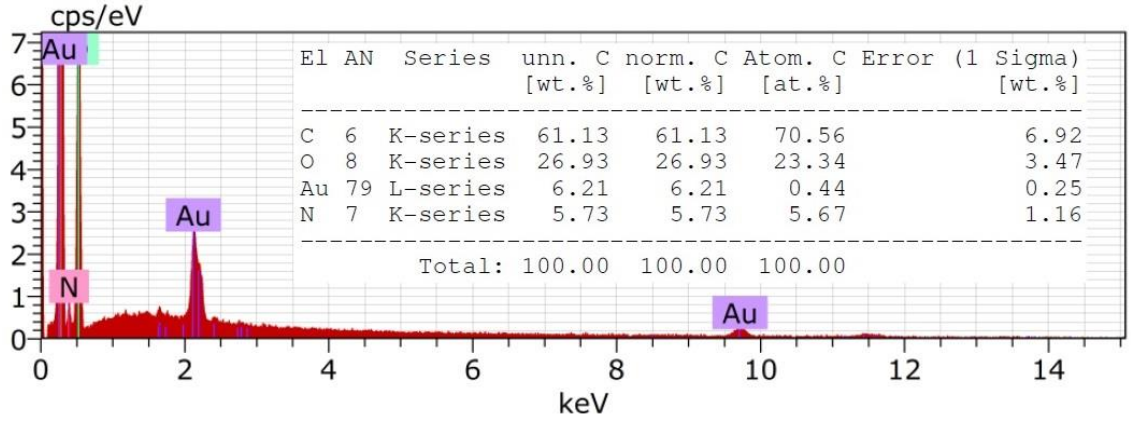


Şekil 4.29. 3DPGE'lerin altın kaplama sonrası ve öncesi görünümleri

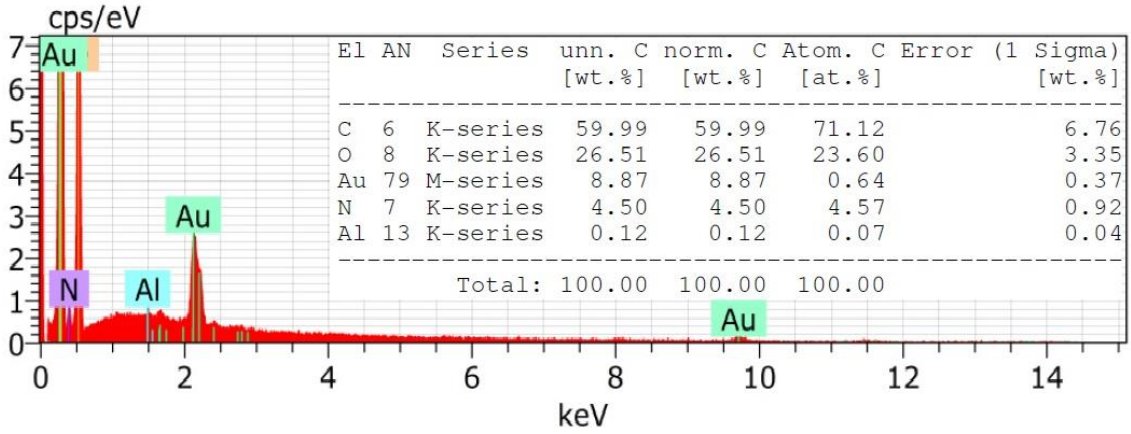
Sırasıyla 40, 80 ve 120 saniye boyunca altın kaplaması yapılan 3DGPE'lerin yüzeyleri EDS ile analiz edilerek yüzeye kaplanan altın miktarları incelendi. Elde edilen EDS spektrumları Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve Şekil 4.32'de verilmiştir.



Şekil 4.30. 40 Saniye boyunca yüzeyi altın kaplanan 3DPGE'ye ait EDS spektrumu



Şekil 4.31. 80 Saniye boyunca yüzeyi altın kaplanan 3DPGE'ye ait EDS spektrumu



Şekil 4.32. 120 Saniye boyunca yüzeyi altın kaplanan 3DPGE'ye ait EDS spektrumu

Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve Şekil 4.32‘de verilen spektrumlardan elde edilen 3DPGE yüzeylerindeki element yüzdeleri bir araya getirilerek bir tablo oluşturuldu. Bu tablo, Çizelge 4.9‘da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı altın kaplama sürelerinde 3DPGE’lerin yüzeyindeki element yüzdeleri

Kaplama süresi (saniye)	% Karbon	% Oksijen	% Altın
40	61.53	28.62	5.23
80	61.13	26.93	6.21
120	59.99	26.51	8.87

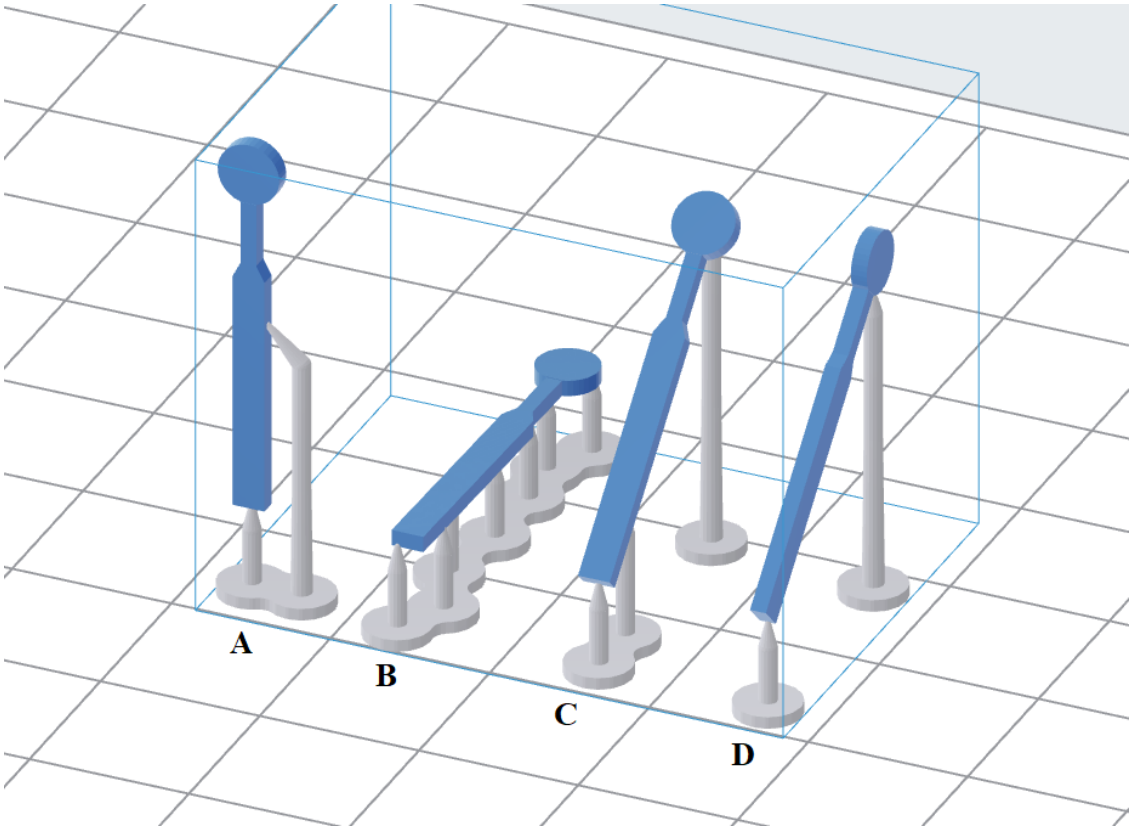
Çizelge 4.9‘a bakıldığında, kaplama süresinin 40 saniyeden 120 saniyeye çıkarılmasının, 3DPGE’ler yüzeyine kaplanan altın miktarını 1.7 kat arttırdığı görülmüştür.

Elde edilen EDS spektrumu sonuçları ve Nyquist eğrileri incelendiğinde elektrodun altın kaplama süresinin artmasıyla elektrot yüzeyinde altın miktarının arttığı fakat iletkenliğinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Fakat biyosensör tasarımında SAM oluşturulabilmesi için elektrot yüzeyinin yeterli oranda altın içermesi gerekmektedir. Bu nedenle 3DPGE’lerin üretim ve altın kaplama maliyetleri de göz önüne alınarak, üç boyutlu yazıcı ile basım sonrası 120 saniye altın kaplama yapılmasının elektrotun üretimine ve Chemerin biyosensörü çalışmalarında çalışma elektrotu olarak kullanılabilmesine yeterli olduğuna karar verildi.

4.2.1.4. 3DPGE’lerin üç boyutlu yazıcı üzerinde farklı açılarda basılması

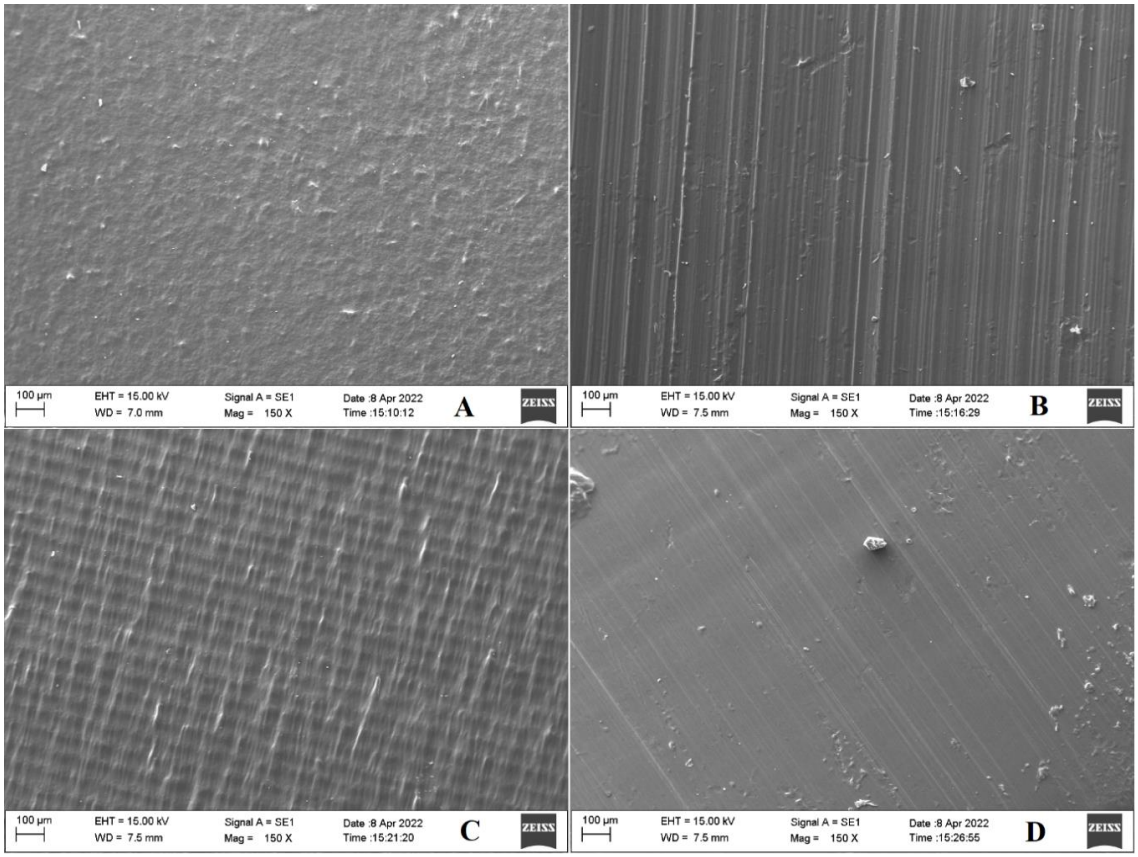
Chemerin biyosensörün çalışmasında çalışma elektrotu olarak kullanılmak amacıyla üretilen parçalar üç boyutlu yazıcı içerisinde yer alan istasyon üzerinde farklı baskı açıları kullanılarak basıldı ve bu sayede yüzeyde meydana gelebilecek farklı desen ve değişiklikler gözlemlendi.

Bu amaçla basımı yapılan parçalar sırasıyla, istasyon yüzeyi ile 90º, istasyon yüzeyine 180º, istasyon yüzeyi ile 45º, istasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90º, X ekseni ile 45º olmak üzere 4 farklı açı değeri kullanılarak üretildi. Basımı yapılacak parçaların üç boyutlu yazıcının yazılımı üzerindeki konumlarına ait görüntü Şekil 4.33'te verilmiştir.



