T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİSFATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

SABRİYE KÖKSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

EDİRNE-2023

SABRİYE KÖKSAL'ın hazırladığı **"VİSFATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ"** başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN	……
Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR	……
Dr. Öğr. Üyesi Engin ASAV	……

Tez Savunma Tarihi: 10 / 01 / 2023

Bu tezin Yüksek Lisans 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
(Ünvan, Ad, Soyad)
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

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

10 / 01 / 2023
Sabriye KÖKSAL
İmza

Yüksek Lisans Tezi

Visfatin Tayini İçin Yeni Bir İmmünosensör Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Adipoz doku, aktif bir endokrin organdır ve adipositokin olarak isimlendirilen fazla miktarda biyoaktif faktör sentezlemektedir. Adipoz dokunun içinde bulunan adipositokinler hem lokal olarak etkilidirler hem de dolaşım yolu ile başka organlara etki ederler. Visfatin yeni keşfedilen adipositokinlerden biridir. Visfatin, insüline duyarlı olan hücrelerde insülin reseptörüne bağlanıp insülin mimetik (taklit eden) etki gösterir. Araştırmalar sonucu diyabet hastalığı olan ve abdominal obeziteye sahip hastalarda visfatinin plazma konsantrasyonlarında artış tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) tekniklerini temel alan, visfatinin kantitatif tespiti için spesifik ve hassas bir immünolojik biyosensör geliştirilmiştir. Anti-visfatin antikoru camsı karbon çalışma elektrodu yüzeyinde elektrokimyasal olarak oluşturulan glutamik asit polimeri üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Elektrot yüzeyine anti-visfatin antikorunun immobilizasyonu yüzey karakterizasyonu ile taramalı elektron mikroskobu ve FTIR teknikleri kullanılarak gösterilmiştir. Tasarlanan biyosensörün visfatinin kantitatif tayini için kullanılabilirliği gösterilmiş ve yapay serum ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 111

Anahtar Kelimeler : Visfatin, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, döngüsel voltametri, immünosensör, adipositokin

Master Thesis

Development of New Immunosensor for Visfatin Detection

Trakya University Institue of Natural Sciences

Chemistry of Department

ABSTRACT

Adipose tissue is an active endocrine organ and synthesizes a large amount of bioactive factor called adipocytokine. Adipocytokines in the adipose tissue are both locally effective and affect other organs through the circulation. Visfatin is one of the newly discovered adipocytokines. Visfatin acts as an insulin mimetic by binding to the insulin receptor in insulin-sensitive cells. As a result of studies, increased plasma concentrations of visfatin have been detected in patients with diabetes and abdominal obesity.

In this thesis, a specific and sensitive immunological biosensor was developed for the quantitative detection of visfatin, based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) techniques. Anti-visfatin antibody was covalently immobilized on the electrochemically formed glutamic acid polymer on the glassy carbon working electrode surface. Immobilization of anti-visfatin antibody to the electrode surface has been demonstrated using surface characterization, scanning electron microscopy and FTIR techniques. The usability of the designed biosensor for the quantitative determination of visfatin was demonstrated and analyzes were performed with artificial serum.

Year : 2023

Number of Pages : 111

Keywords : Visfatin, electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, immunosensor, adipocytokin

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince engin bilgi birikimlerinden ve deneyimlerinden faydalandığım tezimin her aşamasında bana her türlü yardım ve destekte bulunan danışman hocam Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a tüm emek ve özverileri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım süresince bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli Prof. Dr. Hülya YAĞAR ve Prof. Dr. Şebnem Selen İŞBİLİR hocalarıma,

Deneysel çalışmalarımda her türlü destekte bulunan Öğr. Gör. Alp YÜCEL ve Dilek Nur ALTAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda her zaman olduğu gibi, yüksek lisans dönemim süresince de maddi, manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşime, her zaman yanımda olan beni kırmayıp bana destek ve yardımcı olan nişanlım Avukat Ahmet FİLİZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans döneminde bana gösterdikleri hoşgörü için işyeri çalışma arkadaşlarım Hülya YILDIR ERDİNÇ ve İnci Mercan ÇUBUKÇU'ya çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından 2020/134 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Sabriye KÖKSAL

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

TEŞEKKÜR ..... **vi**

SEMBOLLER ve KISALTMALAR ..... **x**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**

BÖLÜM 1 ..... **1**

GİRİŞ **1**

BÖLÜM 2 ..... **3**

KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Diabetes Mellitus 3

2.1.1. Diyabet Türleri 5

2.1.1.1. Tip 1 Diyabet 6

2.1.1.2. Tip 2 Diyabet 7

2.1.1.3. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet 9

2.1.1.4. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (Gebelik Diyabeti) 9

2.1.2. Diyabet Tanısı 12

2.1.3. İnsülin Direnci ve Metabolik Sendrom 14

2.1.4. Obezite ve Tip 2 Diyabet İlişkisi 15

2.2. Adipoz Doku ve Fonksiyonları 16

2.2.1. Obezite biyobelirteçlerinin diyabet ile ilişkisi 19

2.3. Visfatin 22

2.3.1. Visfatin Ölçüm Yöntemleri 28

2.4. Biyosensörler 28

2.4.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 31

2.4.2. Biyoreseptörlerin Sınıflandırılması.....32
2.4.2.1. Antikor temelli biyosensörler.....32
2.4.2.2. Enzim temelli biyosensörler.....33
2.4.2.3. Nükleik asit esaslı biyosensörler.....34
2.4.2.4. Mikroorganizma temelli biyosensörler.....34
2.4.2.5. Canlı hücre temelli biyosensörler.....34
2.4.3. Transduserlerin Sınıflandırılması.....35
2.4.3.1. Elektrokimyasal biyosensörler.....35
2.4.3.1.1. İmpidimetrik Biyosensörler.....37
2.4.3.1.2. Elekktrokimyasal İmpedans Spektroskopisi.....38
2.5. Voltametri ve Döngüsel Voltametri (CV).....43
2.6. Biyosensör Tasarımları İçin İmmobilizasyon Yöntemleri.....46
2.6.1. İmmobilizasyon Yöntemleri.....46
2.6.2. Elektrokimyasal Polimerleşme.....47
2.6.2.1. Glutamik asit ve glutamik asidin elektrokimyasal polimerleşmesi.....49
BÖLÜM 3.....51
MATERYAL VE YÖNTEM.....51
3.1. Materyal.....51
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Araç Gereçler.....51
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....52
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanışı.....53
3.2. Yöntem.....54
3.2.1. GC Elektrot Hazırlığı ve Visfatin Biyosensörünün Tasarım Stratejisi.....54
3.2.1.1. Elektrot Temizliği.....54
3.2.1.2. GC Elektrot Yüzeyinde Aktif Karboksil Gruplarının Biriktirilmesi.....54
3.2.1.3. EDC/NHS ile Aktivasyon.....55
3.2.1.4. Anti-Visfatin İmmobilizasyonu ve Biyosensörün Tasarım Stratejisi.....55
3.2.2. Visfatin Biyosensörünün Ölçüm Prensibi.....56
3.2.2.1. Yük transfer direncinin (Rct) hesaplanması.....57
3.2.3. Biyosensör İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu.....59
3.2.3.1. Glutamik asit konsantrasyonu optimizasyonu.....59
3.2.3.2. Elektropolimerizasyon işleminde döngü sayısı optimizasyonu.....60
3.2.3.3. Anti-visfatin konsantrasyon optimizasyonu.....60

3.2.3.4. Visfatin inkübasyon süresi optimizasyonu 61
3.2.4. Biyosensörün Yüzey Karakterizasyonu 61
3.2.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 61
3.2.4.2. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) 61
3.2.4.3. Biyosensörün yüzey alanının hesaplanması 62
3.2.5. Biyosensörün Analitik Karakterizasyonu 62
3.2.5.1. Doğrusal Tayin Aralığı 62
3.2.5.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları 63
3.2.5.3. Yapay Serumda Visfatin Analizi 63
BÖLÜM 4 64
SONUÇLAR VE TARTIŞMA 64
4.1. Visfatin Biyosensörü ile Elde Edilen Veriler 64
4.1.1. Biyosensör Tasarımında Elde Edilen Veriler 64
4.2. Visfatin Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu 67
4.2.1. Glutamik Asit Konsantrasyonunun Optimizasyonu 67
4.2.2. Elektropolimerizasyon İşleminde Döngü Sayısı Optimizasyonu 69
4.2.3. Anti-visfatin Konsantrasyonun Optimizasyonu 71
4.2.4. İnkübasyon Süre Optimizasyonu 72
4.2.5. Tüm İmmobilizasyon Basamaklarının Optimum Çalışma Değerleri 74
4.3. Biyosensörün Yüzey Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular 74
4.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri 74
4.3.2. Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları 75
4.3.3. Biyosensör Yüzey Alanı Hesaplanması 76
4.4. Visfatin Biyosensörünün Analitik Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular 78
4.4.1. Doğrusal Tayin Aralığı 78
4.4.2. Tekrar üretilebilirlik ve Tekrarlanabilirlik çalışmaları 80
4.4.3. Yapay Serumda Uygulama 82
KAYNAKLAR 85
ÖZGEÇMİŞ 98

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

CV : Döngüsel Voltametri
DM : Diabetes Mellitus
EDC : 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
EIS : Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
GC : Glassy Carbon Elektrot
GLU : Glutamik Asit
IDF : Uluslararası Diyabet Federasyonu
ng : Nanogram
NHS : N-Hidroksisuksinimit
Rct : Yük Transfer Direnci
pg : Pikogram
PGLU : Poli Glutamik asit
T1DM : Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM : Tip 2 Diabetes Mellitus
µL : Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Diyabetin tanı algoritması 14
Şekil 2.2. Nikotinamid fosforibosil transferaz 22
Şekil 2.3. İnsanlarda visfatin 7. kromozom üzerinde yer alır 23
Şekil 2.4. Viseral yağ dokusundan salgılanan visfatinin insülin reseptörüne farklı bir yerden bağlanması 25
Şekil 2.5. Bir biyosensörün şematik olarak tasarımı 29
Şekil 2.6. Biyosensörlerin sınıflandırılması 32
Şekil 2.7. Üçlü elektrokimyasal hücre şeması 36
Şekil 2.8. İmpedans denklemi 39
Şekil 2.9. Potansiyel-zaman ve akım-zaman büyüklüklerine bağlı bir impedansın gösterimi 40
Şekil 2.10. Nyquist ve Bode grafiklerinin gösterimi 40
Şekil 2.11. Randles eşdeğer devre modeli örneği 42
Şekil 2.12. Tipik bir Randles hücresinin gösterimi 42
Şekil 2.13. İkizkenar üçgen dalgası biçiminde uygulanan potansiyel grafiği 44
Şekil 2.14. Üçgen dalga potansiyeli verildiğinde ortaya çıkan voltammogram 45
Şekil 2.15. Biyosensörlerin immobilizasyon yöntemleri 46
Şekil 2.16. Glutamik asidin yapısı 49
Şekil 2.17. Poli Glutamik asit 50
Şekil 3.1. Visfatin biyosensörünün tasarım aşamaları 56
Şekil 3.2. Örnek eşdeğer devre modeli 57
Şekil 3.3. Gamry Analyst yazılımında bulunan devre modelleri 58
Şekil 3.4. Rct değerini hesaplama tablosu 59
Şekil 4.1. Visfatin biyosensörün her bir immobilizasyon adımında elde edilen impedans spektrumları 65

Şekil 4.2. Visfatin biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen döngüsel voltammogramları 65
Şekil 4.3. Her immobilizasyon adımları sonrasında elde edilen Rct değerlerine bağlı sütun grafik 66
Şekil 4.4. GLU konsatrasyonları farklı olarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri 68
Şekil 4.5. Aynı konsantrasyonda hazırlanan GLU çözeltisinin farklı döngü sayılarına göre verdiği cevaplar 70
Şekil 4.6. Anti-visfatin konsantrasyon optimizasyon basamağına ait kalibrasyon grafikleri 71
Şekil 4.7. Visfatin inkübasyon süresi optimizasyon basamağına ait kalibrasyon grafikleri 73
Şekil 4.8. Tasarlanmış olan biyosensörün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri 75
Şekil 4.9. BARE GC ve ANTI-Visfatin elektrotların FTIR spektrumları 76
Şekil 4.10. Bare elektrot ile 10 farklı potansiyel sonucunda belirlenen döngüsel voltamogramlar 77
Şekil 4.11. Tasarlanmış olan biyosensör ile 10 farklı potansiyel sonucunda belirlenen döngüsel voltamogramlar 77
Şekil 4.12. Biyosensörün 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığındaki Nyquist eğrileri 78
Şekil 4.13. Biyosensörün 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları 79
Şekil 4.14. Biyosensörün kalibrasyon grafiği 79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Diyabetin en çok görüldüğü ülkeler 4
Çizelge 2.2. Diyabet Semptomları 6
Çizelge 2.3. Diyabette etyolojik sınıflandırma 11
Çizelge 2.4. Diyabet tanı kriterleri 13
Çizelge 2.5. Yağ dokusundan salınan bazı önemli adipokinlerin özellikleri 18
Çizelge 2.6. Visfatin salınımını etkileyen faktörler 24
Çizelge 2.7. Biyosensör bileşen içerikleri 30
Çizelge 2.8. İmpedans elemanlarının tanımlamaları, frekans bağımlılığı ve faz açısı ..41
Çizelge 4.1. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarının EIS ölçümlerinden hesaplanan yük transfer direnci değerleri 66
Çizelge 4.2. GLU konsantrasyonları farklı olarak hazırlanan biyosensörlerin elde edilen doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri 68
Çizelge 4.3. Aynı konsantrasyonda hazırlanan GLU çözeltisinin farklı döngü sayılarına göre verdiği cevapların doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri 70
Çizelge 4.4. Anti-visfatin konsantrasyon optimizasyon sonucundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri 72
Çizelge 4.5. Visfatin inkübasyon süresi optimizasyon basamağında belirlenen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri 73
Çizelge 4.6. Visfatin biyosensörünün optimum çalışma şartları 74
Çizelge 4.7. Visfatin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarının doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri 81
Çizelge 4.8. Visfatin biyosensörünün tekrarlanabilirliği 82
Çizelge 4.9. Yapay serum uygulamasında visfatin analizi sonuçları 83

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünya genelinde artmakta olan diabetes mellitus (DM) hastalığı modern toplumdaki en önemli sağlık sorunlarından biridir ve 2025 yılında dünyada toplam 300 milyon diyabet hastası olacağı tahmin edilmektedir (King, Aubert & Herman, 1998). Ülkemizde ise 2.6 milyondan fazla diyabet hastasının olduğu tahmin edilmektedir (Satman, Yılmaz & Sengül, 2002). DM; kalp rahatsızlıkları, böbrek yetmezliği, damar hastalıkları, görme kaybı ve sinir sistemi hastalıkları gibi çeşitli komplikasyonlara sebep olabilen kronik bir hastalıktır (Steppan vd., 2001).