Şekil 4.33. A: İstasyon yüzeyi ile 90º açıya sahip, B: İstasyon yüzeyine paralel, C: İstasyon yüzeyi ile 45º açıya sahip, D: İstasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90º, X ekseni ile 45º açıya sahip 3DPGE'ler

Farklı basım açıları ile üretilen parçalar üretim sonrası bir önceki adımda yeterli olduğu kabul edilen 120 saniye süre ile altın kaplandı ve basım açılarındaki değişim ile altın kaplama uygulamasının 3DPGE'lerin yüzeylerinde neden olduğu değişiklikler gözlemlendi. Bu amaçla, farklı açılar ile basılıp yüzeyleri altın kaplanmış 3DPGE'lerin SEM görüntüleri ve EDS analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.34'te, EDS spektrumlarından elde edilen sonuçlar ile oluşturulan tablo ise Çizelge 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.34. A: İstasyon yüzeyi ile 90º açıya sahip, B: İstasyon yüzeyine paralel, C: İstasyon yüzeyi ile 45º açıya sahip, D: İstasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90º, X ekseni ile 45º açıya sahip 3DPGE'ler.

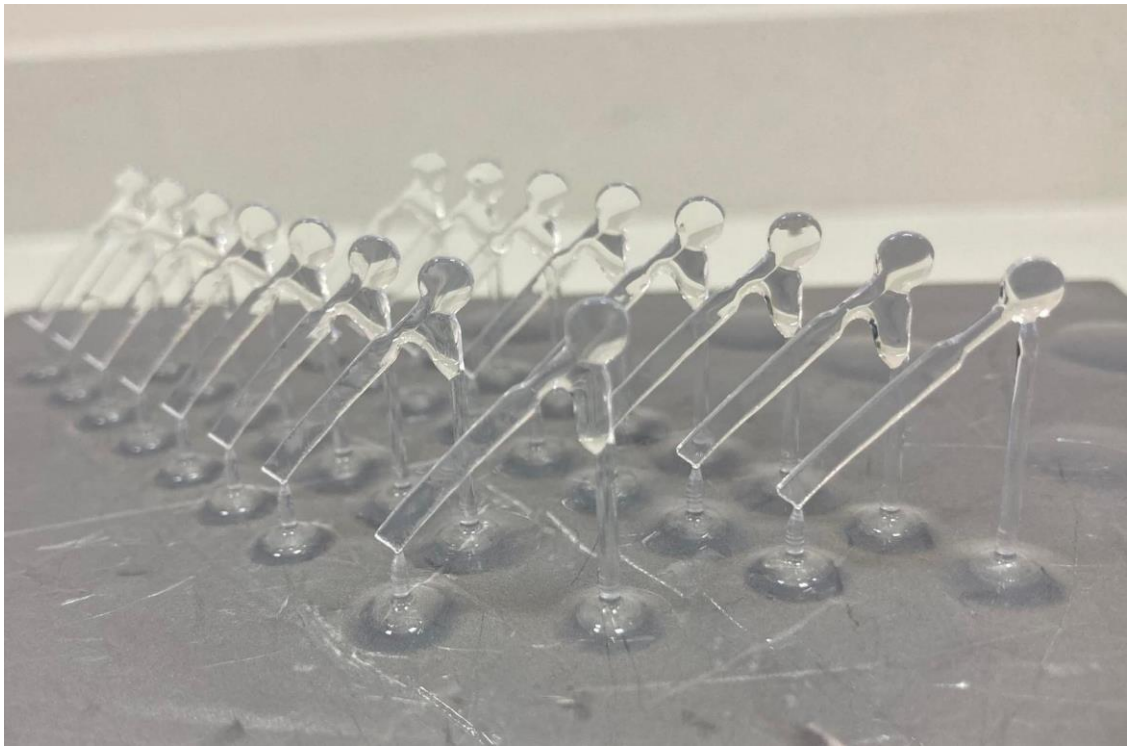
Şekil 4.34'te elde edilen SEM görüntülerine bakıldığında, istasyon yüzeyi ile 45º (C) ve 90º açıya sahip (A) 3DPGE'lerin yüzeylerinin diğer elektrotlara oranla daha çok girinti çıkıntı içerdiği, istasyon yüzeyine paralel olarak üretilen (B) 3DPGE yüzeyinin düz fakat birbirine paralel çok sık desen içerdiği ve son olarak istasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90º, X ekseni ile 45º açı yaparak üretilen (D) 3DPGE'nin en düz yüzeye sahip olduğu açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.10. Farklı basım açılarıyla üretilen 3DPGE'lerin altın kaplama uygulaması sonrası yüzeylerindeki altın yüzdeleri

3DPGE	Altın kaplama süresi	% Altın
A	120 saniye	8.13
B	120 saniye	6.59
C	120 saniye	6.29
D	**120 saniye**	**8.87**

Çizelge 4.10'daki sonuçlara bakıldığında, altın kaplama uygulaması sonucu yüzeye kaplanan altın miktarının, 3DPGE'lerin basım açılarına bağlı olarak değişim gösterdiği görüldü. Çizelge 4.9'daki sonuçlar ile Şekil 4.34'teki SEM görüntülerinden elde edilen yorumlar bir araya getirildiğinde; D tasarımının yüzeyindeki altın kaplama yüzdesinin yeterli düzeyde olduğu ve yüzeyin SAM oluşumu için yeterli düzlükte olup kullanılacak ara kol bileşiğine ait moleküllerin yüzeye bağlanmasında engelleyici öğeler bulundurmadığı görüldü ve bundan sonra gerçekleştirilecek olan bütün çalışmalarda istasyon yüzeyinin Y ekseni ile 90^{o}, X ekseni ile 45^{o} açı yaparak üretilen (D) 3DPGE'lerin kullanılmasına karar verildi.

Optimum olarak belirlenen bu açı değeri ile basılan parçaların yazıcı istasyonu üzerindeki görüntüleri Şekil 4.35'te verilmiştir.



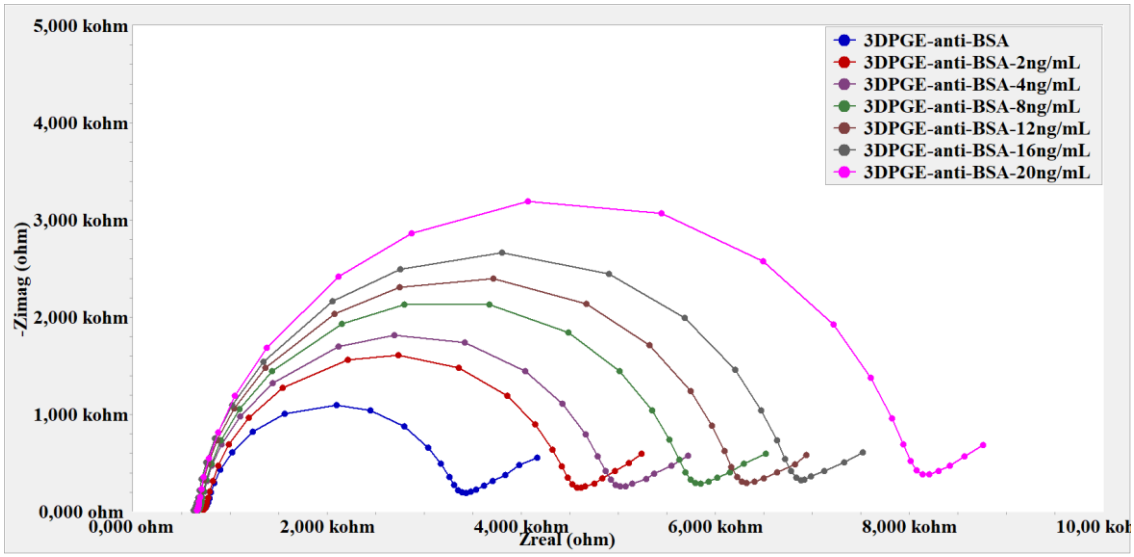
Şekil 4.35. Y ekseni ile 90^{o} X, ekseni ile 45^{o} açı yaparak üretilen 3DPGE'ler

4.2.2. Chemerin biyosensörünün analitik karakterizasyon çalışmaları

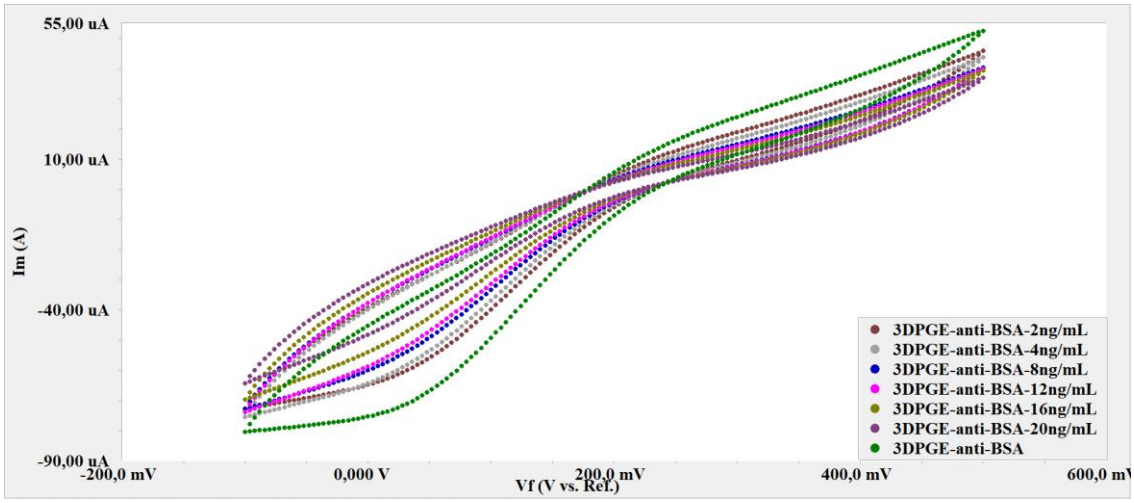
Chemerin biyosensörü için çalışma elektrotu üretiminin tamamlanması ardından, meydana getirilen 3DPGE'ler ile Chemerin biyosensörüne ait karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Çizelge 3.7'de verilen yöntem ile hazırlanan elektrotlar ile tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, insan serumunda analiz, SFI analizi ve yüzey karakterizasyon çalışmalarına ait deney bulguları aşağıdaki gibidir.

4.2.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı

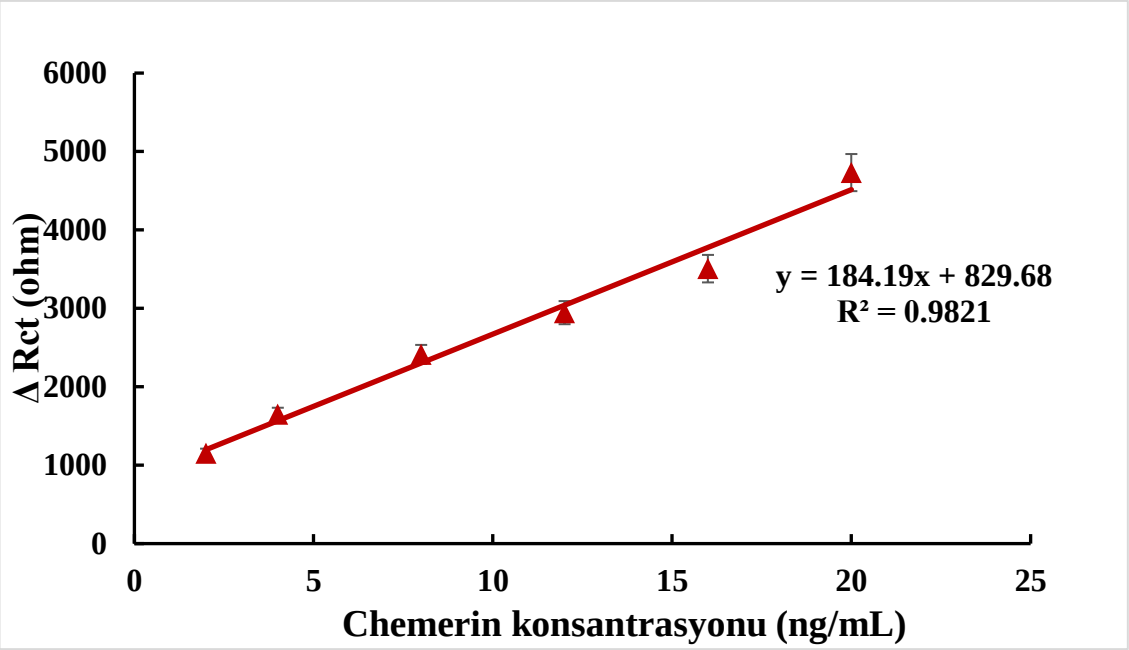
Çizelge 3.7'ye göre hazırlanan Chemerin biyosensörleri ile artan Chemerin konsantrasyonlarında (2-20 ng/mL) CV ve EİS ölçümleri alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.36'da, CV ölçümlerinden elde edilen döngüsel voltamogramlar Şekil 4.37'de ve Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleri ile oluşturulan standart grafik Şekil 4.38'de verilmiştir.