Aktif metabolik bir doku olan adipoz dokunun yalnızca lipidleri değil aynı zamanda adipokinler olarak isimlendirilen önemli proteinleri de salgıladığı geçtiğimiz son 20 yıl içerisinde keşfedilmiştir (Arner, 2005a). Keşfedilen adipokinlerden rezistin, leptin, adiponektin, interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) ve son zamanlarda tanımlanan visfatin'in insülin direnci ile bağlantılı oldukları düşünülmektedir. Proteinlerin çoğu yağ hücreleri ve adipoz doku tarafından sentezlenirken, leptin ve adiponektin yalnızca adipositler tarafından üretilmektedir. TNF-α ve IL-6 insülin duyarlılığını azaltırken adiponektin ve leptin insülin duyarlılığını arttırmaktadır. Rezistin makrofajlar tarafından sentezlenmekte ve insülin direncini arttırmaktadır (Hivert vd., 2008). TNF-α ve IL-6 inflamasyon yükseltici (proinflamatuar) sitokinlerdir; IL-6, C-reaktif protein (CRP) gibi inflamatuar proteinlerin karaciğerde sentezini kontrol eder. Leptin, makrofaj aktivasyonunu ve TNF-α oluşumunu kontrol eder. Rezistinin ise fazla yağ dokusu ile ilişkili proinflamauvar sinyalleşme üzerinde rol aldığı düşünülmektedir (Mc Ternan, Kusminski & Kumar, 2006).

Visfatin insülin ile benzer metabolik etkiye sahiptir ve viseral yağ dokusu (karaciğer, mide, bağırsaklar ve böbrekler gibi organların arasında kalan yağ dokusu) tarafından sentezlenmektedir (Fukuhara vd., 2005). Tip 2 diyabet (T2DM) hastalığında plazma visfatin seviyelerinde artış olmakla birlikte, visfatin ile insülin direnci arasındaki ilişki bugüne kadar gösterilememiştir (Chen vd., 2006; Hammarstedt vd., 2006; Arner, 2006). Visfatin, birçok patalojik süreçte rol alan inflamatuar bir medyatör olarak da değerlendirilmektedir (Moschen vd., 2007).

Bu tez çalışmasında, visfatinin kantitatif miktar tayinin biyosensör aracılığı ile tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında visfatin tayinine yönelik elektrokimyasal impedans temelli bir immünosensör tasarımına rastlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında literatürde bildirilmemiş impidimetrik bir immünosensör ilk kez tasarlanmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus; pankreas insülin salgı mekanizmasının, doğrudan ya da dolaylı olarak yetersizliği veya insülin direnci, insülin eksikliği ya da her ikisinin birlikteliği sonucu gelişen, kan şekeri yüksekliği (hiperglisemi) ve glukagon yüksekliği ile karakterizedir. Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik dejeneratif ve akut metabolik komplikasyonlara sebep olan bir hastalıktır (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

Dünya genelinde hızla artmakta olan DM (halk arasında şeker hastalığı olarak bilinmektedir), önemli bir halk sağlığı problemidir. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 2019 yılı verilerine göre 20-79 yaş arası yetişkinlerin %9,33'ü diyabet hastasıdır. IDF, 2019'da 463 milyon olan diyabetli hasta sayısının 2030'da 578 milyon ve 2045'te 700 milyon olacağını tahmin etmektedir. (IDF Diabetes Atlas, 2019). Bu artışın başlıca sebepleri nüfusun hızlı artışı, kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişiklikleri ve yaşlanma sonucu fiziksel aktivitenin azalmasıdır. Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP-I) çalışması verilerine göre, 1997-1998 yıllarında tip-2 diyabet prevalansı %7.2 iken, 2010 yılında yapılan TURDEP-II çalışması verilerine göre 20 yaş ve üzeri nüfus incelendiğinde tip-2 diyabet prevalansı %13.2'ye yükseldiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre yaklaşık 6,5 milyon kişi tip-2 diyabet hastasıdır fakat bunların sadece %54'ünün diyabet tanısı mevcuttur ve geriye kalan %46'nın ise (yaklaşık 3 milyon kişi) hastalığının farkında olmadığı tespit edilmiştir. TURDEP-I ve TURDEP-II çalışmalarının

sonuçlarına bakıldığında 1998 yılından 2010 yılına Türkiye'de DM hastalığı %90 artmıştır. (Satman vd., 2002; Satman vd., 2013).

PURE (The Prospective Urban Rural Epidemiology)-Türkiye 2018 çalışmasına göre ise Türkiye'de 2015 yılı için DM prevalansı %21'e yükselmiştir (Oğuz, Çaklılı & Çalık, 2018).

Dünyada 5.1 milyon insanın 2013 yılında diyabet ve diyabet komplikasyonları sebebi ile hayatını kaybettiği ve bu ölümlerin yaklaşık yarısı 60 yaşın altındaki insanlarda olduğu tespit edilmiştir. Az gelişmiş ülkelerde bu oran %75'e kadar yükselmektedir (IDF Diabetes Atlas, 2013).

Çizelge 2. 1. Diyabetin en çok görüldüğü ülkeler (Türker & Süzmeçelik, 2010)

2000		**2030**	
ÜLKELER	**DİYABETLİ HASTA SAYISI (MİLYON)**	**ÜLKELER**	**DİYABETLİ HASTA SAYISI (MİLYON)**
1. Hindistan	31.7	1. Hindistan	79.4
2. Çin	20.8	2. Çin	42.3
3. ABD	17.7	3. ABD	30.3
4. Endonezya	8.4	4. Endonezya	21.3
5. Japonya	6.8	5. Japonya	13.9
6. Pakistan	5.2	6. Pakistan	11.3
7. Rusya	4.6	7. Rusya	11.1
8. Brezilya	4.6	8. Brezilya	8.9
9. İtalya	4.3	9. İtalya	7.8
10. Bangladeş	3.2	10. Bangladeş	6.7

Kontrolsüz diyabet, hiperglisemiye yol açar ve zamanla vücudun bütün sistemlerini etkileyen (kalp-damar sistemi, göz, böbrek ve sinir sistemi) çeşitli komplikasyonlarına sebep olur. Diyabetli hastalarda diyabeti olmayan hastalara oranla daha fazla enfeksiyon gelişme riski mevcuttur. Aynı şekilde kardiyovasküler hastalıkların da diyabetli hastalarda diyabeti olmayan insanlara göre 2-8 kat daha fazla görüldüğü bilinmektedir (Marks & Raskin, 2000; Grundy vd., 2002).

Dünyada böbrek yetmezliğinin ve travma dışı amputasyonların en yaygın sebebi diyabettir. Diyabetli hastaların normal insanlara göre amputasyon riski 25 kat daha fazladır. Gelişmiş ülkelerde görme kaybı ve körlük sebeplerinden biri diyabettir. Diyabetin gelişebilecek komplikasyonlarını olabildiğince erken dönemde tespit etmek ve hem kişiye hem de topluma olan yükünü azaltmak için uygun şekilde tedavi edilmesi şarttır (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

2.1.1. Diyabet Türleri

Diyabet; tip 1, tip 2, gebelik diyabeti ve spesifik nedenlere bağlı diyabet olmak üzere dört grupta incelenir. Diyabetli hastaların çoğunluğu tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalardır. Diyabet tanısı Çizelge 2.2'de gösterilen semptomlara göre konulur. Tanıda asıl önemli olan daha az görülen semptomların varlığıdır (Dinççağ, 2011).

Çizelge 2. 2. Diyabet Semptomları (Dinççağ, 2011)

KLASİK BELİRTİLER	NADİR GÖRÜLEN BELİRTİLER
Çabuk yorulma, halsizlik	Bulanık görme
Polidipsi	Açıklanamayan kilo kaybı
İştahsızlık ya da Polifaji	İnatçı enfeksiyonlar
Poliüri	Tekrarlayan mantar enfeksiyonları
Ağız kuruluğu	
Noktüri	

2.1.1.1. Tip 1 Diyabet

T1DM, pankreasın β hücrelerinin otoimmün hasarı sonucu oluşan ve buna bağlı olarak kan glukoz seviyesinin aşırı yükselmesi ile kronikleşen hiperglisemi şeklinde seyreden bir hastalıktır (Horton & Subauste, 2016). Tolerans kaybına bağlı olarak pankreasın insülin üreten hücrelerini bağışıklık sitemi yok eder (Gümüş & Buduneli, 2013). Genellikle çocuklarda ve gençlerde görülmektedir. Geçmişte 'juvenil diyabet', 'insüline bağlı diyabet', 'çocukluk çağında başlayan diyabet' olarak da isimlendirilmiştir. Tip 1 diyabetli hastaların yaşamları süresince insülin enjeksiyonlarını kullanmaları gerekmektedir.

İnsülin; glukozun hücre içerisine girerek metabolizmasını sağlayan hormondur ve pankreasın Langerhans adacıklarında bulunan beta hücrelerinden salgılanır (Katsarou vd, 2017). İnsülin eksikliğinde ise diyabet ortaya çıkar. İmmün sistemdeki makrofajların, T ve B lenfositlerin β hücrelerinde harabiyete yol açarak tip 1 diyabet hastalığı oluşumda rol aldığı bilinmektedir (Hassan vd., 2012).

İmmün hasarın belirteçleri olarak tip 1 diyabette plazmada adacık hücre antikorları (İslet cell cytoplasmic antibody, ICA), glutamik asit dekarboksilaz (GAD) antikorları, insülin otoantikorları (insülin autoantibody, IAA), tirozin fosfotaza karşı

otoantikorlar (islet associated-2, IA-2) ve anti-fogrin (islet associated-2 beta, IA-2 beta) antikorları bulunabilir (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

T1DM hastalığında genetik faktörlerin yanı sıra henüz net olarak bilinmeyen birçok çevresel faktörün de etkili olduğu düşünülmektedir (ISPAD, 2000).

Tip 1 diyabette yalnız insülin eksikliği olduğundan bu hastalığın tedavisinin amacı dışarıdan verilen insülin takviyesiyle telafi edilmesidir. İnsülin takviyesi sonucu öldürücü olarak kabul edilen hastalıklar arasında görülen tip 1 diyabet kronik hastalıklar grubuna dahil olmuştur. Tip 1 diyabet hastaları yakından takip, sağlıklı diyet ve düzenli egzersiz programı ve günlük insülin takviyeleri ile normal bir hayat sürebilirler (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

2.1.1.2. Tip 2 Diyabet

Organizmada ortaya çıkan insülin direncine göre gelişen diyabet türü tip 2 diyabettir (DeFronzo vd., 2015). İnsülin reseptörleri hücre membranlarında bulunur ve hücrelerdeki insülin cevabı bu reseptörler aracılığı ile olur. İnsülin reseptörlerinde insüline karşı duyarlılığın azalması sonucu plazmada insülin artışını meydana getirir. Bu diyabet türünde insan vücudu insülini etkili kullanamadığı için kanda glukoz miktarında artış olur (Feero vd., 2010).

Tüm diyabet türlerine kıyasla %90'dan fazla görülen tip 2 diyabet erişkinlerde görülen diyabet türüdür. Geçmiş dönemlerde 'erişkin diyabet' ya da 'insüline bağımlı olmayan diyabet' olarak da isimlendirilmiştir (DeFronzo vd., 2015; Sullivan, Morrato, Ghushchyan, Wyatt & Hill, 2005).

Tip 2 diyabet türünde insülin hormonunun salgılanmasında, sentezlenmesinde ya da depolanmasında bir bozukluk yoktur ancak perifer dokularda bulunan insüline karşı bir direnç söz konusudur. Açlık ya da tokluk sonrası hiperglisemi oluşması β hücre sekresyonunu uyarmakta ve bu sebeple de insülin salınımı artmaktadır. Bunun sonucunda ise insülinin reseptörlerine bağlanması 'down regülasyon' denilen reseptör sayısında azalma meydana getirir ve insülinin etkilerini bozarak daha şiddetli insülin direncine sebep olur (American Diabetes Association, 2017). Ortaya çıkan insülin direnci reseptör

sayısındaki azalmadan değil insülinin reseptörlerine olan duyarsızlığından kaynaklanmaktadır (Li vd., 2004).

İnsülin reseptörüne bağlanan insülin, reseptörlerin üzerindeki tirozin kalıntılarının otofosforilasyonunu teşvik eder. Metabolizmanın hormonal kontrolü için gerekli olan IRS1 ve IRS2 olarak bilinen insülin reseptörü substrat proteinleri, insülin reseptör tirozin kinazın anahtar hedefleridir. IRS'nin serin ve treonin aminoasit kalıntılarının fosforilasyonu aracığıyla insülin sinyalinde bozukluklar olduğunu bazı hücre bazlı çalışmalar göstermektedir ki bu durum diyabetik insülin direncine katkıda bulunur (Copps & White, 2012).

Toplumda fiziksel inaktivite ve obeziteye bağlı olarak tip 2 diyabet çok daha yaygın olarak görülmektedir. Hastalığa genetik olarak yatkın kişiler incelendiğinde, yaşam şekli ile tetiklenmiş ve zamanla artan insülin direnci eklenmekte sonrasında da gittikçe azalan insülin salınımı görülmektedir. Normal şartlarda tip 2 diyabet 40'lı yaşlardan sonra ortaya çıkmaktadır fakat son yıllarda yaşam tarzındaki değişiklikler ve obezite sebebi ile gençlerde ve hatta çocuklarda da tip 2 diyabet hastalığı artmıştır (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

Aşağıdaki risk faktörlerinden bir ya da birkaçını bulunduran 40 yaş ve üzeri bireyler diyabet hastalığı açısından riskli kabul edilir (American Diabetes Association, 2014).

- Birinci derece yakınlarında diyabet hastalığı olan kişiler
- Fiziksel inaktiviteye sahip bireyler
- Gizli şekeri (prediyabet) olan kişiler
- Tansiyon yüksekliği (hipertansiyon)
- HDL kolesterol <40 mg/dL ve trigliserid >250 mg/dL
- Kardiyovasküler hastalıklar
- Obez ya da fazla kilolu bireyler
- Prematüre olarak doğmuş kişiler
- Kadınlarda polikistik over sendromu (PCOS)
- GDM geçmişi olan ya da iri bebek doğumu yapmış kadınlar
- Organ (özellikle böbrek) nakli yapılmış olan kişiler

Hiperglisemi (kan şekeri yüksekliği), oldukça ağır geliştiği için klasik diyabet semptomlarından olmasına rağmen fark edilmesi zaman alabilir. Diyabet tanısı konulmamış kişilerde bile hiperglisemi mevcut ise komplikasyon gelişimi açısından riskli gruba dahil olurlar. Tip 2 diyabeti olan hastalarda insülin düzeyleri normal hatta yüksek görünse bile çoğu zaman mevcut olan insülin kan glukoz seviyelerini düşürecek etkinliğe sahip değildir. İnsülin direnci diyet ve/veya hipergliseminin ilaçlı tedavisi ile iyileşebilir (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

Tip 2 diyabet ile tip 1 diyabet kıyaslandığında, tip 2 diyabeti olan hastalarda genellikle tanı konulduktan sonraki ilk yıllarda ve yaşamlarının büyük bir çoğunluğunda dışarıdan insülin takviyesi ihtiyacı görülmez. Genellikle çoğu hasta sağlıklı beslenme, oral anti-diyabetik ilaçlar (OAD) ve fiziksel aktivite yardımıyla hiperglisemi etkisini azaltabilirler. Hastalığın ileriki zamanlarında kan glukoz düzeyi kontrol altına alınamadığında dışarıdan insülin takviyesi kullanılması gerekebilir (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

2.1.1.3. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

Diğer diyabet türlerinin haricinde bazı özel durumlardan ve nadir hastalıklardan kaynaklanan diyabet türüdür. β hücre fonksiyonlarının bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan ilaç kullanımı sonrası oluşan diyabet, pankreas hastalıkları sonucu ortaya çıkan diyabet, enfeksiyonlar, gençlerin erişkinlik öncesi diyabeti, endokrin hastalıkları, genetik bazı sendromlar (Turner sendromu, Down sendromu gibi), immun kaynaklı bazı diyabet formlarıdır (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

2.1.1.4. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (Gebelik Diyabeti)

Gestasyonel diyabet (GDM), ilk defa gebelikte ortaya çıkan glukoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır (Blumer vd., 2013). GDM, gebeliklerin ortalama olarak %7'sinde görülmektedir. Popülasyona ve uygulanan tanı yöntemlerine bağlı olarak bu oran %1 ila %22 arasındadır (American Diabetes Association, 2014).

GDM, plasenta hormonlarının 24. haftadan sonra insülin etkilerini yok etmesi (insülin direnci gelişmesi) sebebi ile gelişir. GDM tanısı konulmuş olan hastaların çoğunda doğum sonrasında glukoz metabolizması düzelir fakat sonraki gebelikte tekrar nüks etme riski yüksektir (%50), ayrıca hastanın ileriki yaşamlarında T2DM gelişme risk oranı da %70-80'e kadar çıkmaktadır (Kim, Newton & Knopp, 2002). Bu yüzden GDM tanısı konulmuş olan hastaların doğum sonrasında diyabetleri iyileşerek plazma glukoz seviyeleri normale dönse bile prediyabetik olarak kabul edilirler ve de diyabet hastalığından korunma programına dahil olmaları gerekir (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).

Gebelikten önce diyabet hastası olan kişilerde ve gebelikte ortaya çıkan plazma glukoz regülasyonundaki bozuklukları olan kişilerde hem kendisi hem de bebek için olumsuz sonuçlara sebep olabilir. GDM hastalığı olan kişilerde erken doğum yapma riski artar. Yenidoğanlarda ise sarılık, neonatal hipoglisemi, polisitemi ve ölü doğuma sebep olabilir (Blumer vd., 2013). Çizelge 2.3'de özet olarak tüm diyabet türleri gösterilmiştir.

Çizelge 2. 3. Diyabette etyolojik sınıflandırma (Dinççağ, 2011)

I. Tip 1 Diyabet

Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β hücre yıkımı
A. İmmün aracılıklı B.İdiyopatik

II. Tip 2 Diyabet

İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir

III. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri

A. β- hücre fonksiyonlarının genetik defektifi (monogenik diyabet formları)

- 20. kromozom, HNF-4α (MODY1)
- 7. kromozom, glukokinaz (MODY2)
- 12. kromozom, HNF-1α (MODY3)
- 13. kromozom, IPF-1 (MODY4)
- 17. kromozom, HNF-1β (MODY5)
- 2. kromozom, NeuroD1 (MODY6)
- 2. kromozom, KLF1 (MODY7)
- 9. kromozom, CEL (MODY8)
- 7. kromozom, PAX4 (MODY9)
- 11. kromozom, INS (MODY10)
- Mitokondriyal DNA
- 11. kromozom, neonatal diyabet (Kir6.2, ABCC8, KCN]11 mutasyonu)
- Diğerleri

B. İnsülin etkisindeki genetik defektler

Tip A insülin direnci, Leprechaunism, Rabson-Mendenhall sendromu, Lipoatrofik diyabet vd.

C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları

Fibrokalkülöz pankreatopati, hemokromatöz, kistik fibrozis, pankreatit, travma/pankreatektomi, neoplazi

D. Endokrinopatiler

Akromegali, aldosteronoma, Cushing sendromu, feokromositoma, glukagonoma, hipertiroidi, somatostatinoma

E. İlaç ve kimyasal ajanlar

Atipik antipsikotikler, antiviral ilaçlar (HIV tedavisi), β-adrenerjik agonistler, diazoksid, fenitoin, glukokortikoidler, α-interferon, nikotinik asit, pentamidin, proteaz inhibitörleri, tiyazidler, tiroid hormonu, Vacor, diğerleri (posttransplant diyabet)

F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları

Stiff-man sendromu, antiinsülin reseptör antikorları

G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar

Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Wolfram (DIDMOAD) sendromu, Friedreich tipi ataksi, Huntington korea, Laurence-Moon-Biedl sendromu, miyotonik distrofi, Porfiria, Prader-Willi sendromu, Alström sendromu

IV. Gestasyonel Diyabet

Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet

HNF-1α: Hepatosit nükleer faktör-1, MODY-10: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10 (maturity onset diabetes of the young 1-10), HNF-4α: Hepatosit nükleer faktör-4α, IPF: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1β: Hepatosit nükleer faktör-1β, NeuroD1: Nörojenik diferansiyasyon 1, DNA: Deoksi-ribonükleik asit, HIV: İnsan immünyetmezlik virüsü, DIDMOAD sendromu: Diabetes insipidus, diabetes Mellitus, optik atrofi ve sağırlık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu), KLF-11: Kruppel-like factor-11, CEL: Carboxyl esterlipase (bile-saly dependent lipase), Paired box4, ABCC8: ATP-binding cassette C8, KCN]11: Potassium inwardly-rectifying channel]11, INS: İnsülin.

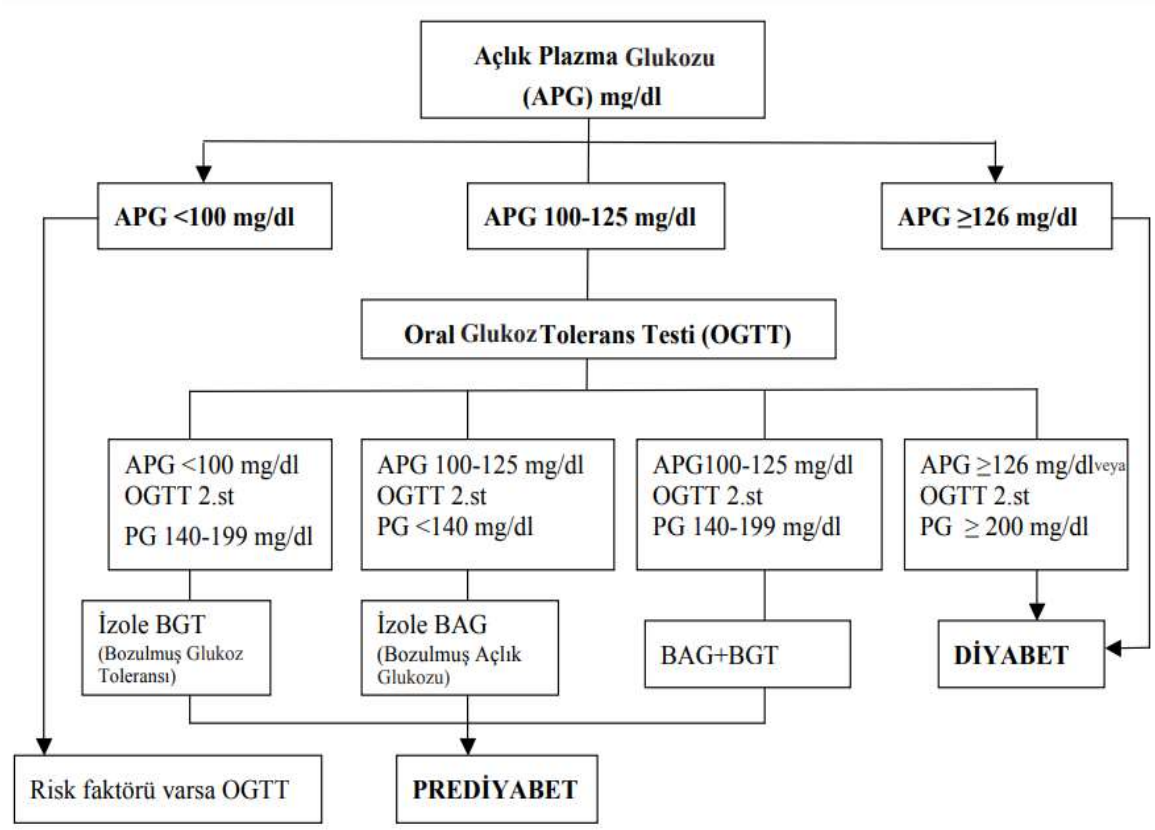
2.1.2. Diyabet Tanısı

Diyabet tanısı; glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c), açlık plazma glukozu (APG), oral glukoz tolerans testi (OGTT) ve rastlantısal plazma glukozu ölçümleri ile tespit edilir. Yalnızca tek bir test sonucuna göre tanı koymak doğru değildir. Aynı test birden fazla kez tekrarlanmalı ya da başka bir testle doğrulanmalıdır. T1DM için rutin taramaya gerek yoktur (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020). Diyabet tanı yöntemleri Çizelge 2.4'te özetlenmiştir ve bu kriterlerden birinin sağlanması diyabet tanısı için yeterlidir.