Şekil 4.36. Chemerin biyosensörünün 2-20 ng/mL konsantrasyon aralığındaki EİS ölçümlerine ait Nyquist eğrileri



Şekil 4.37. Chemerin biyosensörünün 2-20 ng/mL konsantrasyon aralığındaki EİS ölçümlerine ait döngüsel voltamogramlar



Şekil 4.38. Chemerin biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ait standart grafik

Şekil 4.36 incelendiğinde, Nyquist eğrilerindeki yarım daire çaplarındaki artış, 3DPGE'lerin yüzeyine immobilize edilen Anti-Chemerin ile Chemerin proteini etkileşimindeki artış ile doğru orantılıdır. Rct değerlerindeki bu artış, yüzeyde oluşan antikor/antijen kompleksinin elektrot yüzeyindeki iletkenliği azaltmasından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.37'de, Anti-Chemerin ile etkileşim gösteren Chemerin proteini miktarındaki artış, döngüsel voltamogramların tepe akımlarında giderek azalışa sebep olmaktadır. Biyosensöre ait standart grafik (Şekil 4.38) incelendiğinde, Chemerin konsantrasyonundaki artışın, biyosensör cevabını doğrusal olarak arttırdığı iyi R^2 değerinden anlaşılmaktadır.

Tasarlanan biyosensörün Chemerin tayinine yönelik LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.0068 ve 0.0227 ng/mL olarak hesaplandı.

4.2.2.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Chemerin biyosensörünün belirli sabit konsantrasyonlarda tekrarlanabilirliğini incelemek adına 4, 8, 12 ve 16 ng/mL Chemerin proteini konsansantrasyonları seçildi ve hazırlanan biyosensörler ile bu konsantrasyonlarda 4'er tekrar ölçüm alındı. Alınan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden biyosensörün bu seçilen

konsantrasyonlarda ölçtüğü Chemerin miktarlarının ortalaması alınarak standart sapmaları ve geri kazanımları hesaplanmış ve Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Chemerin biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçlarına ait tablo

Eklenen Chemerin miktarı (ng/mL)	***Biyosensör ile ölçülen Chemerin miktarı (ng/mL)**	**Standart Sapma**	**Geri Kazanım**
4	4.226	0.1755	105.65
8	8.040	0.4197	100.50
12	11.699	0.6570	97.49
16	16.385	0.5247	102.41

***4 ölçümün ortalama değeri verilmiştir.

Çizelge 4.11. Chemerin biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçlarına ait tablo incelendiğinde, Chemerin biyosensörünün 4, 8, 12 ve 16 ng/mL Chemerin konsantrasyonunda yapılmış ölçümlerde Chemerin'i sırasıyla, 4.2, 8, 11.6 ve 16.3 ng/mL olarak tespit ettiği görülmektedir. Biyosensörün iyi tekrarlanabilirliğe sahip olduğu, düşük standart sapma ve yüksek geri kazanım değerlerinden anlaşılmaktadır.

Chemerin biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini incelemek için optimum parametreler kullanılarak hazırlanan 8 farklı biyosensör ile doğrusal tayin aralığında EİS ölçümleri alındı ve tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği test edildi. EİS ölçümleri alınan biyosensörlerin Nyquist eğrileri üzerinden ΔRct değerleri hesaplandı ve bu değerler ile Chemerin konsantrasyonları arasında standart grafikler çizildi. Her bir biyosensör için çizilen standart grafiğin eğilim çizgisine ait denklemler ve R^2 değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Chemerin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait denklemler

Biyosensör	Standart grafikteki doğru denklemi	R^2
1	y = 286.3x + 1433.9	0.9832
2	y = 230.12x + 873.73	0.9681
3	y = 184.19x + 829.68	0.9821
4	y = 126.71x + 1066.3	0.9584
5	y = 329.88x + 523.91	0.9449
6	y = 249.86x + 134.08	0.9633
7	y = 142.37x + 270.82	0.9639
8	y = 120.24x + 671.54	0.9706

Çizelge 4.12‘ye bakıldığında 8 farklı biyosensör ile yapılan tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait sonuçların iyi olduğu, biyosensörlere ait standart grafiklerin doğru denklemlerinin birbirlerine benzerliğinden ve iyi R^2 değerlerinden görülmektedir.

4.2.2.3. Chemerin biyosensörünün insan serumu analizi

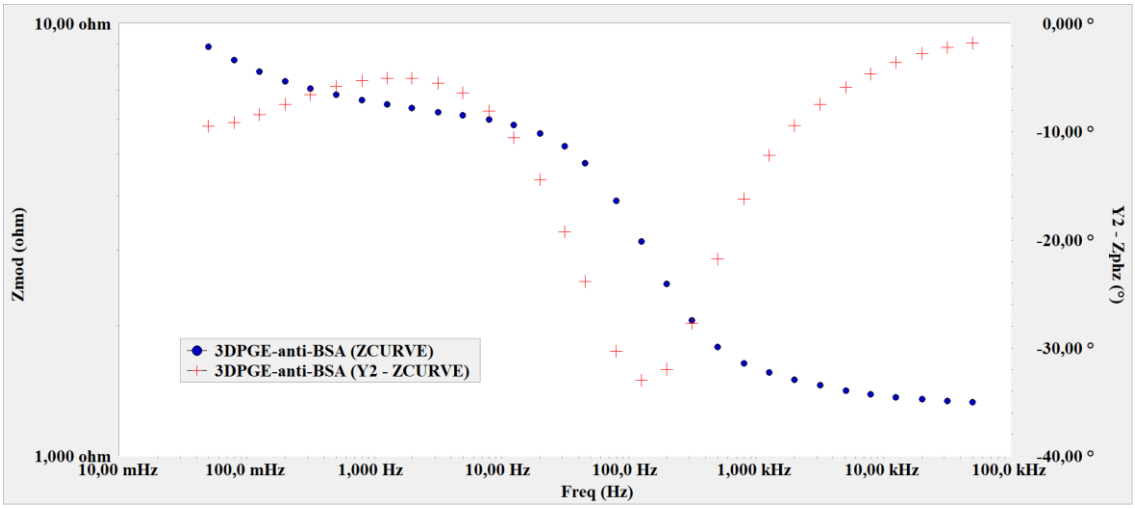
Chemerin biyosensörünün ticari olarak satılan insan serumunda Chemerin proteinini tespit edebilirliğini belirlemek için Çizelge 3.7‘ye göre hazırlanan biyosensör ile 4, 8, 12 ve 16 ng/mL Chemerin konsantrasyonunda EİS ölçümleri alındı ve biyosensörün insan serumu içerisinde Chemerin proteinini tespit edebilirliği test edildi. EİS ölçümleri sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri üzerinden ΔRct değerleri hesaplanarak biyosensöre ait geri kazanım değerleri hesaplandı. Chemerin biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ait sonuçlar Çizelge 4.13‘te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Chemerin biyosensörünün insan serumu uygulaması

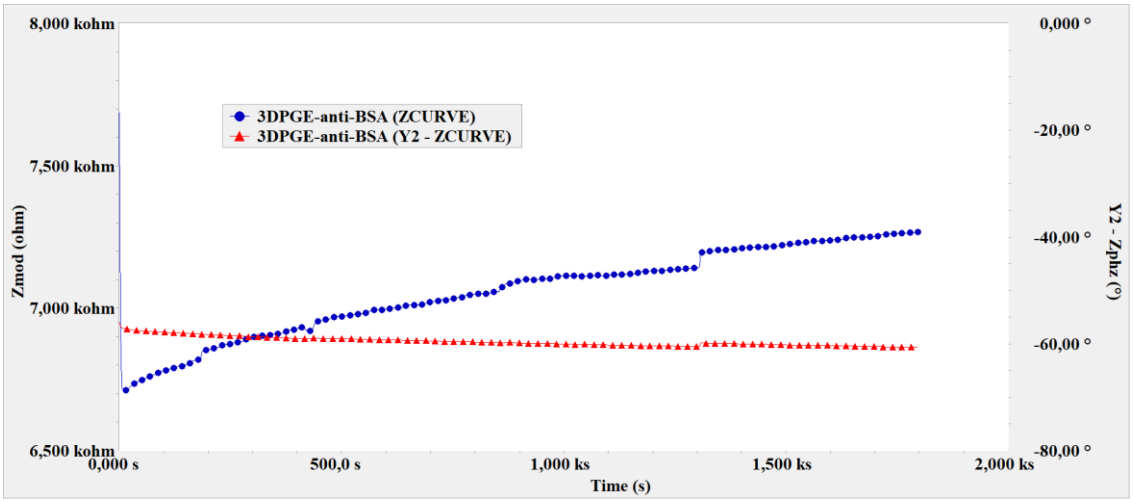
İnsan serumunda Chemerin miktarı (ng/mL)	Biyosensör ile ölçülen Chemerin miktarı (ng/mL)	Geri Kazanım (%)
4	3.96	98.9
8	7.65	95.7
12	12.86	107.2
16	15.50	96.9

4.2.2.4. Tek nokta frekansta impedans analizi

Chemerin biyosensörünün Chemerin proteinini spesifik bağlamasını eş zamanlı tespit etmek ve göstermek için Çizelge 3.2'de verilen yöntem ile hazırlanan biyosensörün BSA inkübasyonu sonrası impedans ölçümü alındı ve elde edilen Bode grafiğindeki (Şekil 4.39) verilerden faydalanılarak 33 Hz frekansta impedans ölçümü yapıldı. Ölçüm süresi olarak, biyosensör hazırlığında kullanılan Chemerin proteininin inkübasyon süresi olan 30 dakika (1800 saniye) süre kullanıldı. Elde edilen grafik Şekil 4.40'ta verilmiştir.



Şekil 4.39. Chemerin biyosensörünün tek noktada frekansta impedans ölçümü öncesi alınan impedans ölçümüne ait Bode Grafiği



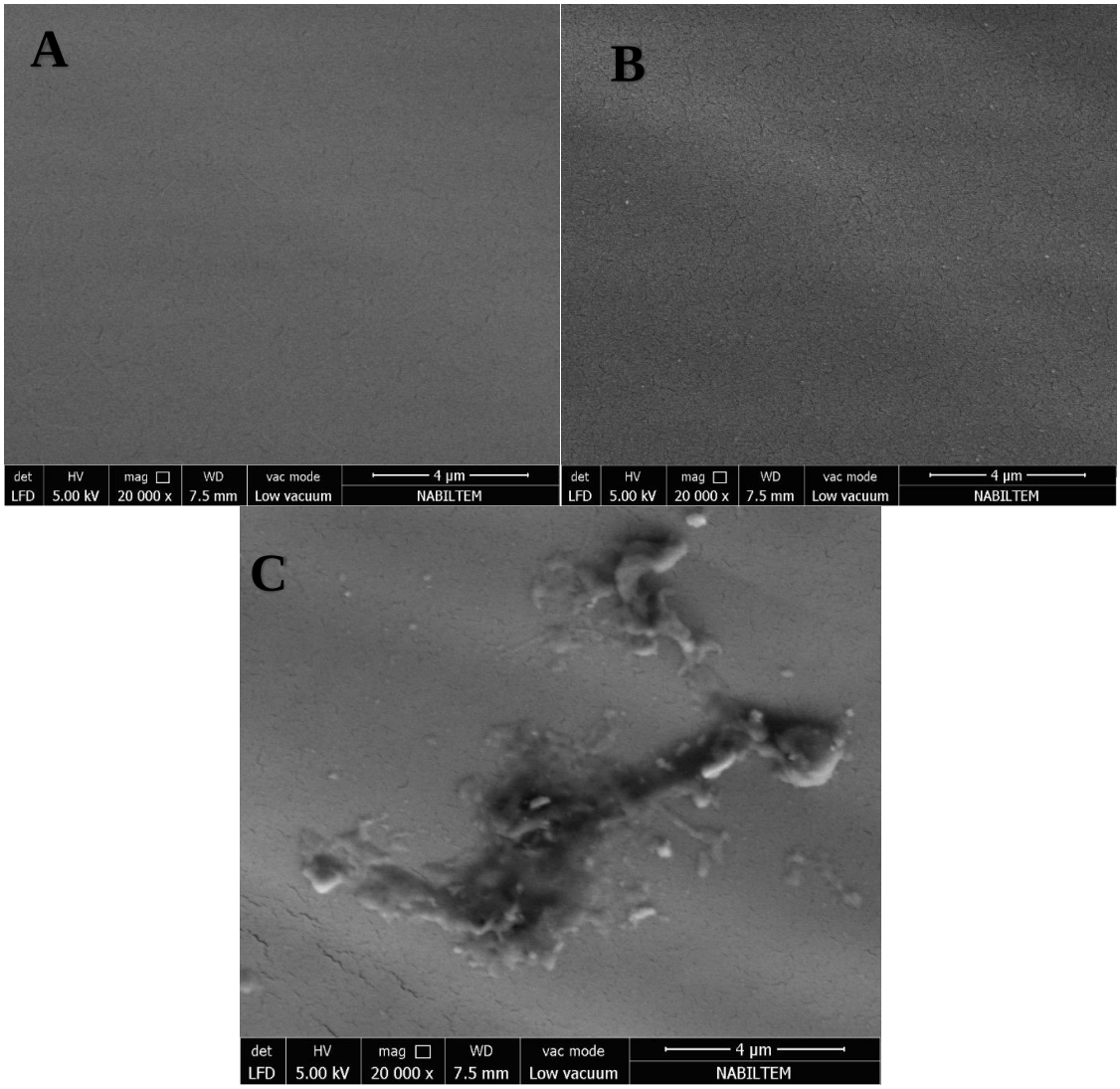
Şekil 4.40. Chemerin biyosensörünün tek nokta frekansta impedans analizine ait grafik