Çizelge 2. 4. Diyabet tanı kriterleri (TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi, 2019)

Açlık Plazma Glukozu	≥ 126 mg/dl
Rastgele Plazma Glukozu + diyabet semptomları	≥ 200 mg/dl
2 saatlik plazma glukozu OGTT	≥ 200 mg/dl
HbA1c	≥ % 6.5

- **APG ölçümü:** Gece boyu açlığı (en az 8 saat) takiben ölçülen plazma glukoz oranının 126 mg/dL ve/veya üzerinde olması sonucu diyabet teşhisi konulur. Bu test diğer testlere kıyasla pahalı olmayan ve en fazla kabul gören testtir.
- **Rastgele plazma glukoz ölçümü**: Diyabet semptomları (polidipsi, poliüri) görülen hastanın rastgele bir zamanda plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dL ve/veya üzerinde olması diyabet tanısını doğrular.
- **OGTT:** Diyabet riski taşıyan kişilerde OGTT yapılması prediyabet ve diyabet teşhisi için önemlidir. Bu test için 75 g glukoz içeren sıvı hastaya verildikten 2 saat sonra plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dL ve/veya üzerinde olması diyabet tanısı için yeterlidir (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).
- **HbA1c:** Son zamanlarda standart hale gelmiş olan HbA1c ölçümü de diyabet tanı testleri arasına girmiştir (Van Marken Lichtenbelt, vd., 2009). Bu testte HbA1c ≥ %6.5 (48 mmol/mol) olduğunda diyabet tanısı konulmaktadır. Bu testin açlık gerektirmemesi, stres ve akut hastalık gibi değişken durumlardan etkilenmemesi sebebi ile daha avantajlı görünmesine karşın plazma glukoz ölçümü kadar yaygın olmaması, diğer testlere kıyasla daha pahalı olması, bazı tayin yöntemleri ile kan kaybı olması, anemi, hemoliz gibi sebeplerden etkilenmesi gibi birtakım dezavantajları da vardır (Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020).



Şekil 2.1. Diyabetin tanı algoritması (TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2019)

2.1.3. İnsülin Direnci ve Metabolik Sendrom

İnsülin direnci; hücre reseptörlerindeki insülin duyarlılığının azalmasına bağlı olarak mevcut olan insülinin uygun dokularda kullanımında sıkıntılar oluşması sebebi ile glukozun hücre içerisine alınıp enerji olarak kullanılamaması sonucu özellikle başta kas, yağ dokusu ve karaciğer gibi dokularda insülin eksikliği meydana gelmesi ile karakterize edilmiştir. Pankreas da plazma glukoz seviyesine cevap olarak yeterli miktarda insülin hormonu salgılayamaz. İnsülin direnci T2DM öncesinde başlar ve yıllarca sürmesine karşın insülin salınımı ciddi oranda azaldığında diyabetin daha ileriki dönemlerinde ve başka hastalıklar ile komplike bir durum oluştuğu zaman ön plana çıkmaktadır (Roden, Petersen & Shulman, 2017).

T2DM gelişimi için önemli belirteç olarak insülin direnci kabul edilmekte ve yaş arttıkça ya da kilo alımı ile daha ciddi seviyelerde olmaktadır (Sigal vd., 1997). İnsülinin muhtemel gen ifadesini bozan hiperglisemi pankreas β hücrelerinin üzerinde toksik etki

yaratarak durumun daha da ilerlemesine sebep olur. İnsülin direncinin gelişmesinde adipositlerden salınan adiponektin, rezistin, leptin ve TNF-α gibi adipokinlerin de sebep olduğu bilinmektedir (Moran vd., 1997).

Kötü kolesterol olarak bilinen düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) yüksekliği, iyi kolesterol olarak bilinen yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) düşüklüğü ve hipertansiyon genellikle T2DM'ye eşlik eder ve bu durum kardiyovasküler hastalıklara sebebiyet verebilir. Hiperinsülinemi, insülin direnci sonucu ortaya çıkar ve bu anormal durumların oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Tabák vd., 2009).

Ayrıca insülin direnci; obezite ve dislipidemi (trigliserit ve LDL artışı) ile de ortaya çıkabilir. Metabolik anormalliklerin biri ya da birden fazlasının oluşması hastalığın klinik olarak teşhisinden önce mevcut olmakla birlikte bunlarla beraber insülin direncinin de oluşması 'metabolik sendrom' olarak isimlendirilir (Baez-Duarte vd., 2010).

Metabolik sendrom (MetS); insülin direnci ile başlayan ve bununla beraber abdominal obezite, glukoz intoleransı ya da diyabet, bozulmuş glukoz metabolizması, koroner hastalıklar ve hipertansiyon gibi önemli risk faktörlerini içeren bir endokrin hastalıktır (NCEP, 2002). MetS, dünyada oldukça yaygın olan bir hastalıktır ve yetişkin nüfusunun yaklaşık %20-25'inde görülür. Bireylerde konforlu yaşam beklentisi, hareketsiz yaşam, kötü beslenme alışkanlıkları ve obezite sebebi ile bu oran gün geçtikçe artmaktadır (Aydın vd., 2014).

2.1.4. Obezite ve Tip 2 Diyabet İlişkisi

Dünya genelinde T2DM hastalığının artması ile obezite prevalansının paralel olarak artması bu iki hastalığın arasında yakın bir ilişki bulunduğunu göstermektedir. Beden kütle indeksleri (BKİ) 35 kg/m^2 üzerinde ve obez olan kişilerde diyabet hastalığı görülme riski oldukça fazladır. Obezite insülin direncine sebebiyet vererek T2DM hastalığı oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Grundy, 2000; Sullivan vd., 2005; Leung, Carlsson, Colditz & Chang, 2017).

Alınan enerji ile harcanan enerjinin dengesizliği sonucu obezite meydana gelir. Bu enerji dengesizliğinin arkasındaki sebepler çevresel, biyokimyasal, psikolojik ve nörolojik faktörlerdir. Çeşitli biyomoleküller tarafından alınan ve harcanan enerji dengesi

regüle edilir. Enerji sarfı, iştah ve de vücut ağırlığının dengesinde bazı hormonlar (leptin, insülin, nöropeptit Y, kolesistokinin, grelin) işlev görmektedir. Bu hormonlar açlık ve tokluk durumunu kontrol eder. Obez kişilerde adipoz dokudan da esterleşmemiş yağ asitleri, hormonlar, gliserol, proinflamatuar sitokinler gibi insülin direncinin meydana gelmesi ile ilişkili çeşitli faktörler mevcuttur. Normal miktarda yağ asitlerinin salgılanması insan sağlığı için yararlı olmasına karşın bu miktarın aşılması genellikle insülin direnci, β hücrelerinden insülin salınımında bozulma ve hipertrigliseridemi gibi durumlar meydana getirir. İnsülin salgılanması ve insülin direncinden sorumlu pankreas β hücrelerinin görev bozukluğu sebebi ile plazma glukoz seviyesinin kontrolü sağlanamamaktadır. β hücrelerinin anormal çalışması T2DM oluşumunda kritik bir role sahiptir. Bu sebeple obezitenin, insülin direnci ve T2DM hastalığının ortaya çıkması ile ilişkili olduğu görülmüştür (Kahn, Hull & Utzschneider, 2006). Bu sürece metabolik sendrom da dahil olmuştur ve bu sürecin kan damarlarına etkisi olumsuz yöndedir aynı zamanda damar sertleşmesi için yüksek risk oluşturur (Baez-Duarte vd., 2010).

2.2. Adipoz Doku ve Fonksiyonları

Enerji metabolizmasında rol oynayan %95'i yağ damlacıklarıyla kaplı hücrelerden oluşan dokuya 'adipoz doku' denir. Metabolik fonksiyonların düzenlenmesinde, enerji alışverişinde görev alan adipoz doku önemli bir organdır. İnsanlarda kahverengi ve beyaz olmak üzere farklı temel fonksiyonlara sahip iki tip yağ dokusu mevcuttur. Enerji depolayan beyaz yağ dokusu (BYD) ve termojenik kontrollü kahverengi yağ dokusu (KYD) olarak adlandırılır. İnsanlardaki en büyük yağ deposu beyaz yağ dokusudur. Alınan fazla enerji vücut için gerekli olduğunda tekrar serbest yağ asidi olarak kan dolaşımına salgılamak üzere bu enerjiyi beyaz yağ dokusu trigliserit (TG) olarak depolar. Vücutta beyaz yağ dokusuna göre daha az miktarda bulunan kahverengi yağ dokusu, soğuk ve diyete uyum sağlayarak ısı üretir (Saely, Geıger & Drexel, 2010; Bonet, Oliver & Palou, 2013). Adipositlerde asetil CoA oluşumu, glikoliz yolu ile glukozdan üretilen pirüvat aracılığıyla ve β-oksidasyon sonucu yağ asitleri ile meydana gelir. Oluşan asetil gruplarının krebs döngüsünde oksitlenmesiyle beyaz yağ dokusunda oluşan enerji ATP, kahverengi yağ dokusunda oluşan enerji ise ısı olarak açığa çıkar (Medina-Gómez, 2012).

KYD, soğuk havalardan koruduğu için yenidoğanlarda ve küçük memelilerde oldukça fazladır. Yetişkinlerde KYD'nin olmadığı uzun bir süre düşünülmüştür fakat daha sonra yetişkinlerde metabolik olarak aktif KYD bulunduğunu ve de enerji dengesi açısından önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır (Cypess, 2009; Van Marken Lichtenbelt vd., 2009).

Diğer organlar ile kıyaslandığında adipoz dokunun en önemli özellikleri vücut boyunca dağılması ve oldukça dinamik bir yapıda olmasıdır. Yağ dokusunun sadece yağ depolama görevi yoktur. Hormon benzeri moleküller ve polipeptidik sitokinler salgılama yeteneğine sahiptir bu yüzden aynı zamanda endokrin doku olarak kabul edilir (Irigaray vd., 2007). Salgıladığı adipositokinler sebebi doğrultusunda yağ dokusu ve hücrelerinin metabolizma ile bağışıklık (immünite) sistemi üzerine etkisi vardır. Enerji dengesinin düzenlenmesi, besin alımı, lipid ve glukoz metabolizmaları, insülin aktivasyonu, kan basıncının düzenlenmesi gibi olaylarla metabolizma üzerine etki eder. Yağ kütlesi bazı durumlar sebebi ile arttığı zaman adipositokinlerin miktarı da artmaktadır. Bu adipositokinlerden IL-6, TNF-α ve resistin obezitede görülen insülin direnci ile doğrudan ilişkilidir (Chen, Lei & Xia, 2004). Diğer adipositokinlerden olan leptin ve adiponektin ise iskelet kaslarındaki yağ asitlerinin β-oksidasyonunu etkileyerek daha az insülin kullanılmasını sağlarlar (Wisse vd., 2004).

Adipositokinler 1990'lı yılların başında tanımlanan leptin keşfi ile ortaya çıkan bir grup adipoz doku türevi hormonlardır. Leptin keşfinden sonra adipoz doku daha geniş çaplı araştırılmaya başlanmış ve günümüze kadar 20 civarında üyesi belirlenmiştir Çizelge 2.5'te bazı önemli adipokinler ve özellikleri verilmiştir.

Adipositokinler üç farklı gruba ayrılırlar:

1) İltihaplanma (İnflamasyon) ile ilişkili adipositokinler: IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8, TGF-β

2) Akut faz reaktanları: Serum amiloid A, ASP (acylation stimulating protein)

3) İnsülin direnci ile ilişkili olan hormonlar: Adiponektin, Leptin, **Visfatin**, Rezistin, Apelin (Çamlıbel, 2014).

Çizelge 2. 5. Yağ dokusundan salınan bazı önemli adipokinlerin özellikleri (Töre & Tunçel, 2007)

ADİPOKİN	ÖZELLİKLERİ
Adipsin	Lipid metabolizması üzerine etkilidir ve YD'de trigliserit sentezini ve glukoz taşınımını arttırarak, serbest yağ asidi ile lipoliz oluşumunu ise azaltır. Karaciğerde trigliserit sentezini ve pankreasta insülin sekresyonunu arttırır.
Adiponektin	Anti-diyabetik, anti-inflamatuar, anti-fibrotik etkiler gösterir.
Leptin	İnsülin ve glukoz metabolizmasını, lipolizi, inflamatuar ve immün yanıtları, anjiyogenezi ve hematopoezisi düzenler.
Rezistin	İnflamasyon, glukoz metabolizması ve adipogenesis üzerinde etki gösterir.
Visfatin	*İnsülin mimetik etki gösterir. İnflamasyon, anti-apoptotik ve proliferasyon üzerinde etkileri vardır.*
TNF-α	Glukoz homeostazını, Adipositlerde lipid metabolizması ile enerji metabolizmasını düzenler.
İnterlökin-6	Merkezi ve perifer sinir sisteminde enerji homeostasisi üzerinde etkileri vardır.
Apelin	BYD kütlesini azaltır. Termojenezi arttırır ve insülin direncini düzenler.
Hepsidin	Demir homeostasisini düzenler.
Omentin	Obezitede insülin direnci üzerinde etkilidir.
Vaspin	Leptin ve rezistin seviyelerini azaltır.
Anjiopoietin	Lipid metabolizması ve depolanması üzerine etkileri bulunur.

2.2.1. Obezite biyobelirteçlerinin diyabet ile ilişkisi

Obezite; T2DM ve insülin direnci gibi metabolik hastalıkların gelişiminde adipoz doku ile kas dokudaki moleküllerin düzenlenmesini etkileyen ve endokrin hormon salınımında etkisi olan mekanizmaların açıklanması, bu sebeplerle oluşan hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yol gösterici olmaktadır. Sitokinler organlar arası etkileşimde rol oynarlar ve bunların metabolizmadaki seviyeleri beslenme ve fiziksel aktivite ile değişebilmektedir. Aşırı enerji alımı ve fiziksel inaktiviteye bağlı olarak vücutta yağ kütlesi birikime sebep olurken aynı zamanda düşük düzeyde kronik inflamasyon oluşumuna neden olmaktadır. Bu inflamasyona bağlı olarak ise kas doku ve adipoz dokuda sitokin salınımlarında dengesizlikler görülmektedir (Iyer, Fairlie, Prins, Hammock & Brown, 2010).