Tek nokta impedans spektrumları eş zamanlı olarak antikor-antijen bağlanmasını izlemeye olanak sağlaması açısından önemlidir. Şekil 4.40'ta verilen grafik incelendiğinde Anti-Chemerin / Chemerin etkileşiminin, zamana bağlı olarak impedans eğrisinde bir artışa sebep olduğu görülmektedir. İmpedanstaki bu artışın, ölçümün başlangıçtan 850. saniyesine kadar daha hızlı bir şekilde gerçekleştiği, ölçümün geri kalanında ise artış hızının azaldığı görülmüştür. Bunun sebebi 3DPGE'lerin yüzeyinde bulunan Anti-Chemerin'in Chemerin proteini bakımından zamanla doygunluğa ulaşması ve bu sebeple bu noktadan sonra daha az miktarda Chemerin proteini moleküllerini bağlamasıyla açıklanabilir. Mavi eğri impedansın, kırmızı eğri ise faz açısının zamana bağlı olarak değişimini göstermektedir.

4.2.2.5. Chemerin biyosensörünün yüzey karakterizasyonu

4.2.2.5.1. Taramalı elektron mikroskobu

Chemerin biyosensörünün hazırlığında, immobilizasyon aşamalarının 3DPGE'lerin yüzeyinde meydana getirdiği değişiklikleri gözlemlemek için SEM görüntüleme analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.41 (A) SAM oluşumu öncesi yalın haldeki 3DPGE yüzeyini göstermektedir. Şekil 4.41 (B)'deki görüntü ise 12-MDDA kullanımı ile 3DPGE'lerin yüzeyinde SAM oluşumu sonrasına aittir. Anti-Chemerin immobilizasyonu sonrası 3DPGE yüzeyine ait görüntü ise Şekil 4.41 (C)'deki gibidir.

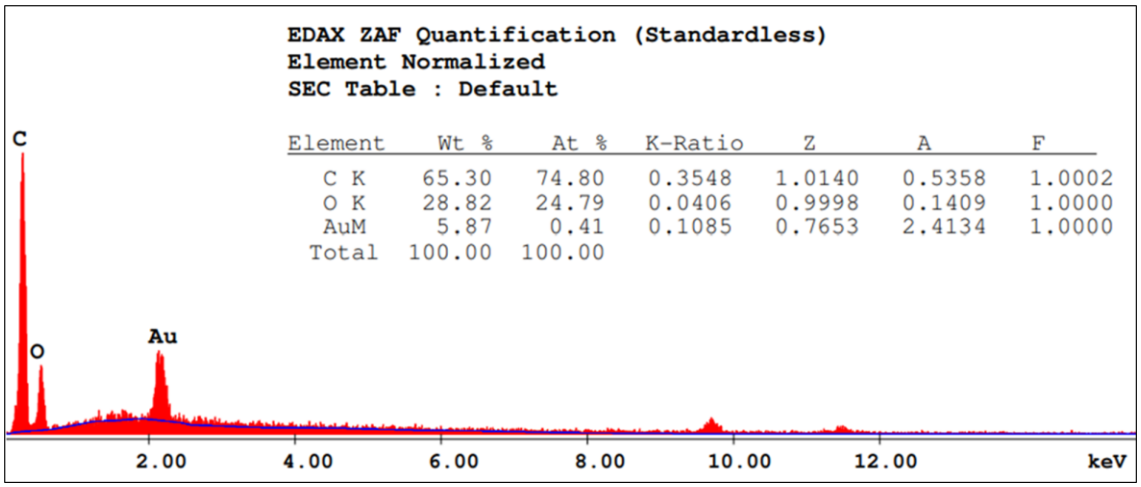


Şekil 4.41. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının SEM görüntüleri (A: 3DPGE yalın hali, B: 3DPGE-12MDDA, C: 3DPGE-12MDDA-Anti-Chemerin)

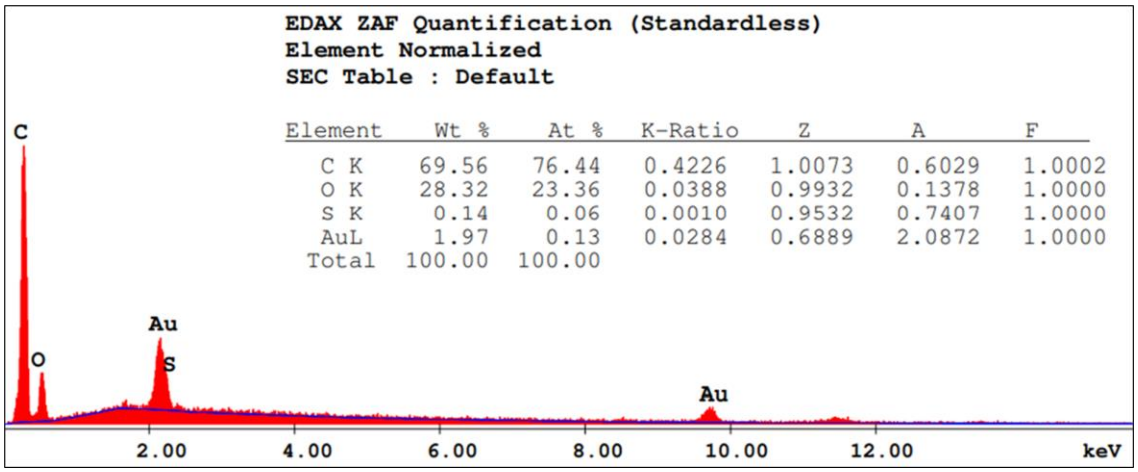
Yalın elektrot (A) ve SAM oluşumu sonrası (B) görüntüler incelendiğinde SAM oluşumu sonrası elektrot yüzeyinde yalın hale göre daha pürüzlü bir yüzey gözlenmektedir. Anti-Chemerin immobizilizasyonu sonrası çalışma elektrodu yüzeyi (C), SAM oluşumu sonrası elde edilen görüntü (B) ile kıyaslandığında ise elekrot yüzeyinin bulutumsu bir görünüm kazandığı gözlenmektedir. Anti-Chemerinin immobilizasyon adımlarında elektrot yüzeyinde farklı aşamalarda yüzey görüntülerinin farklı olması elektrot yüzeyindeki değişimleri desteklemektedir.

4.2.2.5.2. Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi

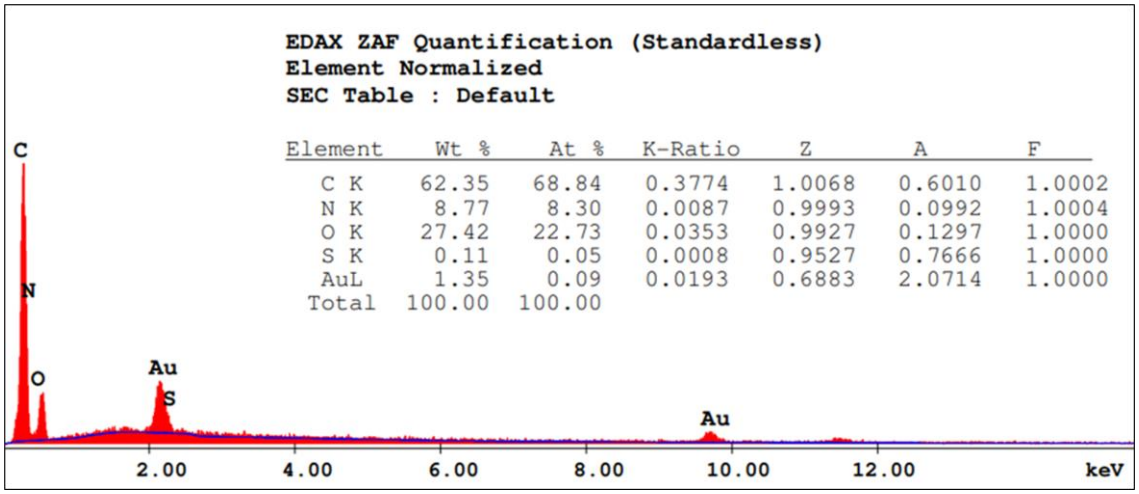
Chemerin biyosensörünün tasarımında her inkübasyon aşaması ardından yüzeydeki element miktarlarındaki değişimleri gözlemlemek için EDS analizleri gerçekleştirildi. Biyosensörün altın yüzeyinin, SAM oluşumu öncesi, 12-MDDA inkübasyonu ile SAM oluşumu sonrası ve Anti-Chemerin immobilizasyonu sonrası yüzeydeki elementel dağılımı gösteren EDS spektrumları sırasıyla Şekil 4.42, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'te verilmiştir.



Şekil 4.42. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları (A: 3DPGE yalın hali)



Şekil 4.43. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları (B: 3DPGE-12MDDA)

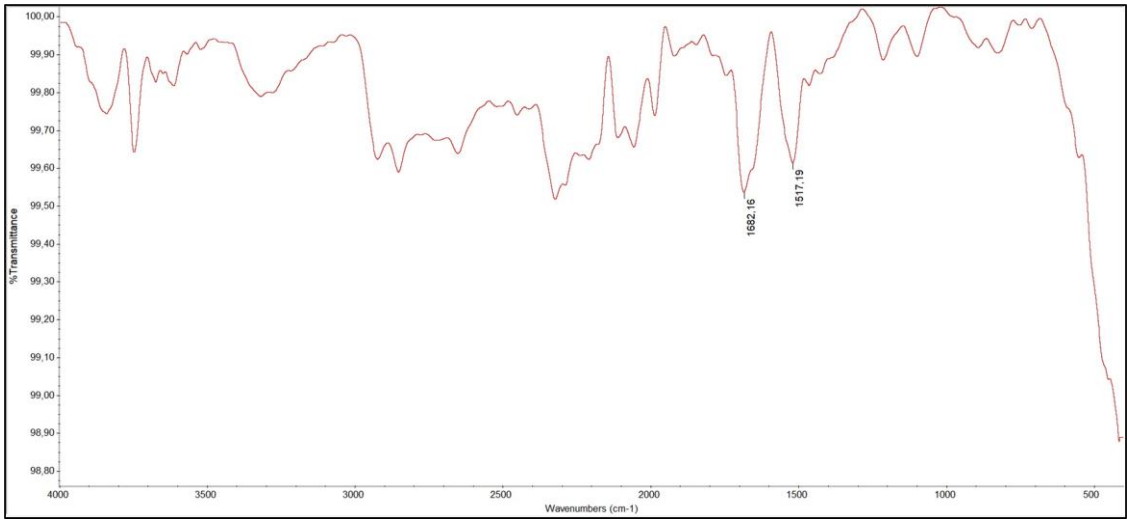


Şekil 4.44. Chemerin biyosensörünün hazırlık aşamalarının EDS spektrumları (C: 3DPGE-12MDDA-Anti-Chemerin)

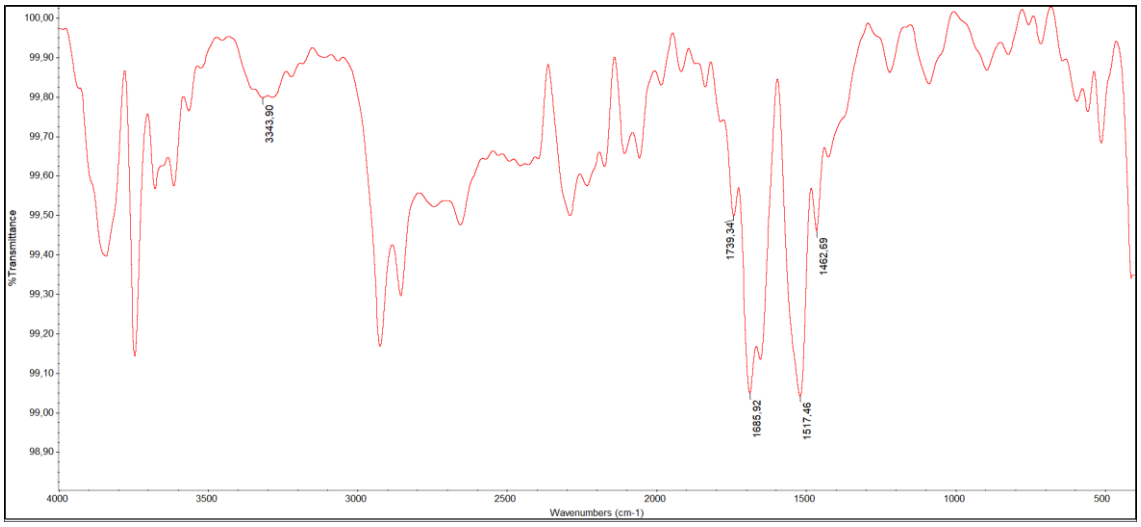
Elde edilen spektrumlara incelendiğinde 3DPGE'nin 12-MDDA ile inkübasyonu sonrası, yalın elektrotta gözlenmeyen kükürt elementi görülmektedir. Bu durum, 12-MDDA molekülünün içerdiği ve elektrotun altın yüzeyine bağlanmasının gerçekleştiği kükürt gruplarınından kaynaklıdır ve yalın elektroda kıyasla yüzeyde SAM oluşumunun bir göstergesi olarak düşünülebilir. Şekil 4.44 incelendiğinde ise, Anti-Chemerin immobilizasyonu sonucu yüzeyde immobilizasyon öncesinde bulunmayan azot elementi tespit edilmiştir. Bu tespit, Anti-Chemerin'in elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğinin bir göstergesi olabilir.