Leptin, adiponektin, visfatin ve rezistin gibi pro-inflamatuar moleküllerin tip 2 diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok metabolik bozukluklarda görülen düşük düzeyde kronik inflamasyona katkı sağladıkları belirtilmiştir (Samal vd., 1994; Gualillo, González-Juanatey & Lago, 2007).

Asprosin; profibrillin proteinin bir parçası olarak FBN1 geni tarafından kodlanan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir protein hormonudur. Asprosin aşırı yağlanma sonucu ortaya çıkar ve beyaz yağ dokusu insülin etkisini değiştirmeden glukoz metabolizmasını modüle eder ve enerji homeostazını bağımsız olarak sürdürür (Booth, Magnuson, Fouts & Foster, 2016). Obezite ve T2DM hastalığına sahip bireylerde asprosin seviyesi yüksek bulunmuştur. Asprosin fonksiyonu kaybolduğunda glukoz ve insülin düzeyleri önemli ölçüde azalır (Romere vd., 2016; Zhang, Chen, Zhou, Fu & Cheng, 2019).

Leptin; besin alımını azaltan, enerji tüketimini arttıran ve büyük oranda beyaz yağ dokusundan salgılanan bir hormondur. Leptin, ob geni tarafından kodlanan 16 kDa'luk polipeptit ürünüdür. Serum leptin seviyeleri obez bireylerde daha fazladır. Bu durum beyaz yağ dokusu kütlesindeki artışı yansıtmakla beraber, obez bireylerde görülen 'leptin direnci'ne bağlıdır. Enerji homeostazındaki rolüne ek olarak, leptinin direkt pro-inflamatuar etki gösterdiği bilinmektedir. Leptin sabahları yüksek seviyede, öğleden

sonra ise daha düşük seviyede salgılanmaktadır (Frühbeck, Jebb & Prentice 1998; Loffreda vd., 1998).

TNF-α (tümör nekroz faktörü alfa); inflamatuar ve immün yanıta temel aracılık eden sitokinlerden biridir (Fantuzzi, 2005). Obez bireylere bakıldığında serum TNF- α ile BKİ arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur. Buna benzer olarak metabolik sendromlu hastalar ile metabolik sendromu olmayan hastalar kıyaslandığında TNF-α seviyelerinin metabolik sendromu olan hastalarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Xydakis vd., 2004).

Rezistin; sistein açısından zengin bir protein ailesine ait olan adipositler tarafından salgılanan bir hormon türüdür (Arner, 2005b). İlk olarak fare adipositlerinde varlığına rastlanmış, insülin direnci olan obez farelerde rezistin salgılanmasının arttığı görülmüştür. Ancak mekanik olarak insülin bağlanması ile ilgili herhangi bir cevap alınamadığı için rezistinin obezite ve insülin direnci arasında bağlantı olduğu düşünülmüştür (Steppan vd., 2001). Günümüzdeki çalışmalara göre rezistinin pro-inflamatuar bir sitokin olduğu bildirilmiştir (Pang & Le, 2006). Buna göre rezistin de diğer adipokinler gibi doğrudan ya da inflamatuar süreçler yoluyla metabolik bozukluklara katkı sağlamaktadır (McTernan, Kusminski & Kumar, 2006). İnsanlar üzerindeki rezistin sonuçları ise çelişkilidir (Arner, 2005b). Bazı çalışmalarda rezistinin insanlarda insülin direnci ve obezite ile ilişkili olmadığı öne sürülmüş, diğer çalışmalarda ise rezistinin obezite ile ilişkili olduğu fakat insülin direnci ile ilişkili olmadığı savunulmuştur (Iqbal vd., 2005; Pagano vd., 2005).

Apelin; ilk olarak Tatemoto ve ark. tarafından yağ dokusunda tespit edilmiş daha sonra Boucher ve ark. tarafından yeni bir adipokin olarak kabul edilmiştir. Apelin ve insülin arasında hem in vivo hem de in vitro olarak yakın bir ilişki vardır (Tatemoto, 2000; Boucher vd., 2005). Yapılan araştırmalar sonucunda insanlarda plazma apelin seviyelerinin obez ve hiperinsülinemik hastalarda arttığı gösterilmiştir (Boucher vd., 2005; Daviaud vd., 2006). Ayrıca farklı gruplar üzerindeki çalışmalarda obez bireylerde, şiddetli obezitesi olmayan fakat glukoz toleransı bozulmuş ya da tip 2 diyabetli hastalarda plazma apelin düzeylerinde artış tespit edilmiştir (Heinonen vd., 2005; Li vd., 2006).

Vaspin; serin proteaz inhibitör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Abdominal obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon ile karakterize edilen tip

2 diyabetin hayvan modeli olan OLETF sıçanlarının viseral yağ dokularından izole edilmiştir. Yapılan çalışmada sıçanların aşırı kilolu ve insülinemik olduğu dönemlerinde vaspin ekspresyonu oldukça yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte kilo kaybı ile diyabetin azalması sonucu vaspin seviyeleri de düşmüştür. Benzer şekilde obez farelere vaspin verilmesi sonucu glukoz toleransı ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği görülmüştür. Leptin, TNF-alfa, rezistin, adiponektin gibi insülin direnci ile ilişkili genlerin ekspresyonunu da değiştirdiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında vaspinin obezitede viseral yağ dokusunda insülin duyarlılığını etkilediği görülmektedir (Hida vd., 2005). İnsanlar üzerinde yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise vaspinin tip 2 diyabet ve obezite ile ilişkili bir adipokin olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaya göre zayıf ve glukoz toleransı normal olan bireylerde vaspin ekspresyonuna rastlanmamış ancak tip 2 diyabetli hastalarda vaspin ekspresyonunun fazla olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak bakıldığında yapılan analizler sonucunda viseral vaspin ekspresyonunun en önemli belirleyicisinin vücut yağ yüzdesi olduğu görülmüştür (Kloting vd., 2006).

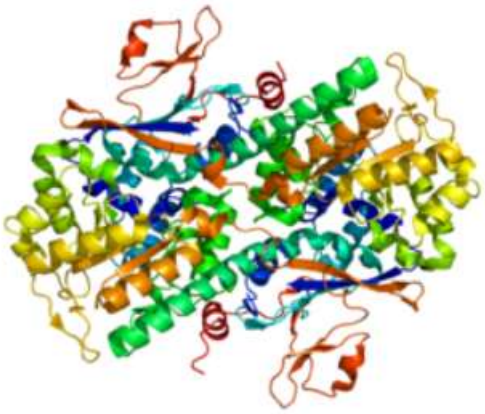
Omentin; 313 amino asitten oluşur ve fibrinojen ile ilgili bir alan içerir. İlk olarak bağırsak ve endotel hücrelerinde olduğu bilinen omentin esas olarak omental yağ dokusunda (karnın ön kısmında yer alan iç organ yağ deposu) ve yalnızca primatların subkutan dokusundan (deri altı yağ dokusu) eksprese edilen bir adipokindir. Ekspresyonundan yağ hücreleri değil stromal vasküler hücreler sorumludur. Farelerin yağ dokusundan zor eksprese edilmesine rağmen insan serumunda da varlığı tespit edilmiştir. İnsanlardaki biyolojik etkisi incelendiğinde omental ve subkutan yağ dokularının adipositlerinde glukoz emilimini destekleyerek insülin etkisini iyileştirdiği ve obezite ile ilişkili durumlarda rol oynayabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda enerji metabolizması ve vücut yağ dağılımına etkisi de gösterilmiştir. Omentin, visfatin ve adiponektin ile, rezistin, TNF-alfa ve IL-6'ya karşı insülin direncini indükleyen insülin duyarlılığı arttırıcı etkiye sahip adipokinlerdir (Li, vd., 2006; Schaffler vd., 2005; Kralisch vd., 2005b).

Adiponektin, yapısında 244 aminoasit içerir ve beyaz yağ dokusundan eksprese edilir. Glukoz ve lipid metabolizmalarında rol oynayan anti-inflamatuar adipositokindir (Thanakun, Watanabe, Thaweboon & Izumi, 2014). Adiponektin konsantrasyonu HDL kolesterol seviyeleri ile pozitif; obezite, karaciğer yağ içeriği ve BKİ ile insülin ve glukoz konsantrasyonları arasında negatif korelasyon gösterir. Diyabet hastası olan bireylerde adiponektin seviyesi düşüktür. Tüm bu ilişkiler göz önüne alındığında adiponektinin

metabolik sendrom için olası bir biyobelirteç olduğu düşünülmüştür (Brooks vd., 2006). Diğer adipokinlerin tersine adiponektin, insülin direnci olan durumlarda ve aynı zamanda obezitede serum konsantrasyonu azalmıştır. Adiponektin insülin duyarlılığını ve yağ asidi oksidasyonunu arttırır (Yamauchi vd., 2001). Aynı zamanda hepatik glukoz üretimini azaltarak insülinin karaciğerdeki etkilerini potansiyelize eder ve insülin duyarlılığını arttırır (Berg, Combs, Du, Brownlee & Scherer, 2001). Hayvan modellerinde de benzer şekilde adiponektinin hepatik insülin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (Combs vd., 2004).

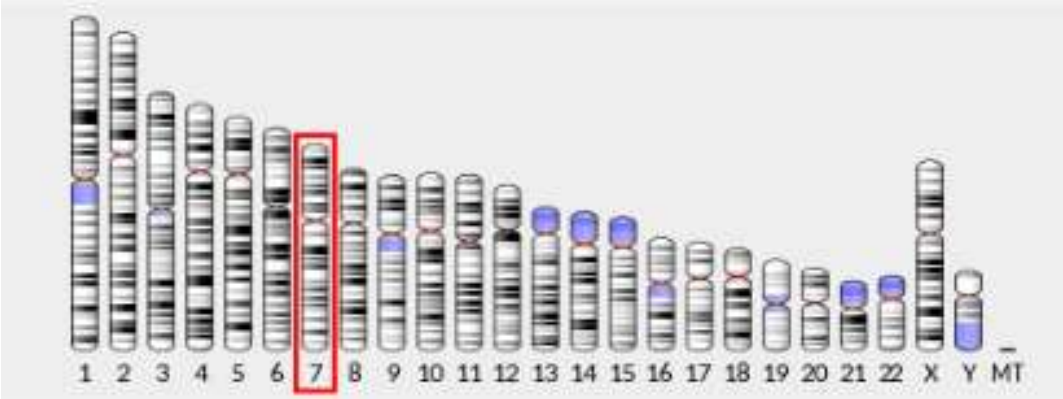
2.3. Visfatin

Samal ve çalışma arkadaşları tarafından ilk olarak 1994 yılında insan periferik kan lenfositlerindeki DNA çalışmaları sırasında visfatin fark edilmiştir. Bu çalışmalar sürdürülürken "Pre B-cell Enhancing Faktör 1 (PBEF1)" olarak adlandırılmıştır (Çamlıbel, 2014). PBEF'nin lenfositlerin olgunlaşması ve inflamatuar regülasyonundan sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Beltowski, 2006; Kim vd., 2006). Daha sonra benzer bir yapı, nikotinamid adenin dinükleotit biyosentezinde rol alan 'nikotinamid fosforibosil transferaz' (NAMPT) olarak nitelendirilmiş ve bir enzim olduğu bildirilmiştir (Sommer vd., 2008).



Şekil 2. 2. Nikotinamid fosforibosil transferaz
(https://stringfixer.com/tr/Nicotinamide_phosphoribosyltransferase 13.05.2022)

Fukuhara ve arkadaşları tarafından ise 2005 yılında adipoz doku tarafından salgılandığı belirtilen, visfatin adı ile yeni bir adiponektin tanımlanmıştır. Visfatin; 491 aminoasitten oluşan ve 52 kDa molekük ağırlığına sahip olan bir polipeptid olarak 7. kromozomun uzun kolu üzerinde kodlanır (Fukuhara vd., 2005). Viseral doku artışı ile visfatin arasında bağlantı olduğundan 'visfatin' ismi verilmiştir. Subkutan doku ile arasında bir bağlantı söz konusu değildir (Revollo, Grimm & Imai, 2007; Revollo vd., 2007; Sethi & Vidal-Puig, 2005).



Şekil 2. 3. İnsanlarda visfatin 7. kromozom üzerinde yer alır (https://stringfixer.com/tr/Nicotinamide_phosphoribosyltransferase 13.05.2022)

Visfatin ilk olarak hücrenin sitoplazma ve nükleusunda saptanmıştır. Daha sonra viseral yağ dokusu başta olmak üzere beyin, böbrek, akciğer ve dalak gibi pek çok doku ve organda, lökositlerde, epitel hücrelerde ve plazmada da bulunduğundan vücudun her yerinde olduğu söylenebilir. Bu durumun hücresel döngüde PBEF olarak bulunduğu için olduğu düşünülmektedir (Adeghate, 2008).

Visfatin ekspresyonu, IL-6, , IL-1β, lipopolisakkarit ve TNF-α gibi insülin direncine sebep olan adipositokinler ile regüle edilir (Ognjanovic, Bao & Yamamoto, 2001).