4.2.2.5.3. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Chemerin biyosensörünün, SAM oluşumu öncesi yalın hâlinin ve Anti-Chemerin immobilizasyonu sonrası yüzeyine ait FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.45 ve Şekil 4.46'da verilmiştir.



Şekil 4.45. Chemerin biyosensörünün yalın halinin FTIR spektrumu



Şekil 4.46. Chemerin biyosensörünün Anti-Chemerin immobilizasyonu sonrasına ait FTIR spektrumu

Şekil 4.46'ya bakıldığında Şekil 4.45'te yer almayan 1648 cm^{-1} ve 1516 cm^{-1} bölgelerinde amid bağına karakteristik titreşim piklerinin, 1739 cm^{-1} bölgesinde karbonil gerilmesine ait piklerin ve 3348 cm^{-1} bölgesinde amid bağı gerilimine karakteristik piklerin olduğu görülmektedir. Bu durum, yüzeyde amid bağı oluşumunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini desteklemektedir.

Bu doktora tezi çalışması kapsamında, literatürde tayinine yönelik bir biyosensörü bulunmayan potansiyel obezite biyobelirteçlerinden olan Omentin ve Chemerin moleküllerinin tayini için iki adet impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. İnsan plazmasında bulunan Omentin'in seviyeleri 100-1000 ng/mL aralığında (Y. L. Tan vd., 2015), Chemerin seviyeleri ise 80-300 ng/mL aralığında değişim göstermektedir (Bozaoglu vd., 2009; Catalán vd., 2013; Dong vd., 2011; El-Gohary vd., 2015; Han vd., 2016).

Bu biyobelirteçlerin kantitatif tayini günümüzde ticari olarak satılan ELISA kitleri kullanılarak yapılmaktadır. Bu amaca yönelik satılan ELISA kitleri farklı tayin aralıklarına ve hassasiyetlere sahiptir. Aşağıda verilen Çizelge 4.14'te piyasada ticari olarak satılan Omentin ve Chemerin ELISA kitleri ile gelişirilen Omentin ve Chemerin biyosensörünün tayin aralıkları ve hassasiyeti yer almaktadır.

Çizelge 4.14. Ticari olarak satılan Omentin ve Chemerin ELISA kitleri

Tayin yöntemi	**Tayin aralığı*** (ng/mL)	**Hassasiyet*** (ng/mL)	**Kaynak***
Omentin ELISA Kiti 1	0.63-40	0.38	www.elabscience.com
Omentin ELISA Kiti 2	5-200	1.2	www.afgsci.com
Omentin ELISA Kiti 3	0.1-1000	0.4	www.raybiotech.com
Omentin ELISA Kiti 4	5-1500	2.53	www.mybiosource.com
Geliştirilen Omentin Biyosensörü	100-1000	48.5	-
Chemerin ELISA Kiti 1	0.0078-5	0.0078	www.rndsystems.com
Chemerin ELISA Kiti 2	0.156-10	0.094	www.mybiosource.com
Chemerin ELISA Kiti 3	0.16-10	0.10	www.elabscience.com
Chemerin ELISA Kiti 4	0.51-50	0.5	www.abcam.com
Geliştirilen Chemerin Biyosensörü	2-20	0.0227	-

*Değerler firmalara ait web sitesi üzerinden alınmıştır.

Çizelge 4.14 incelendiğinde bu çalışmada geliştirilen biyosensörlerin, ticari olarak satılan ELISA kitlerine iyi bir alternatif olabileceği düşünülebilir.

Özellikle, Chemerin biyosensörünün üç boyutlu yazıcı kullanılarak çok uygun maliyetle üretilmiş olması potansiyel obezite biyobelirteçlerinin kantitatif olarak belirlenmesi için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

Albadah, M. S., Dekhil, H., Shaik, S. A., Alsaif, M. A., Shogair, M., Nawaz, S., & Alfadda, A. A. (2015). Effect of Weight Loss on Serum Osteocalcin and Its Association with Serum Adipokines. *International Journal of Endocrinology*, *2015*, 1-8. https://doi.org/10.1155/2015/508532

Ali, T. M., & al Hadidi, K. (2013). Chemerin is associated with markers of inflammation and predictors of atherosclerosis in Saudi subjects with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *2*(2), 86-95. https://doi.org/10.1016/J.BJBAS.2013.02.001

Anderson, G. W., Zimmerman, J. E., & Callahan, F. M. (1963). N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, *85*(19), 3039-3039. https://doi.org/10.1021/ja00902a047

Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., & Bastard, J. P. (2008). Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & Metabolism*, *34*(1), 2-11. https://doi.org/10.1016/J.DIABET.2007.09.004

Armstrong, F. A., & Wilson, G. S. (2000). Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochimica Acta*, *45*(15-16), 2623-2645. https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00342-X

Arya, A., Gangwar, A., & Kumar, A. (2019). Biosensors in Animal Biotechnology. *Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology: Concepts and Applications*, 75-95. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818823-1.00006-5

Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y. T., Evall, J., Whitesides, G. M., & Nuzzo, R. G. (1989). Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society*, *111*(1), 321-335. https://doi.org/10.1021/ja00183a049

Bain, C. D., & Whitesides, G. M. (1989). Modeling Organic Surfaces with Self-Assembled Monolayers. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *28*(4), 506-512. https://doi.org/10.1002/ANIE.198905061

Banas, M., Zegar, A., Kwitniewski, M., Zabieglo, K., Marczynska, J., Kapinska-Mrowiecka, M., LaJevic, M., Zabel, B. A., & Cichy, J. (2015). The Expression and Regulation of Chemerin in the Epidermis. *PLOS ONE*, *10*(2), e0117830. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117830

Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., & Gardeniers, H. (2009). Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab on a Chip*, *9*(24), 3481-3488. https://doi.org/10.1039/B914270C

Bigelow, W. C., Pickett, D. L., & Zisman, W. A. (1946). Oleophobic monolayers: I. Films adsorbed from solution in non-polar liquids. *Journal of Colloid Science*, *1*(6), 513-538. https://doi.org/10.1016/0095-8522(46)90059-1

Bleich, S., Cutler, D., Murray, C., & Adams, A. (2008). Why Is the Developed World Obese? *Annual Review of Public Health*, *29*, 273-295. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PUBLHEALTH.29.020907.090954

Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., & Lemieux, S. (2001). Effects of Acute Changes of Plasma Free Fatty Acids on Intramyocellular Fat Content and Insulin Resistance in Healthy Subjects. *Diabetes*, *50*(7), 1612-1617. https://doi.org/10.2337/DIABETES.50.7.1612

Bondue, B., Wittamer, V., & Parmentier, M. (2011). Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *22*(5-6), 331-338. https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2011.11.004

Bott, A. W. (2001). Electrochemical Techniques for the Characterization of Redox Polymers. *Current Separations*, *19*, 3.

Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K., & Segal, D. (2007). Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology*, *148*(10), 4687-4694. https://doi.org/10.1210/EN.2007-0175

Bozaoglu, K., Segal, D., Shields, K. A., Cummings, N., Curran, J. E., Comuzzie, A. G., Mahaney, M. C., Rainwater, D. L., Vandeberg, J. L., MacCluer, J. W., Collier, G., Blangero, J., Walder, K., & Jowett, J. B. M. (2009). Chemerin Is Associated with Metabolic Syndrome Phenotypes in a Mexican-American Population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94*(8), 3085-3088. https://doi.org/10.1210/JC.2008-1833

Brazaca, L. C., Janegitz, B. C., Cancino-Bernardi, J., & Zucolotto, V. (2016). Transmembrane Protein-Based Electrochemical Biosensor for Adiponectin Hormone Quantification. *ChemElectroChem*, *3*(6), 1006-1011. https://doi.org/10.1002/CELC.201600099

Bremer, A. A., & Jialal, I. (2013). Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *Journal of Obesity*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/393192

Briand, E., Salmain, M., Compère, C., & Pradier, C. M. (2006). Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *53*(2), 215-224. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2006.09.010

Brown, J. E., Potter, J. D., Jacobs, D. R., Kopher, R. A., Rourke, M. J., Barosso, G. M., Hannan, P. J., & Schmid, L. A. (1996). Maternal waist-to-hip ratio as a predictor of newborn size: Results of the Diana Project. *Epidemiology*, *7*(1), 62-66. https://doi.org/10.1097/00001648-199601000-00011

Buechler, C., Feder, S., Haberl, E., & Aslanidis, C. (2019). Chemerin Isoforms and Activity in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5), 1128. https://doi.org/10.3390/ijms20051128

Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C., & Heath, C. W. (1999). Body-Mass Index and Mortality in a Prospective Cohort of U.S. Adults. *New England Journal of Medicine*, *341*(15), 1097-1105. https://doi.org/10.1056/NEJM199910073411501

Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Ramírez, B., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., Gil, M. J., Salvador, J., & Frühbeck, G. (2013). Increased levels of chemerin and its receptor, chemokine-like receptor-1, in obesity are related to inflammation: tumor necrosis factor-α stimulates mRNA levels of chemerin in visceral adipocytes from obese patients. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, *9*(2), 306-314. https://doi.org/10.1016/J.SOARD.2011.11.001

Chang, S.-M., Palanisamy, S., Wu, T.-H., Chen, C.-Y., Cheng, K.-H., Lee, C.-Y., Yuan, S.-S. F., & Wang, Y.-M. (2020). Utilization of silicon nanowire field-effect transistors for the detection of a cardiac biomarker, cardiac troponin I and their applications involving animal models. *Scientific Reports*, *10*(1), 22027. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78829-7

Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *17*(6-7), 441-456. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X

Cristea, C., Florea, A., Tertis, M., & Sandulescu, R. (2015). Immunosensors. Içinde *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. InTech. https://doi.org/10.5772/60524

Darain, F., Park, D. S., Park, J. S., & Shim, Y. B. (2004). Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, *19*(10), 1245-1252. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2003.11.014

de Henau, O., Degroot, G. N., Imbault, V., Robert, V., de Poorter, C., McHeik, S., Galés, C., Parmentier, M., & Springael, J. Y. (2016). Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2. *PLOS ONE*, *11*(10), e0164179. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0164179

de Souza Batista, C. M., Yang, R. Z., Lee, M. J., Glynn, N. M., Yu, D. Z., Pray, J., Ndubuizu, K., Patil, S., Schwartz, A., Kligman, M., Fried, S. K., Gong, D. W., Shuldiner, A. R., Pollin, T. I., & McLenithan, J. C. (2007). Omentin Plasma Levels and Gene Expression Are Decreased in Obesity. *Diabetes*, *56*(6), 1655-1661. https://doi.org/10.2337/DB06-1506

Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. K. (2020). A novel ultrasensitive immunosensor based on disposable graphite paper electrodes for troponin T detection in cardiovascular disease. *Talanta*, *213*, 120779. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.120779

Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. K. (2021). An impedimetric biosensor system based on disposable graphite paper electrodes: Detection of ST2 as a potential

biomarker for cardiovascular disease in human serum. *Analytica Chimica Acta*, *1144*, 43-52. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.12.001

Després, J. P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, *444*(7121), 881-887. https://doi.org/10.1038/NATURE05488

Doç, Y., Aktaş, G., İzzet, A., Üniversitesi, B., İç, T. F., Anabilim, H., & Şit, M. (2013). Yeni adipokinler: Leptin, adiponektin ve omentin. *Abant Tıp Dergisi*, *2*(1), 56-62. https://doi.org/10.5505/ABANTMEDJ.2013.97269

Dong, B., Ji, W., & Zhang, Y. (2011). Elevated Serum Chemerin Levels are Associated with the Presence of Coronary Artery Disease in Patients with Metabolic Syndrome. *Internal Medicine*, *50*(10), 1093-1097. https://doi.org/10.2169/INTERNALMEDICINE.50.5025

Dranse, H. J., Muruganandan, S., Fawcett, J. P., & Sinal, C. J. (2016). Adipocyte-secreted chemerin is processed to a variety of isoforms and influences MMP3 and chemokine secretion through an NFkB-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *436*, 114-129. https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.017

Eckel, R. H., & Krauss, R. M. (1998). American Heart Association Call to Action: Obesity as a Major Risk Factor for Coronary Heart Disease. *Circulation*, *97*(21), 2099-2100. https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.21.2099

Ehzari, H., Safari, M., Samimi, M., Shamsipur, M., & Bagher Gholivand, M. (2022). A highly sensitive electrochemical biosensor for chlorpyrifos pesticide detection using the adsorbent nanomatrix contain the human serum albumin and the Pd:CdTe quantum dots. *Microchemical Journal*, *179*, 107424. https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107424

El-Gohary, I. E., Abedl-Karim, A., & Hashad, D. I. (2015). Serum Chemerin Level: Does It Have a Role in Progression of Diabetic Nephropathy. *http://www.sciencepublishinggroup.com*, *4*(2-1), 13. https://doi.org/10.11648/J.AJIM.S.2016040201.13

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

Ernst, M. C., & Sinal, C. J. (2010). Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(11), 660-667. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2010.08.001

Escalona, A. L. O., Sarfo, M., & Kudua, L. (2006). Obesity and systemic hypertension in Accra communities. *Ghana Medical Journal*, *38*(4), 145-148. https://doi.org/10.4314/gmj.v38i4.36012

Fernández-Sánchez, C., McNeil, C. J., & Rawson, K. (2005). Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *24*(1), 37-48. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2004.08.010

Fox, H. W., & Zisman, W. A. (1950). The spreading of liquids on low energy surfaces. I. polytetrafluoroethylene. *Journal of Colloid Science*, *5*(6), 514-531. https://doi.org/10.1016/0095-8522(50)90044-4

Gizeli, E., & Lowe, C. R. (1996). Immunosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, *7*(1), 66-71. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80097-8

Gómez-Hernández, A., Beneit, N., Díaz-Castroverde, S., & Escribano, Ó. (2016). Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *International Journal of Endocrinology*, *2016*, 1-15. https://doi.org/10.1155/2016/1216783

Goralski, K. B., McCarthy, T. C., Hanniman, E. A., Zabel, B. A., Butcher, E. C., Parlee, S. D., Muruganandan, S., & Sinal, C. J. (2007). Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(38), 28175-28188. https://doi.org/10.1074/jbc.M700793200

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, *8*(3), 1400-1458. https://doi.org/10.3390/s80314000

Guan, J.-G., Miao, Y.-Q., & Zhang, Q.-J. (2004). Impedimetric biosensors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *97*(4), 219-226. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70195-4

Gutiérrez-Vidal, R., Vega-Badillo, J., Reyes-Fermín, L. M., Hernández-Pérez, H. A., Sánchez-Muñoz, F., López-Álvarez, G. S., Larrieta-Carrasco, E., Fernández-Silva, I., Méndez-Sánchez, N., Tovar, A. R., Villamil-Ramírez, H., Mejía-Domínguez, A. M., Villarreal-Molina, T., Hernández-Pando, R., Campos-Pérez, F., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-Quinteros, S. (2015). SFRP5 hepatic expression is associated with non-alcoholic liver disease in morbidly obese women. *Annals of Hepatology*, *14*(5), 666-674.

Hajer, G. R., van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, *29*(24), 2959-2971. https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHN387

Han, J., Kim, S. H., Suh, Y. J., Lim, H. A., Shin, H., Cho, S. G., Kim, C. W., Lee, S. Y., Lee, D. H., Hong, S., Kim, Y. S., & Nam, M. S. (2016). Serum Chemerin Levels Are Associated with Abdominal Visceral Fat in Type 2 Diabetes. *Journal of Korean Medical Science*, *31*(6), 924-931. https://doi.org/10.3346/JKMS.2016.31.6.924

Hassani, S., Momtaz, S., Vakhshiteh, F., Maghsoudi, A. S., Ganjali, M. R., Norouzi, P., & Abdollahi, M. (2017). Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment. *Archives of toxicology*, *91*(1), 109-130. https://doi.org/10.1007/S00204-016-1875-8

Heinze, J. (1984). Cyclic Voltammetry—"Electrochemical Spectroscopy". New Analytical Methods (25). *Angewandte Chemie International Edition in English*, *23*(11), 831-847. https://doi.org/10.1002/ANIE.198408313

Herder, C., Ouwens, M., Carstensen, M., Kowall, B., Huth, C., Meisinger, C., Rathmann, W., Roden, M., & Thorand, B. (2015). Adiponectin may mediate the association between omentin, circulating lipids and insulin sensitivity: results from the KORA F4 study. *European Journal of Endocrinology*, *172*(4), 423-432. https://doi.org/10.1530/EJE-14-0879

Herová, M., Schmid, M., Gemperle, C., Loretz, C., & Hersberger, M. (2014). Low dose aspirin is associated with plasma chemerin levels and may reduce adipose tissue inflammation. *Atherosclerosis*, *235*(2), 256-262. https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2014.05.912

Huang, J., Li, Z., Liaw, B. Y., & Zhang, J. (2016). Graphical analysis of electrochemical impedance spectroscopy data in Bode and Nyquist representations. *Journal of Power Sources*, *309*, 82-98. https://doi.org/10.1016/J.JPOWSOUR.2016.01.073

İnce, B., & Sezgintürk, M. K. (2021). A high sensitive and cost-effective disposable biosensor for adiponectin determination in real human serum samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *328*, 129051. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129051

Jaikanth, C., Gurumurthy, P., Cherian, K. M., & Indhumathi, T. (2013). Emergence of omentin as a pleiotropic adipocytokine. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, *121*(7), 377-383. https://doi.org/10.1055/S-0033-1345123/ID/R01-2013-0004-ENDO-0036

James, W. P. T. (2008). The fundamental drivers of the obesity epidemic. *Obesity Reviews*, *9*(s1), 6-13. https://doi.org/10.1111/J.1467-789X.2007.00432.X

Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P.-A., Gabrielsson, B. G., Levin, M., Sjögren, A., Rudemo, M., Lystig, T. C., Carlsson, B., Carlsson, L. M. S., Lonn, M., Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P.-A., Gabrielsson, B. G., … Lonn, M. (2006). Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *The FASEB Journal*, *20*(9), 1540-1542. https://doi.org/10.1096/FJ.05-5678FJE

Jung, U., & Choi, M.-S. (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 6184-6223. https://doi.org/10.3390/ijms15046184

Karunakaran, C., Pandiaraj, M., & Santharaman, P. (2015). Immunosensors. Içinde *Biosensors and Bioelectronics* (ss. 205-245). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00004-9

Kataoka, Y., Shibata, R., Ohashi, K., Kambara, T., Enomoto, T., Uemura, Y., Ogura, Y., Yuasa, D., Matsuo, K., Nagata, T., Oba, T., Yasukawa, H., Numaguchi, Y., Sone, T., Murohara, T., & Ouchi, N. (2014). Omentin Prevents Myocardial Ischemic Injury Through AMP-Activated Protein Kinase- and Akt-Dependent Mechanisms. *Journal of the American College of Cardiology*, *63*(24), 2722-2733. https://doi.org/10.1016/J.JACC.2014.03.032

Katz, E., & Willner, I. (2003). Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis*, *15*(11), 913-947. https://doi.org/10.1002/ELAN.200390114

Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. v, Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *International Journal of Obesity*, *30*(11), 1585-1594. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803326

Kerr, S. C., Carrington, S. D., Oscarson, S., Gallagher, M. E., Solon, M., Yuan, S., Ahn, J. N., Dougherty, R. H., Finkbeiner, W. E., Peters, M. C., & Fahy, J. v. (2014). Intelectin-1 Is a Prominent Protein Constituent of Pathologic Mucus Associated with Eosinophilic Airway Inflammation in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *189*(8), 1005-1007. https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2220LE

Kim, S., & Yoo, H. (2021). Self-Assembled Monolayers: Versatile Uses in Electronic Devices from Gate Dielectrics, Dopants, and Biosensing Linkers. *Micromachines*, *12*(5), 565. https://doi.org/10.3390/mi12050565

Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, *60*(9), 702-706. https://doi.org/10.1021/ED060P702

Knight, D. W. (2001). N-Hydroxysuccinimide. Içinde *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/047084289X.rh069

Komiya, T., Tanigawa, Y., & Hirohashi, S. (1998). Cloning of the Novel Gene Intelectin, Which Is Expressed in Intestinal Paneth Cells in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *251*(3), 759-762. https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.9513

Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., & Aminabhavi, T. M. (2022). Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. *Biosensors*, *12*(7), 543. https://doi.org/10.3390/bios12070543

Kumanyika, S., Jeffery, R., Morabia, A., Ritenbaugh, C., & Antipatis, V. (2002). Obesity prevention: the case for action. *International Journal of Obesity*, *26*(3), 425-436. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801938

Kumar, P., Kim, K. H., & Deep, A. (2015). Recent advancements in sensing techniques based on functional materials for organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, *70*, 469-481. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.03.066

Langmuir, G. M. (1990). Wet Chemical Approaches to the Characterization of Organic Surfaces: Self-Assembled Monolayers, Wetting, and the Physical-Organic Chemistry of the Solid-Liquid Interface. *Akelah, A. J. Chem. Technol. Biotechnol*, *6*(1), 110.

Lau, D. C. W., Douketis, J. D., Morrison, K. M., Hramiak, I. M., Sharma, A. M., & Ur, E. (2007). 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary]. *Canadian Medical Association Journal*, *176*(8), S1-S13. https://doi.org/10.1503/cmaj.061409

Lee, J. K., Schnee, J., Pang, M., Wolfert, M., Baum, L. G., Moremen, K. W., & Pierce, M. (2001). Human homologs of the Xenopus oocyte cortical granule lectin XL35. *Glycobiology*, *11*(1), 65-73. https://doi.org/10.1093/GLYCOB/11.1.65

Lee, M.-W., Lee, M., & Oh, K.-J. (2019). Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(6), 854. https://doi.org/10.3390/jcm8060854

Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, *51*(12), 2415-2418. https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.051532

Lesná, J., Tichá, A., Hyšpler, R., Musil, F., Bláha, V., Sobotka, L., Zadák, Z., & Šmahelová, A. (2015). Omentin-1 plasma levels and cholesterol metabolism in obese patients with diabetes mellitus type 1: impact of weight reduction. *Nutrition & Diabetes*, *5*(11), e183-e183. https://doi.org/10.1038/nutd.2015.33

Leva-Bueno, J., Peyman, S. A., & Millner, P. A. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Medical Microbiology and Immunology*, *209*(3), 343-362. https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0

Li, J.-J., Yin, H.-K., Guan, D.-X., Zhao, J.-S., Feng, Y.-X., Deng, Y.-Z., Wang, X., Li, N., Wang, X.-F., Cheng, S.-Q., Bao, Y., & Xie, D. (2018). Chemerin suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through CMKLR1-PTEN-Akt axis. *British Journal of Cancer*, *118*(10), 1337-1348. https://doi.org/10.1038/s41416-018-0077-y

Li, N., Larin, E., & Kerman, K. (2017). A Miniaturized Impedimetric Immunosensor for the Competitive Detection of Adrenocorticotropic Hormone. *Sensors*, *17*(12), 2836. https://doi.org/10.3390/s17122836

Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2016). Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. *RSC Advances*, *6*(30), 24995-25014. https://doi.org/10.1039/C6RA00333H

Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2019). Introduction to Immunosensors. Içinde *Immunosensors* (C. 2019-January, Sayı 14, ss. 1-20). The Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781788016162-00001