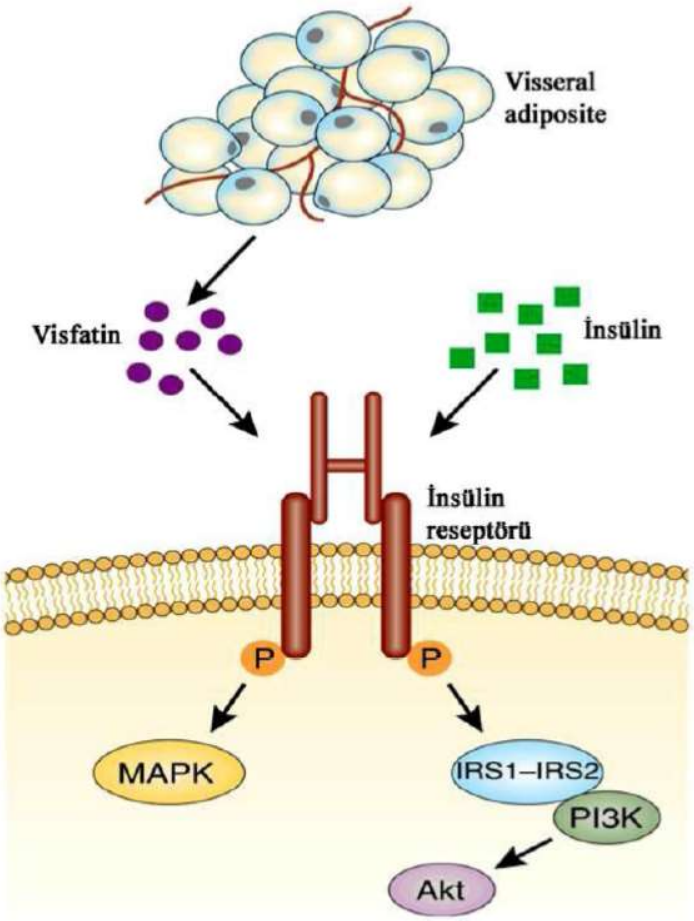
- Visfatin salınımını arttıran faktörler: Hiperglisemi, inflamasyon, antiviral tedavi, IL-1β, TNF-α ve IL-6 adipositokinleri, kronik böbrek hastalığı, gebelik, polikistik over sendromu (PCOS).
- Visfatin salınımını azaltan faktörler: İnsülin, somatostatin hormonu, monoansatüre yağ asitleri.

Bu faktörlerin yanında cinsiyet, açlık, egzersiz, yaş ve etnik yapı gibi faktörler için henüz net bir bilgi yoktur. Visfatin salınımı etküleyen faktörler Çizelge 2.6'da gösterilmiştir. (Çamlıbel, 2014).

Çizelge 2. 6. Visfatin salınımını etkileyen faktörler (Çamlıbel, 2014).

Arttıran	**Azaltan**	**Tartışmalı Etkiler**
TNF-alfa, IL-6, IL-1β	İnsülin	Yaş
Gebelik, PCOS	Somatostatin hormonu	Açlık
Antiviral tedavi	Monosature yağ asitleri	Etnik Yapı
İnflamasyon, hipoksi		Egzersiz
Kronik böbrek hastalığı		Lipopolisakkarit
Hiperglisemi		Cinsiyet

Glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde pankreas β hücrelerinde glukoz ile uyarılan insülinin salınımı etkilemede visfatin önemli bir role sahiptir (Beltowski, 2006; Kim vd., 2006). İnsülin reseptörüne insülinden uzak ve farklı bir yere visfatin bağlanır. Periferal dokulardaki glukoz tüketimini arttırıp hepatositler tarafından glukoz salınımını azaltarak hipoglisemik bir etki oluşturur (Samal vd., 1994).



Şekil 2. 4. Viseral yağ dokusundan salgılanan visfatinin insülin reseptörüne farklı bir yerden bağlanması (Murphy & Bloom, 2006).

Visfatin insülin reseptörünü in vitro olarak etkileyip insüline benzer şekilde PI3K ve MAP kinaz yolaklarını uyardığı ve insülin reseptörünün IRS1, IRS2 tirozin fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. İnsülin ve visfatinin bağlanma affiniteleri karşılaştırıldığında birbirlerine çok benzer oldukları belirlenmiştir. Visfatin, insülin reseptörlerini direkt aktive eder ve farklı olarak IGF1 (insülin benzeri büyüme faktörü 1) reseptörlerine bağlanma affinitesi insülininkinden zayıf bulunmuştur (El-Serag & Everhart, 2002). Elde edilen veriler doğrultusunda visfatinin insülinden farklı bir yolla insülin reseptörünü aktive ettiği ve insülinomimetik ektisini hem hormonal hem de parakrin yollarla gösterdiği ileri sürülmüştür. Özetle insülin ve visfatin arasında birçok ortak özellikler olduğu kanıtlanmıştır.

İnsülin plazma düzeyi tokluk ve açlık durumlarında önemli ölçüde etkilenirken fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda plazma visfatin düzeylerinde önemli düzeyde bir değişiklik görülmemesi visfatin ile insülin arasındaki önemli farklardan biridir. Beslenme durumunda plazma visfatin düzeyi insülinin %3'ü iken açlık halinde bu oran %10 civarlarına yükselmektedir. Plazmada visfatin konsantrasyonunun düşük olması sebebi ile plazma glukozu üzerine olan etkisi insülin ile kıyaslandığında daha ılımlıdır. Plazma visfatin seviyesi insanlarda metabolik sendrom, obezite, tip 2 diyabet, viseral yağ kütlesi gibi durumlarla ilişkilendirilebilir (Rabe vd. 2008; Filippatos vd. 2008).

Visfatin, endokrin, otokrin ve ayrıca parakrin çok sayıda fonksiyonu olan multiple biyolojik fonsiyonlu yapısal bir proteindir. Fonksiyonları içerisinde; nikotinamid mono ve dinükleotid biyosentezi, hipoglisemik etki ve hücre proliferasyonunun hızlandırılması vardır (Revollo vd. 2007). Ayrıca Nikotinamidden NAD biyosentezinde de rol alır (Samal vd. 1994).

Fukuhara ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada visfatinin biyolojik etkileri üzerinde durulmuştur. Bu çalışma sonucunda fareler üzerinde rekombinant visfatinin akut damar içi enjeksiyonu ile plazma glukoz düzeyini ilk 30 dakika içinde azalttığı gösterilmiştir. Kronik olarak visfatin verilmesinde ise farelerde plazma glukoz ve insülin değerleri üzerine etkisinin zayıfladığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerle visfatinin insülinomimetik (insülin benzeri) etki gösteren bir adipositokin olduğu yorumu yapılmıştır (Fukuhara vd. 2005). Obezite, insülin direnci ve bunlarla ilgili olan birçok metabolik hastalıkların patogenezinde yağ hücrelerindeki visfatin ekspresyonundan bağımsız olarak, insülinomimetik etki gösterdiği ve seçici düzenleyici bir mekanizma olarak etki edebileceği vurgulanmıştır (Kralisch vd. 2005a; Haider vd. 2006).

Visfatin ile insülin direnci testi (HOMA) arasında güçlü bir bağ vardır (Sandeep vd. 2007). Bir başka çalışmada T2DM hastalarında plazma visfatin düzeyinin APG ve 2. saat OGTT plazma glukozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. HOMA, diğer antropometrik ve metabolik parametrelerle ilişkili değildir. Üç ay içerisinde glisemik kontrol sağlandığında visfatin ve HbA1c düzeylerinin azaldığı ve HbA1c ile visfatin arasındaki ilişkinin doğru orantılı olduğu saptanmıştır (Zhu vd. 2008).

Serum visfatin düzeyi beden kütle indeksi ile bel-kalça oranı ölçümlerinde pozitif korelasyon göstermektedir (Yang, Li, Wang, Han & Wang, 2018). Obez çocuklar ile yapılan bir araştırmada, başlangıç serum visfatin düzeylerinin sağlıklı çocuklara göre daha yüksek olduğu bulunmuş olup bu çocuklarda diyet, fiziksel aktivite ve davranış değişikliği ile serum visfatin düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Martos-Moreno vd., 2011). Obez ve tip 2 diyabet hastalığı olan bireylerde 3 haftalık diyet tedavisi uygulandığında BKİ, ağırlık, trigliserit, total kolesterol, LDL seviyeleri ile serum visfatin seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur (Fioravanti vd., 2015).

Egzersizin sağlığı geliştirici ya da yaşlanmayı önleyici etkilerini (antioksidan savunma, mitokondriyogenez, makromoleküler hasar onarımı) visfatin, NAD^+ bağımlı sirtuin 1 (SIRT1) yolağını aktive ederek düzenlediği bildirilmiştir (Koltai vd., 2010). 12 hafta süre ile (60 dk/gün, 5 gün/hafta) egzersiz yapan obez bireyleri araştıran bir çalışmadaki sonuçlarda bireylerin vücut ağırlığı, viseral ve subkutan yağ doku ile plazma visfatin düzeylerinin de anlamlı bir seviyede azaldığı belirtilmiştir (Haus vd., 2009).

Visfatin ile insülin ve insülin direnci testini (HOMA) karşılaştıran bazı çalışmalarda pozitif korelasyon saptanırken (Chen vd. 2006; Tan vd. 2006) bazılarında ise dolaşımdaki visfatin ile insülin duyarlılığı belirteçleri arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır (Oki vd. 2007; Doğru, Sönmez & Taşçı, 2007). Bazı çalışmalarda açlık plazma insülin düzeyleri ile visfatin arasında ilişki olduğunu (Tan vd. 2006; Chan vd. 2006) bazı çalışmalar ise aralarında ilişki olmadığını göstermektedir (Pagano vd. 2006; Lewandowski vd. 2007; Berndt vd. 2005).

2015 yılında Kocełak ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada metabolik sendromlu kişilerde bulunan visfatin konsantrasyonu araştırılmıştır. Çalışmada plazma visfatin seviyeleri ELISA kitleri ile 0.03 ng/ml alt duyarlılık sınırı ve sırasıyla %9.1 ve %5.6'dan düşük test içi ve testler arası ortalama varyans katsayıları ile ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre metabolik sendromu olan kadın hastaların metabolik sendromu olmayan kadın hastalara göre plazma/visfatin seviyeleri (sırasıyla 1.06 ng/mL – 0.85 ng/mL) yüksek olarak bulunmuştur. Erkeklerde yapılan çalışmada ise önemli bir fark görülmemiştir. Bunun sonucunda da adipokin salınımındaki bozuklukların daha çok kadınlarda obezite hastalığına sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada visfatinin insülin benzeri etki göstermediği ve MetS'li kişilerde plazma visfatin

seviyelerinin çoğunlukla obezite ile ilişkili sistemik mikroinflamasyonun şiddetini yansıttığı belirtilmektedir (Kocełak vd. 2015).

Sonuç olarak visfatin ile yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir ve bu yüzden visfatinin fonksiyonları, etkilerinin neler olduğu ve mekanizmaları henüz net olarak bilinmemektedir. Her ne kadar visfatinin fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamış olsa da visfatinin, insülin rezistansı, inflamasyon ve adipoz doku arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Böylece visfatinin keşfi ile; lipid ve glukoz metabolizmaları, adiposit proliferasyonu ve insülin ile ilişkili konulara yeni bir bakış açısı oluşmuştur. Tüm bunlar değerlendirildiğinde visfatin ilgili metabolik rahatsızlıklar ve organların incelenmesi açısından visfatininin güvenilir ve hassas bir şekilde analiz edilmesi çok büyük bir öneme sahiptir.

2.3.1. Visfatin Ölçüm Yöntemleri

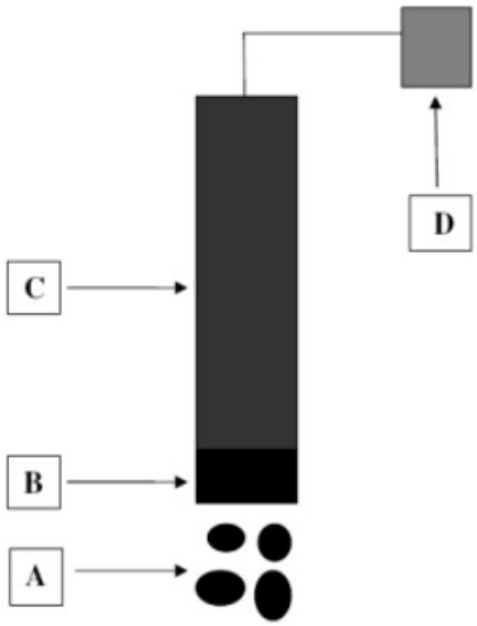
Visfatin; enzyme immunoassay (EIA), Radioimmunoassay (RIA) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri ile ölçülebilir (Körner vd. 2007; Nüsken vd. 2007). Bu üç kısıtlı yönteminde ortak önemli dezavantajları vardır. Hepsi zaman alıcı yoğun prosedürler içeren uzman personel gerektiren oldukça pahalı metotlar içerir. Son yıllarda oldukça önem kazanan pratik ve hızlı analize imkan veren immünosensörlerin kullanılmasıyla tasarlanacak olan ölçüm sistemlerinin geliştirilmesi önemli bir soruna çözüm olabilir. Visfatinin kantitatif tayinine yönelik bir immünosensör literatürde henüz tanımlanmamıştır.

2.4. Biyosensörler

Günümüzde klinik ve endüstriyel laboratuvarlar için doğru, hızlı, ucuz ve seçici analizler gerekmektedir. Elektrokimyasal biyosensörler, bu kriterleri karşılamaya yönelik en iyi yöntemler arasında görünmektedir. Biyosensörler Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) L.C. Clark tarafından 1950'lilerin ortasında yapılan bir ameliyatta kanda O_2 seviyesinin bir elektrot ile izlenmesi sonucu keşfedilmiştir (Bulut, 2011). Bu keşif sonrasında Clark ve Lyons'ın 1962 yılında glukoz oksidaz enzimi kullanarak amperometrik glukoz saptamasını ilk kez rapor etmişlerdir (Clark & Lyons, 1962). Daha

sonra biyosensörler endüstride, klinik teşhiste ve ekolojide geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Aynı zamanda, biyosensör bilimi, biyokimya ve fiziksel kimya yaklaşımlarını içeren modern analitik kimyanın bağımsız bir alanı haline gelmiştir (Karyakin, 2009). Biyosensörlerin bu kadar çok yaygınlaşması ve tercih edilmesinin nedeni minyatürleştirilebilir olmalarıdır. Böylece biyosensörler saha ve yerinde direkt analiz imkanı sunar. Seçicilik ve yüksek hassasiyet, kolaylık, hızlı işlem süresi ve maliyet etkinliği gibi hedefe yönelik çeşitli avantajları olan mevcut yaklaşımları belirlemek için biyosensörler sıklıkla tercih edilmektedir. (Sezgintürk, 2020).

IUPAC'a (International Union of Pure and Applied Chemistry) göre biyosensör tanımı, elektrokimyasal bir dönüştürücünün yanında buna temas halinde bulunan biyolojik tanıma elemanı (biyoreseptör) ile yarı-kantitatif veya spesifik kantitatif olarak analitik bilgi veren aygıt olarak tanımlanmıştır (Thévenot, Toth, Durst & Wilson, 2001). Şekil 2.5.'de biyosensörün tipik bir örneği şema olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 5. Bir biyosensörün şematik olarak tasarımı (A: Analizlenecek madde, B: Biyolojik tanıma bölgesi, C: Transdüser (dönüştürücü), D: Ölçüm sistemi) (Kökbaş, Kayrın & Tuli, 2013).

Biyoreseptörler, biyosensör sisteminin en önemli bileşenidir. Analiz edilecek maddeyi (analiti) ilk olarak fark eden biyomoleküllerdir. Bu yüzden analite duyarlı, spesifik, kararlı ve diğer moleküllerden etkilenmemeleri gerekir (Otlu, 2011). Biyoreseptör moleküller olarak; mikroorganizmalar, doku, hücre gibi canlı ve biyolojik sistemler ile enzim, protein, nükleik asitler ve antikor gibi biyolojik moleküller kullanılabilir (Scott, Jedd, Wolchok & Old 2012). Biyosensör siteminde, analit konsantrasyonu ve biyoreseptör ile orantılı fiziksel ya da kimyasal cevap sinyali elde edilir (Boz, Paylan, Kızmaz & Erkan, 2017; Sezgintürk, 2020; Thévenot, Toth, Durst, & Wilson, 2001). Herhangi bir biyomolekülün biyoreseptör olarak kullanılmasındaki tek şart, molekülün istenilen analiti spesifik olarak tanıma kapasitesine sahip olmasıdır.

Biyosensörlerde transdüser yani dönüştürücü, biyoreseptörün analiti fark ettiği sırada ürettiği fiziksel ya da kimyasal sinyali elektrik sinyaline çevirir. Burada analit ile biyoreseptör arasındaki tanıma durumu ısı salınımı, pH değişikliği, elektron akışı ve yeni bir tür oluşumu gibi birtakım dönüşümler ile gerçekleşmektedir (Boz, Paylan, Kızmaz & Erkan, 2017; Sezgintürk, 2020; Thévenot vd., 2001). Çizelge 2.7'de biyosensörü oluşturan bileşenlerin içeriklerinden bazı örnekler gösterilmektedir.

Çizelge 2. 7. Biyosensör bileşen içerikleri (Telefoncu, 2008)

ANALİT (ÖRNEK)	**BİYOBİLEŞEN (RESEPTÖR)**	**SİNYAL İLETİCİ SİSTEM (TRANSDUSER)**
Hormonlar	Reseptörler	**ELEKTROKİMYASAL ESASLI** - Amperometrik - Potansiyometrik - Yarı iletken esaslı - İmpedimetrik **OPTİK ESASLI** - Fotometri esaslı - Fluorometri esaslı - Biyolüminesans
Antijenler	Antikorlar	
Nükleik asitler	Aptamerler	
Koenzimler	Enzimler	
Mikroorganizmalar	Hücre organelleri	
Allerjenler	Lipidler	
Metaller	Mikroorganizmalar	

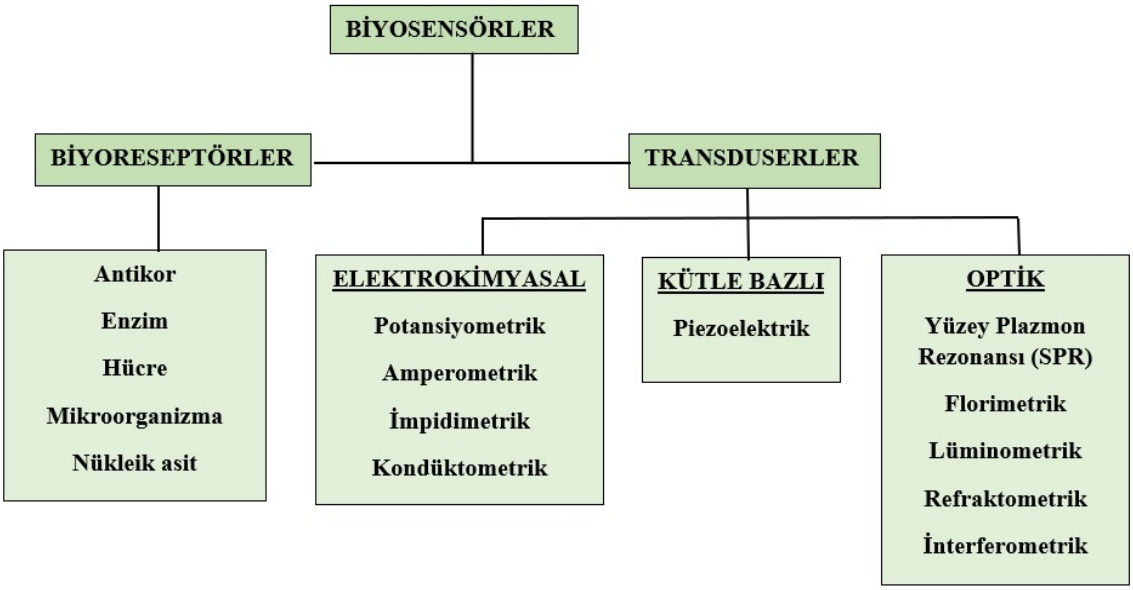
Kanser biyobelirteçleri	Antikorlar	**PİAZOELEKTRİK** - Kuartz kristal mikrobalans - Mikrokantileverlar
Metabolitler	Hücre doku kesitleri	
İnhibitörler	Enzimler	

İdeal bir biyosensörde bulunması gereken özellikler:

1) Biyoreseptör, analizin amacı için seçici özellikte olmalıdır.
2) Biyoreseptör normal saklama koşullarında değişkenlik göstermemelidir.
3) Yapılan analiz sonuçları, fiziksel etkenlerden (pH, sıcaklık, karıştırma vb.) oldukça az etkilenmelidir.
4) Biyosensör sonuçları, ilgili konsantrasyon aralığında doğru, kesin ve tekrarlanabilir olmalıdır.
5) Tasarlanan biyosensörün maliyeti düşük, minyatür, taşınabilir ve kolay kullanıma sahip özelliklerinin olması gerekir (Grieshaber, MacKenzie, Vörös, & Reimhult, 2008).

2.4.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler için çok farklı sınıflandırılma çeşitleri mevcut olsa da genel olarak Şekil 2.6'da gösterildiği şekilde biyoreseptör ve transduser kısımlarına göre sınıflandırılırlar.



Şekil 2. 6. Biyosensörlerin sınıflandırılması

2.4.2. Biyoreseptörlerin Sınıflandırılması

Biyoreseptörler, biyosensör teknolojileri için özgünlüğün anahtarıdır. Şekil 2.6'da gösterildiği gibi genellikle beş sınıfa ayrılırlar. Nükleik asitler, enzimler ve antikorlar biyosensörlerde oldukça yaygın olarak kullanılan biyoreseptörlerdendir (Velusamy, Arshak, Korostynska, Oliwa & Adley, 2010).

2.4.2.1. Antikor temelli biyosensörler

Biyosensörlerde kullanılan afinite tanıma elemanları olarak antikorlar oldukça popülerdir. Çevresel izleme, mekanik teşhis, gıda güvenliği ve klinik analizler gibi birçok uygulamada oldukça sık kullanılırlar. (Demirbakan & Sezgintürk, 2019; Justino, Rocha-Santos & Duarte, 2010). Antikorlar; monoklonal (tek bir kaynaktan hücrenin benzer klonları tarafından üretilir) ya da poliklonal (birden fazla bağışıklık hücresi tarafından üretilir) olabilir. Monoklonal antikorlar; epitop olarak isimlendirilen aynı hedef bölgeye eşit afiniteyle bağlanır aynı zamanda poliklonal antikorlara göre daha seçici davranırlar.

Poliklonal antikorlar; antijenlere farklı afinitelerle ve çeşitli bölgelerde bağlanır (Luo & Davis, 2013).

Antikorların; polikonal, monoklonal ve rekombinant olarak üç farklı şekilde olabilmeleri seçici özelliklerine ve sentezlenme şekillerine bağlı olarak değişir. Her durumda dedektör çevresi, yüzeyi ya da taşıyıcı olabilen bir substrat üzerinde immobilize edilmektedir. (Lazcka, Del Campo, & Munoz, 2007).

Alarie ve Vo-Dinh 1996 yılında Benzo[A]Piren DNA eklentisi için antikor temelli mikron altı biyosensör sistemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, antikor temelli biyosensörlerin antikor olmayan biyosensör sistemlerine göre farkları incelenmiş ve benzoapiren DNA eklentisinin bir ürünü olan benzo piren tetrol için mutlak saptama sınırı açıklanmıştır (Alarie & Vo-Dinh, 1996).

Babacan ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada ise piezoelektrik biyosensör sistemi kullanılarak antikor immobilizasyon yöntemleri değerlendirilmiştir. Anti-Salmonella antikorlarının iki farklı yöntemle immobilizasyonu ile sonuçlar karşılaştırılmıştır (Babacan, Pivarnik, Letcher & Rand, 2000).

Özcan ve Sezgintürk'ün 2021 yılında yaptıkları çalışmada grafit kağıt elektrot kullanarak impidimetrik bir biyosensör geliştirerek leptin tayinini hedeflenmişlerdir. Bu çalışma kapsamında çocukluk çağı obezitesinin erken teşhisi için biyobelirteç olan leptin tayini amaçlanmıştır. Sonuç olarak yüksek hassasiyete sahip, tayin aralığı 0.2 pg/mL- 20 pg/mL olan tekrar kullanılabilir ve uzun raf ömrüne sahip bir biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir (Özcan & Sezgintürk, 2021a).

2.4.2.2. Enzim temelli biyosensörler

Katalitik işlev gösteren protein yapısındaki biyomoleküllere enzim denilmektedir. Enzim-substrat kompleksi katalitik tepkime oluşumu esnasında ortaya çıkar ve tepkime sonundaki ürün biyosensör ile dolaylı olarak ya da doğrudan ölçülebilen sinyallerin oluşumunu gerçekleştirir. Enzim biyosensörlerinin kullanım alanları; enzim-substrat etkileşimi ile tepkimelerin oluşumu, enzimlerin yüksek spesifikliği doğrultusunda biyokatalizin %100 verimle ve oldukça hızlı gerçekleşmesi sebebi ile oldukça yaygındır. Bu alandaki ilk çalışmaların biyosensör tarihi incelendiğinde ilk olarak enzim sensörleri

ile çalışmalar gerçekleştirildiği görülmektedir. Clark ve Lyons 1962 yılında, Updike ve Hick ise 1967 yılında glukoz oksidaz enzim elektrotları ile glukoz tayinine yönelik çalışmalarını rapor etmişlerdir. Ve bu çalışmaları enzim temelli biyosensörlerin temellerini oluşturmaktadır (Özdemir & Arslan, 2014; Çolak, Yaşar, Çete, & Arslan, 2012; Akyılmaz &Yorgancı, 2008).

2.4.2.3. Nükleik asit esaslı biyosensörler

Biyoreseptör olarak nükleik asitlerin (DNA, RNA) kullanıldığı sensörler, tek zincirli DNA oligomerlerinin kullanıldığı biyosensör sistemleridir. DNA sensörlerinin oluşma prensibi; transduser yüzeyinde sabit duran tek zincirli DNA oligomeri ile belirli bir hastalık türünü, genetik bir karakteri belirleyen tek zincirli DNA parçasının hibridizasyonu ile oluşur. Bu hibridizasyon sonrasında meydana gelen çift zincirli DNA ile optik ya da elektrokimyasal sinyaller oluşarak transduser ile okunabilir hale getirilir (Dinçkaya, 1999; Budavari, 1996).

2.4.2.4. Mikroorganizma temelli biyosensörler

Biyoreseptör olarak mikroorganizmaların seçildiği biyolojik sensörler; mikroorganizmaların cevap alınacak olan analiti enzimleriyle metabolize etmesi ve bir dönüştürücü ile solunum aktivitesinin ölçülmesi, mikroorganizmalar ile elektroaktif metabolitlerin üretimi veya organik bileşiklerin asimilasyonu esasına göre çalışırlar (Turner, Karube & Wilson, 1987). Çevre analizlerinde en çok pestisit, ağır metal, organik kirleticiler yaygın olarak kullanılır. Gıda analizlerinde; lizin, glukoz, etanol, laktat, kafein ve klinik analizlerde ise; penisilin ve üre yaygın şekilde kullanılır (Su, Jia, Hou & Lei, 2011).