Lin, S., Xu, X., Hu, F., Chen, Z., Wang, Y., Zhang, L., Peng, Z., Li, D., Zeng, L., Chen, Y., & Wang, Z. (2021). Using Antibody Modified Terahertz Metamaterial Biosensor to Detect Concentration of Carcinoembryonic Antigen. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, *27*(4), 1-7. https://doi.org/10.1109/JSTQE.2020.3038308

Lu, L., Seenivasan, R., Wang, Y.-C., Yu, J.-H., & Gunasekaran, S. (2016). An Electrochemical Immunosensor for Rapid and Sensitive Detection of

Mycotoxins Fumonisin B1 and Deoxynivalenol. *Electrochimica Acta*, *213*, 89-97. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.07.096

MacLennan, W. (1898). On the Treatment of Obesity and Myx dema by a New Preparation of Thyroid ("Thyroglandin"). *BMJ*, *2*(1958), 79-80. https://doi.org/10.1136/bmj.2.1958.79

Malhotra, B. D., & Ali, Md. A. (2018). Nanomaterials in Biosensors. Içinde *Nanomaterials for Biosensors* (ss. 1-74). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7

Mancuso, P. (2016). The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and Therapy*, *5*, 47. https://doi.org/10.2147/ITT.S73223

Marchesini, G., Brizi, M., Blanchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A. J., Natale, S., Forlani, G., & Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic Fatty Liver DiseaseA Feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes*, *50*(8), 1844-1850. https://doi.org/10.2337/DIABETES.50.8.1844

Marinou, K., Tousoulis, D., Antonopoulos, A. S., Stefanadi, E., & Stefanadis, C. (2010). Obesity and cardiovascular disease: From pathophysiology to risk stratification. *International Journal of Cardiology*, *138*(1), 3-8. https://doi.org/10.1016/J.IJCARD.2009.03.135

Martínez-García, G., Sánchez-Tirado, E., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2018). Amperometric immunoassay for the obesity biomarker amylin using a screen printed carbon electrode functionalized with an electropolymerized carboxylated polypyrrole. *Microchimica Acta*, *185*(7), 1-8. https://doi.org/10.1007/S00604-018-2863-X/TABLES/2

Martinkova, P., Kostelnik, A., Valek, T., & Pohanka, M. (2017). Main streams in the construction of biosensors and their applications. *International Journal of Electrochemical Science*, *12*(8), 7386-7403. https://doi.org/10.20964/2017.08.02

Maruyama, S., Shibata, R., Kikuchi, R., Izumiya, Y., Rokutanda, T., Araki, S., Kataoka, Y., Ohashi, K., Daida, H., Kihara, S., Ogawa, H., Murohara, T., & Ouchi, N. (2012). Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, *287*(1), 408-417. https://doi.org/10.1074/JBC.M111.261818

Matsuzawa, Y. (2006). Therapy insight: Adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *3*(1), 35-42. https://doi.org/10.1038/NCPCARDIO0380

Mattern, A., Zellmann, T., & Beck-Sickinger, A. G. (2014). Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life*, *66*(1), 19-26. https://doi.org/10.1002/IUB.1242

Meder, W., Wendland, M., Busmann, A., Kutzleb, C., Spodsberg, N., John, H., Richter, R., Schleuder, D., Meyer, M., & Forssmann, W. G. (2003). Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor

ChemR23. *FEBS Letters*, *555*(3), 495-499. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01312-7

Min, T. Z. M. M. M., Phanabamrung, S., Chaisriratanakul, W., Pankiew, A., Srisuwan, A., Chauyrod, K., Pongskul, C., Promptmas, C., & Leelayuwat, C. (2022). Biosensors Based on Ion-Sensitive Field-Effect Transistors for HLA and MICA Antibody Detection in Kidney Transplantation. *Molecules*, *27*(19), 6697. https://doi.org/10.3390/molecules27196697

Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., Elkhayat, E. S., & el Dine, R. S. (2014). Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, *52*(2), 269-284. https://doi.org/10.1016/J.BFOPCU.2014.05.001

Moreno-Navarrete, J. M., Cataln, V., Ortega, F., Gámez-Ambrosi, J., Ricart, W., Frühbeck, G., & Fernndez-Real, J. M. (2010). Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutrition and Metabolism*, *7*(1), 1-6. https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-27/FIGURES/2

Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Castro, A., Sabater, M., Ricart, W., & Fernández-Real, J. M. (2011). Circulating Omentin as a Novel Biomarker of Endothelial Dysfunction. *Obesity*, *19*(8), 1552-1559. https://doi.org/10.1038/OBY.2010.351

Motor, S., Keskin, M. C., & Dokuyucu, R. (2014). OBEZİTE VE ADİPOKİNLER. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, *5*(18), 34-45. https://doi.org/10.17944/mkutfd.16142

Nadri, S., Habib Kazemi, S., & Nazari, L. (2022). A novel electrochemical biosensor based on the electrospun nanofibrous nanocomposites of PCL-PPy-MWCNT towards determination of TNF-α biomarker. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *26*(6-7), 1389-1397. https://doi.org/10.1007/s10008-022-05179-x

Nagpal, S., Patel, S., Jacobe, H., DiSepio, D., Ghosn, C., Malhotra, M., Teng, M., Duvic, M., & Chandraratna, R. A. S. (1997). Tazarotene-induced Gene 2 (TIG2), a Novel Retinoid-Responsive Gene in Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *109*(1), 91-95. https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12276660

Nakamura, K., Fuster, J. J., & Walsh, K. (2014). Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*, *63*(4), 250-259. https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2013.11.006

Nakamura, R., Okura, T., Fujioka, Y., Sumi, K., Matsuzawa, K., Izawa, S., Ueta, E., Kato, M., Taniguchi, S., & Yamamoto, K. (2017). Serum fatty acid-binding protein 4 (FABP4) concentration is associated with insulin resistance in peripheral tissues, A clinical study. *PLOS ONE*, *12*(6), e0179737. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179737

Naresh, Varnakavi., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, *21*(4), 1109. https://doi.org/10.3390/s21041109

Narumi, T., Watanabe, T., Kadowaki, S., Kinoshita, D., Yokoyama, M., Honda, Y., Otaki, Y., Nishiyama, S., Takahashi, H., Arimoto, T., Shishido, T., Miyamoto,

T., & Kubota, I. (2014). Impact of serum omentin-1 levels on cardiac prognosis in patients with heart failure. *Cardiovascular Diabetology*, *13*(1), 1-7. https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-84/TABLES/4

Neves, K. B., Lobato, N. S., Cat, A. N. D., Lopes, R. A. M., Hood, K. Y., Oliveira, A. M., Montezano, A. C., Touyz, R. M., & Tostes, R. C. (2016). Chemerin/ChemR23 system plays crucial role upon vascular insulin signaling in db/db mice. *The FASEB Journal*, *30*(S1), 1269.9-1269.9. https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.1269.9

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., … Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, *384*(9945), 766-781. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8

Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, *26*(6), 157-163. https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157

Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. (2019). Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials*, *12*(1), 121. https://doi.org/10.3390/ma12010121

Nicholson, R. S., & Shain, Irving. (1964). Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Analytical Chemistry*, *36*(4), 706-723. https://doi.org/10.1021/ac60210a007

Nielsen, S., & Jensen, M. D. (1997). Obesity and cardiovascular disease: Is body structure a factor? *Current Opinion in Lipidology*, *8*(4), 200-204. https://doi.org/10.1097/00041433-199708000-00002

Nuzzo, R. G., Dubois, L. H., & Allara, D. L. (1990). Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, *112*(2), 558-569. https://doi.org/10.1021/ja00158a012

Nway, N. C., Sitticharoon, C., Chatree, S., & Maikaew, P. (2016). Correlations between the expression of the insulin sensitizing hormones, adiponectin, visfatin, and omentin, and the appetite regulatory hormone, neuropeptide Y and its receptors in subcutaneous and visceral adipose tissues. *Obesity Research & Clinical Practice*, *10*(3), 256-263. https://doi.org/10.1016/J.ORCP.2015.05.007

Ofori-Asenso, R., Agyeman, A. A., Laar, A., & Boateng, D. (2016). Overweight and obesity epidemic in Ghana—a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, *16*(1), 1239. https://doi.org/10.1186/s12889-016-3901-4

Ohashi, K., Shibata, R., Murohara, T., & Ouchi, N. (2014). Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(7), 348-355. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2014.03.009

Okafor, C., Grooms, D., Alocilja, E., & Bolin, S. (2014). Comparison between a Conductometric Biosensor and ELISA in the Evaluation of Johne's Disease. *Sensors*, *14*(10), 19128-19137. https://doi.org/10.3390/s141019128

Oliver, T. (1880). Post-Mortem in a Case of Extreme Obesity. *Journal of Anatomy and Physiology*, *14*(Pt 3), 345-347. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1309955/

Ortega, F. B., Lavie, C. J., & Blair, S. N. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, *118*(11), 1752-1770. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306883

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, *11*(2), 85-97. https://doi.org/10.1038/nri2921

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. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.067

Özcan, B., & Sezgintürk, M. K. (2021). Highly Sensitive and Single-Use Biosensing System Based on a GP Electrode for Analysis of Adiponectin, an Obesity Biomarker. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *7*(8), 3658-3668. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00094

Özcan, B., & Sezgintürk, M. K. (2022). Fabrication of an ultrasensitive and single-use graphite paper based immunosensor for Neuropeptide Y detection: A promising biosensing system for early detection of childhood obesity. *Materials Today Communications*, *33*, 104797. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104797

Özcan, H. M., & Sezgintürk, M. K. (2015). Detection of parathyroid hormone using an electrochemical impedance biosensor based on PAMAM dendrimers. *Biotechnology Progress*, *31*(3), 815-822. https://doi.org/10.1002/BTPR.2060

Özyurt, C., Uludağ, İ., & Sezgintürk, M. K. (2022). An ultrasensitive and disposable electrochemical aptasensor for prostate-specific antigen (PSA) detection in real serum samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-14. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04309-8

Pan, H. Y., Guo, L., & Li, Q. (2010). Changes of serum omentin-1 levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *88*(1), 29-33. https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2010.01.013

Park, S. E., Park, C.-Y., & Sweeney, G. (2015). Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: Past, present and future. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *52*(4), 180-190. https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1023429

Paulie, S., Perlmann, P., & Perlmann, H. (2006). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Içinde *Cell Biology* (ss. 533-538). https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50065-4

Perry, A. W. (1903). Nature and Treatment of Obesity. *California state journal of medicine*, *1*(12), 356-359. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18732940

Poirier, P., & Eckel, R. H. (2002). Obesity and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, *4*(6), 448-453. https://doi.org/10.1007/s11883-002-0049-8

Pottorf, R. S., & Szeto, P. (2001). 1-Ethyl-3-(3′-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride. Içinde *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/047084289X.re062

Radhakrishnan, R., Suni, I. I., Bever, C. S., & Hammock, B. D. (2014). Impedance Biosensors: Applications to Sustainability and Remaining Technical Challenges. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *2*(7), 1649-1655. https://doi.org/10.1021/sc500106y

Rajesh, Singal, S., & Kotnala, R. K. (2017). Single Frequency Impedance Analysis on Reduced Graphene Oxide Screen-Printed Electrode for Biomolecular Detection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *183*(2), 672-683. https://doi.org/10.1007/S12010-017-2510-8/FIGURES/7

Randles, J. E. B. (1947). Kinetics of rapid electrode reactions. *Discussions of the Faraday Society*, *1*, 11. https://doi.org/10.1039/df9470100011

Rasanang, N. S., Nor, S. N. S., Karman, S., Zaman, W. S. W. K., Harun, S. W., & Arof, H. (2022). Characteristics of the 11-Mercaptoundecanoic Acid (11-MUA) Binding to Gold Surface as Self-Assembled Monolayer (SAM) for SPR based Biosensor. *2022 IEEE 18th International Colloquium on Signal Processing & Applications (CSPA)*, 403-407. https://doi.org/10.1109/CSPA55076.2022.9781966

Reen, D. J. (1994). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Içinde *Basic Protein and Peptide Protocols* (C. 32, ss. 461-466). Humana Press. https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:461

Reverchon, M., Cornuau, M., Ram, C., Guerif, F., Royre, D., & Dupont, J. (2012). Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Human Reproduction*, *27*(6), 1790-1800. https://doi.org/10.1093/HUMREP/DES089

Rourke, J. L., Dranse, H. J., & Sinal, C. J. (2013). Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity Reviews*, *14*(3), 245-262. https://doi.org/10.1111/OBR.12009

Rourke, J. L., Dranse, H. J., & Sinal, C. J. (2015). CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *417*, 36-51. https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.09.002

Salek-Maghsoudi, A., Vakhshiteh, F., Torabi, R., Hassani, S., Ganjali, M. R., Norouzi, P., Hosseini, M., & Abdollahi, M. (2018). Recent advances in

biosensor technology in assessment of early diabetes biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, *99*, 122-135. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2017.07.047

Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, *30*(3), 489-511. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.09.003

Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S41-S52. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046

Sell, H., Laurencikiene, J., Taube, A., Eckardt, K., Cramer, A., Horrighs, A., Arner, P., & Eckel, J. (2009). Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle Cells. *Diabetes*, *58*(12), 2731-2740. https://doi.org/10.2337/DB09-0277

Shang, F. J., Wang, J. P., Liu, X. T., Zheng, Q. S., Xue, Y. S., Wang, B., & Zhao, L. Y. (2011). Serum omentin-1 levels are inversely associated with the presence and severity of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2011.622789*, *16*(8), 657-662. https://doi.org/10.3109/1354750X.2011.622789

Shanker, A., Lee, K., & Kim, J. (2014). Synthetic Hybrid Biosensors. Içinde *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (ss. 1-36). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.20130069

Shibata, R., Ouchi, N., Kikuchi, R., Takahashi, R., Takeshita, K., Kataoka, Y., Ohashi, K., Ikeda, N., Kihara, S., & Murohara, T. (2011). Circulating omentin is associated with coronary artery disease in men. *Atherosclerosis*, *219*(2), 811-814. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.017

Shibata, R., Ouchi, N., Ohashi, K., & Murohara, T. (2017). The role of adipokines in cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*, *70*(4), 329-334. https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2017.02.006

Shibata, R., Ouchi, N., Takahashi, R., Terakura, Y., Ohashi, K., Ikeda, N., Higuchi, A., Terasaki, H., Kihara, S., & Murohara, T. (2012). Omentin as a novel biomarker of metabolic risk factors. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *4*(1), 37. https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-37

Shibata, R., Takahashi, R., Kataoka, Y., Ohashi, K., Ikeda, N., Kihara, S., Murohara, T., & Ouchi, N. (2011). Association of a fat-derived plasma protein omentin with carotid artery intima-media thickness in apparently healthy men. *Hypertension Research*, *34*(12), 1309-1312. https://doi.org/10.1038/hr.2011.130

Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, *2*(1), 21. https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345

Shukla, S. K., Govender, P. P., & Tiwari, A. (2016). Polymeric Micellar Structures for Biosensor Technology. Içinde *Advances in Biomembranes and Lipid Self-*

Assembly (C. 24, ss. 143-161). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abl.2016.04.005

Singh, M., Kaur, N., & Comini, E. (2020). The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *Journal of Materials Chemistry C*, *8*(12), 3938-3955. https://doi.org/10.1039/D0TC00388C

Singh, P., Pandey, S. K., Singh, J., Srivastava, S., Sachan, S., & Singh, S. K. (2016). Biomedical Perspective of Electrochemical Nanobiosensor. *Nano-Micro Letters*, *8*(3), 193-203. https://doi.org/10.1007/S40820-015-0077-X

Sinha, R. K. (2021). Wavelength modulation based surface plasmon resonance sensor for detection of cardiac marker proteins troponin I and troponin T. *Sensors and Actuators A: Physical*, *332*, 113104. https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.113104

Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *92*(3), 1023-1033. https://doi.org/10.1210/JC.2006-1055

Smekal, A., & Vaclavik, J. (2017). Adipokines and cardiovascular disease: A comprehensive review. *Biomedical Papers*, *161*(1), 31-40. https://doi.org/10.5507/bp.2017.002

Sonuç Karaboğa, M. N., & Sezgintürk, M. K. (2021). A nano-composite based regenerative neuro biosensor sensitive to Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 in cerebrospinal fluid and saliva. *Bioelectrochemistry*, *138*, 107734. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107734

Stejskal, D., Karpisek, M., Hanulova, Z., & Svestak, M. (2008). Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population-a pilot study. *Biomedical Papers*, *152*(2), 217-221. https://doi.org/10.5507/bp.2008.033

Storici, P., Tossi, A., Lenarcic, B., & Romeo, D. (1996). Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides. *European journal of biochemistry*, *238*(3), 769-776. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0769w.x

Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2008). Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *The Lancet*, *371*(9631), 2153-2156. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60932-0

Sumithra, B., Jayanthi, V. S. P. K. S. A., Manne, H. C., Gunda, R., Saxena, U., & Das, A. B. (2020). Antibody-based biosensor to detect oncogenic splicing factor Sam68 for the diagnosis of lung cancer. *Biotechnology Letters*, *42*(12), 2501-2509. https://doi.org/10.1007/s10529-020-02951-9

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

Suni, I. I. (2008). Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(7), 604-611. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2008.03.012

Suzuki, Y. A., Shin, K., & Lönnerdal, B. (2001). Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, *40*(51), 15771-15779. https://doi.org/10.1021/BI0155899/ASSET/IMAGES/LARGE/BI0155899F00008.JPEG

Syed Ikmal, S. I. Q., Zaman Huri, H., Vethakkan, S. R., & Wan Ahmad, W. A. (2013). Potential Biomarkers of Insulin Resistance and Atherosclerosis in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Coronary Artery Disease. *International Journal of Endocrinology*, *2013*, 1-11. https://doi.org/10.1155/2013/698567

Tan, B. K., Adya, R., & Randeva, H. S. (2010). Omentin: A Novel Link Between Inflammation, Diabesity, and Cardiovascular Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *20*(5), 143-148. https://doi.org/10.1016/J.TCM.2010.12.002

Tan, Y. L., Zheng, X. L., & Tang, C. K. (2015). The protective functions of omentin in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta*, *448*, 98-106. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2015.05.019

Törer, H., Aydın, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2018). A label-free electrochemical biosensor for direct detection of RACK 1 by using disposable, low-cost and reproducible ITO based electrode. *Analytica Chimica Acta*, *1024*, 65-72. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2018.04.031

Trafela, S., Korent, A., Soderznik, K. Z., Zuzek, K., & Sturm, S. (2022). Rapid SARS-CoV-2 S-protein Detection using Nanostructured Electrochemical Biosensor. *Proceedings of IEEE Sensors*, *2022-October*. https://doi.org/10.1109/SENSORS52175.2022.9967298

Tsuji, S., Uehori, J., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Matsuhisa, A., Toyoshima, K., & Seya, T. (2001). Human Intelectin Is a Novel Soluble Lectin That Recognizes Galactofuranose in Carbohydrate Chains of Bacterial Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(26), 23456-23463. https://doi.org/10.1074/jbc.M103162200

Ulman, A. (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, *96*(4), 1533-1554. https://doi.org/10.1021/cr9502357

Washimi, K., Yokose, T., Yamashita, M., Kageyama, T., Suzuki, K., Yoshihara, M., Miyagi, Y., Hayashi, H., & Tsuji, S. (2012). Specific Expression of Human Intelectin-1 in Malignant Pleural Mesothelioma and Gastrointestinal Goblet Cells. *PLOS ONE*, *7*(7), e39889. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039889

Watanabe, K., Watanabe, R., Konii, H., Shirai, R., Sato, K., Matsuyama, T. A., Ishibashi-Ueda, H., Koba, S., Kobayashi, Y., Hirano, T., & Watanabe, T. (2016). Counteractive effects of omentin-1 against atherogenesis†. *Cardiovascular Research*, *110*(1), 118-128. https://doi.org/10.1093/CVR/CVW016

Wesener, D. A., Wangkanont, K., McBride, R., Song, X., Kraft, M. B., Hodges, H. L., Zarling, L. C., Splain, R. A., Smith, D. F., Cummings, R. D., Paulson, J. C., Forest, K. T., & Kiessling, L. L. (2015). Recognition of microbial glycans by human intelectin-1. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(8), 603-610. https://doi.org/10.1038/nsmb.3053

Wittamer, V., Franssen, J. D., Vulcano, M., Mirjolet, J. F., le Poul, E., Migeotte, I., Brézillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., Mantovani, A., Sozzani, S., Vassart, G., Parmentier, M., & Communi, D. (2003). Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(7), 977-985. https://doi.org/10.1084/JEM.20030382

Wittamer, V., Grégoire, F., Robberecht, P., Vassart, G., Communi, D., & Parmentier, M. (2004). The C-terminal Nonapeptide of Mature Chemerin Activates the Chemerin Receptor with Low Nanomolar Potency. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(11), 9956-9962. https://doi.org/10.1074/jbc.M313016200

Wofford, M., & Hall, J. (2005). Pathophysiology and Treatment of Obesity Hypertension. *Current Pharmaceutical Design*, *10*(29), 3621-3637. https://doi.org/10.2174/1381612043382855

Wu, Z. S., Li, J. S., Deng, T., Luo, M. H., Shen, G. L., & Yu, R. Q. (2005). A sensitive immunoassay based on electropolymerized films by capacitance measurements for direct detection of immunospecies. *Analytical Biochemistry*, *337*(2), 308-315. https://doi.org/10.1016/J.AB.2004.10.051

Yamawaki, H., Kuramoto, J., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M., & Hara, Y. (2011). Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *408*(2), 339-343. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.04.039

Yang, R. Z., Lee, M. J., Hu, H., Pray, J., Wu, H. bin, Hansen, B. C., Shuldiner, A. R., Fried, S. K., McLenithan, J. C., & Gong, D. W. (2006). Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: Possible role in modulating insulin action. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *290*(6), 1253-1261. https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00572.2004/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10060645400005.JPEG

Yin, Z., Liu, Y., Jiang, L. P., & Zhu, J. J. (2011). Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor α based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(5), 1890-1894. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.03.025

Yokoyama-Kobayashi, M., Yamaguchi, T., Sekine, S., & Kato, S. (1999). Selection of cDNAs encoding putative type II membrane proteins on the cell surface from a human full-length cDNA bank. *Gene*, *228*(1-2), 161-167. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00004-9

Yoo, H. J., Hwang, S. Y., Hong, H. C., Choi, H. Y., Yang, S. J., Seo, J. A., Kim, S. G., Kim, N. H., Choi, K. M., Choi, D. S., & Baik, S. H. (2011). Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, *10*(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-103/TABLES/2

Yoon, M., Hwang, H. J., & Kim, J. H. (2011). Immobilization of antibodies on the self-assembled monolayer by antigen-binding site protection and immobilization kinetic control. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, *04*(04), 242-247. https://doi.org/10.4236/JBISE.2011.44033

Yoshimura, T., & Oppenheim, J. J. (2011). Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C–C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties. *Experimental Cell Research*, *317*(5), 674-684. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2010.10.023

Yu, D. (2011). Omentin Activates AMP-activated Protein Kinase and Plays a Role in Energy Metabolism and Immune Response. http://hdl.handle.net/10713/542

Zabel, B. A., Kwitniewski, M., Banas, M., Zabieglo, K., Murzyn, K., & Cichy, J. (2014). Chemerin regulation and role in host defense. *American journal of clinical and experimental immunology*, *3*(1), 1-19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24660117

Zanetti, M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*(1), 39-48. https://doi.org/10.1189/JLB.0403147

Zhang, C., Liu, L., Li, H., Hu, J., Zhang, J., Zhou, H., Zhang, Z., & Du, X. (2022). An oriented antibody immobilization based electrochemical platform for detection of leptin in human with different body mass index. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *353*, 131074. https://doi.org/10.1016/J.SNB.2021.131074

Zhang, J., Yang, L., Pei, J., Tian, Y., & Liu, J. (2022). A reagentless electrochemical immunosensor for sensitive detection of carcinoembryonic antigen based on the interface with redox probe-modified electron transfer wires and effectively immobilized antibody. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 848. https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.939736/BIBTEX

Zhong, X., Zhang, H. Y., Tan, H., Zhou, Y., Liu, F. L., Chen, F. Q., & Shang, D. Y. (2011). Association of serum omentin-1 levels with coronary artery disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, *32*(7), 873-878. https://doi.org/10.1038/aps.2011.26

Zhou, J., Liao, D., Zhang, S., Cheng, N., He, H., & Ye, R. D. (2014). Chemerin C9 peptide induces receptor internalization through a clathrin-independent pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(5), 653-663. https://doi.org/10.1038/aps.2013.198

Zhou, J.-Y., Chan, L., & Zhou, S.-W. (2014). Omentin: Linking Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Current Vascular Pharmacology*, *12*, 136-143.

Zorena, K., Jachimowicz-Duda, O., Ślęzak, D., Robakowska, M., & Mrugacz, M. (2020). Adipokines and obesity. Potential link to metabolic disorders and chronic complications. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(10). https://doi.org/10.3390/IJMS21103570

ÖZGEÇMİŞ

İstanbul'da doğdum. Lise eğitimimi Behiye Dr. Nevhiz Işıl Anadolu Lisesi'nde 2006 yılında tamamladım. 2007 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans eğitimime başladım; 2011 yılında mezun oldum. 2011 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım; 2013 yılında mezun oldum. 2014 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başlamış olduğum doktora eğitimime devam etmekteyim.