2.4.2.5. Canlı hücre temelli biyosensörler

Bir biyosensörde biyoreseptör olarak bakteri, maya, mantar ve doku kültürü gibi canlı organizmalar da kullanılabilir. Ölçümler canlı organizmanın genel metabolik halinin kontrolüne dayanarak yapılmaktadır (Sezgintürk, 2020).

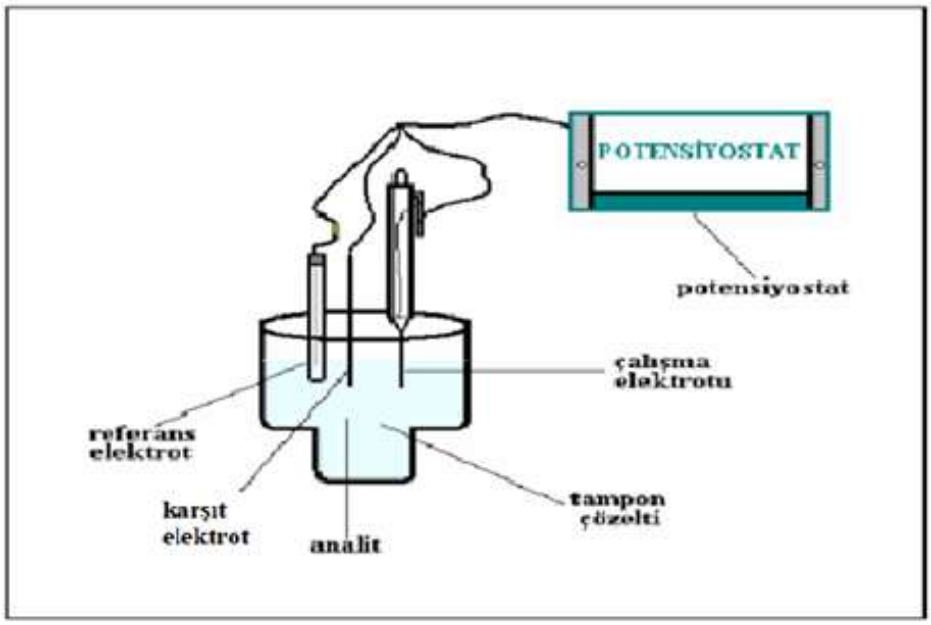
2.4.3. Transduserlerin Sınıflandırılması

Biyoreseptör ile ligand arasında oluşan biyokimyasal tanıma olayını ölçülebilir sinyale çeviren elektronik cihazlar 'transduser' (dönüştürücü) olarak isimlendirilir. Biyoreseptör ile ligand arasında meydana gelen reaksiyon sonucu; yeni bir ürün oluşumu, elektron akışı, ısı salınımı, kütle değişiklikleri ve pH değişimleri gibi kimyasal dönüşümlere sebep olur. Bu değişimleri gözlemlemek amacıyla da transdusere ihtiyaç vardır. Biyokimyasal sinyaller transduser vasıtası ile elektrik sinyallerine dönüştürülerek ölçüm sistemine gönderilir (Bahadır & Sezgintürk, 2015b). Şekil 2.6'da transdüserlerin sınıflandırılması gösterilmiştir. Biyosensörlerde sıklıkla elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik transdüserler kullanılmaktadır.

2.4.3.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Biyoreseptör ile analit arasında oluşan etkileşimi iletkenlik, potansiyel ve akım gibi elektrokimyasal sinyale dönüştüren cihazlara elektrokimyasal biyosensörler denilmektedir ve oldukça yaygın olarak kullanılmaktalardır. Potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik ve impidimetrik olmak üzere dedektör sistemleri tarafından ölçülen elektrokimyasal özelliklerine göre dört ayrı sınıfa ayrılırlar. Potansiyometrik temelli biyosensör sistemlerinde, akım geçmeyen elektrokimyasal bir hücreden referans elektrot ile çalışma elektrodu arasındaki potansiyel farkın ölçülmesi esasına dayanır. Amperometrik biyosensörler akım şiddetinin sabit bir potansiyelde ölçümü ile, kondüktometrik temelli biyosensörler biyokimyasal reaksiyonun sonrasında çözeltideki iletkenliğin ölçümünden ve impidimetrik temelli biyosensörlerde ise, elektrotun çözelti arayüzeyinde oluşan elektron transferine karşı gösterdiği direncin ölçülmesinden yararlanılmaktadır (Grieshaber, MacKenzie, Vörös & Reimhult, 2008; Dinçkaya, 1999).

Klasik olarak bilinen üçlü elektrot sistemi genellikle bir çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir de karşıt elektrottan oluşur. Elektrokimyasal biyosensör ölçüm sistemleri de bu üçlü elektrot sistemi ile yapılmaktadır (Grieshaber vd., 2008). Şekil 2.7'de üçlü elektrot sistemi gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Üçlü elektrokimyasal hücre şeması (Özcan, 2015)

I. **Çalışma Elektrodu:** Yüzey kısmında analitin indirgendiği ya da yükseltgendiği elektrot türüdür. Yapımında altın veya platin gibi inert olan bir metal, camsı karbon, karbon, indiyum oksit veya kalay oksit gibi yarı iletken maddeler kullanılır. Potansiyeli zamanla doğrusal olarak değişir. Kullanılacak elektrotlar biyosensör sistemine uyacak şekilde farklı büyüklük ve şekillerde hazırlanarak tasarımı yapılabilir.

- ✓ **Karbon elektrotlar ve türleri**

  Bu elektrotlar, geniş potansiyel aralıklarda çalışılmaya uygun olması ve ucuz olmaları sebebiyle çok fazla tercih edilirler. Karbon elektrot türleri:

  - Camsı Karbon Elektrot
  - Baskılı Karbon Elektrotlar
  - Kalem Grafit Elektrot
  - Karbon Pasta Elektrot

Camsı karbon elektrot: Fenol/formaldehit polimerlerinin 1000-3000 ^{0}C arasında, belirli bir basınç ile karbonizasyona uğratılarak malzemesi inert olan elektrot gövdesi içine sıkıştırılması ile camsı karbon elde edilir. Bu yüzeyin diğer elektrotlara göre oldukça

düzgün ve pürüzsüz olmasından dolayı ortaya çıkan elektrokimyasal yanıt daha iyi ve tekrarlanabilirdir. Geniş bir potansiyel aralığa sahiptir. Hem fiziksel olarak hem de kimyasal olarak oldukça dayanıklılardır (Özcan, 2015).

II. **Referans Elektrot:** Analiz süresince polarize olmayan ve potansiyeli sabit kalan elektrotlardır. Referans elektrot olarak SCE (doymuş kalomel elektrodu), Ag/AgCl ve Ag/Ag+ gibi elektrotlar kullanılabilir.

III. **Karşıt Elektrot:** Elektrik akımının çözelti içerisinden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. En çok tercih edilen karşıt elektrot platin tel veya civa havuzudur.

Bu çalışmada kullanılan transduser elektrokimyasal impedans esaslı olduğu için daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

2.4.3.1.1. İmpidimetrik Biyosensörler

Elektrot yüzeyinde olan biyo-tanıma olayları sonucunda oluşan elektriksel değişikliklerin izlenmesi için impidimetrik ölçümler kullanılır. Bu tür biyosensör sistemleri yük transfer direnci ve hedef moleküllerin karakterizasyonunda etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Bahadır & Sezgintürk, 2015a). Son yıllarda impedimetrik ölçümlere dayalı çok sayıda biyosensör sistemi geliştirilmiştir (Chakraborty, Tibarewala & Baruj, 2019).

2020 yılında Ognjanovic ve ark. tarafından yapılan çalışmada impedimetrik biyosensör sisteminden yararlanmıştır. Elektrot yüzeyindeki malzemelerin ve enzim immobilizasyonunun daha iyi olabilmesi ve impidimetrik glukoz biyosensörünün tasarlanması için yeni bir yaklaşım ve teknolojiden bahsedilmiştir. Bu çalışmada TiO_2 / APTES, molekülleri karboksilik grafen bazlı impedimetrik glukoz biyosensörüne çapraz bağlanmıştır (Ognjanovic vd., 2020).

Zhang ve arkadaşları tarafından 2022 yılında yapılan çalışmada farklı vücut kütle indekslerine sahip bireylerde leptin tayini için antikor immobilizasyonuna dayalı

elektrokimyasal bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Tayin aralığı 0.001-1000 pg/mL olarak (0.00087 pg/mL en düşün tayin limiti) belirtilmiştir (Zhang vd., 2022).

Özcan ve Sezgintürk'ün 2021 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada grafit kağıt elektrot kullanarak elektrokimyasal impedans temelli adiponektin tayini için yeni bir biyosensör sistemi hedeflenmişlerdir. Bu çalışma sonucunda tasarlanan biyosensör, adiponektin tayini için geniş tespit aralığına sahip 0.05–25 pg/mL ve en düşük tespit limiti 0.0033 pg/mL olan yüksek hassasiyette, uzun depolama ömrü ve tekrar kullanılabilir bir biyosensör olduğu belirtilmiştir (Özcan & Sezgintürk, 2021b).

2.4.3.1.2. Elekktrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, sistemlerin yüzey hassasiyetlerini, karmaşık elektriksel dirençlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmek için kullanılan oldukça etkili ve kullanışlı bir yöntemdir. Membran/çözelti arayüzlerinin karakterizasyonu ve optimizasyonunda, metal korozyon mekanizmalarında ve membranlar boyunca yük aktarımında oldukça sık kullanılmaktadır. Bu yöntem günümüzde biyosensörlerin tasarım aşamalarında, biyomolekül etkileşimlerinin takibinde ve bunların kantitatif analizlerinde oldukça fazla tercih edilmeye başlanmıştır (Macdonald 1987, Rubinstein 1995, Krause 2007).

Bir devreden geçen elektrik akımına karşı gösterilen direncin ismi 'impedans'tır. Bu direnç kaplamalar, arayüzler ve çözeltiler ile sağlanabilir böylece iyon akışı engellenmiş olur. Bu sebeple impedans engellenen iyon akışının ölçüsü olarak tanımlanmaktadır (Malhotra & Pandey, 2017).

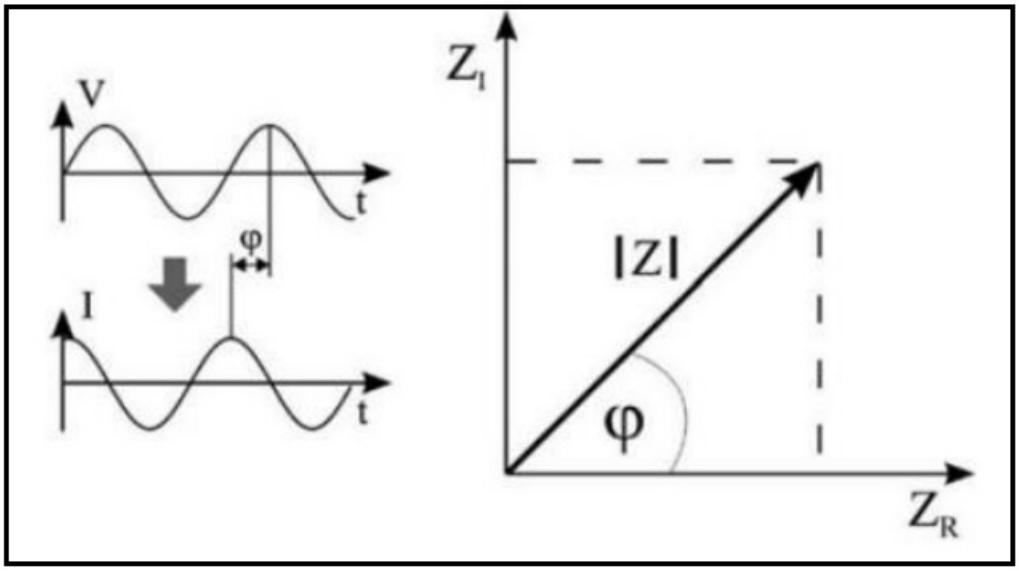
EIS tarihçesine bakıldığında ilk örnekleri 1980'lerin sonunda bildirilmesine karşın enstrümantasyon gelişmelerine bağlı olarak son yıllarda bu yöntemin tercih edilmesi ve uygulanmasında oldukça fazla bir artış söz konusudur. İmpedans teknikleri ile yalnızca analit ve biyoreseptör arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi değil biyomoleküllerin transdusere immobilizasyonu sırasında ortaya çıkan olayların ve yüzey modifikasyonunun karakterizasyonu gibi olaylar da başarıyla gerçekleştirilir. Böylece bu özellikleri sayesinde impedans yüzey modifikasyonlarının incelenmesinde oldukça önemli ve yardımcı bir araçtır (Macdonald 1987, Rubinstein 1995, Krause 2007).

Devrede bulunan herhangi bir elemanın elektrik akımına direnç göstermesi ‘elektriksel direnç’ olarak isimlendirilir. İmpedans ve direnç oldukça benzer özellik gösterirler bunlardan en önemlisi ise elektriksel akıma karşı her ikisinin de direnç göstermesiyle ölçülmüş bir değer olmalarıdır. En önemli farkları ise impedans ideal bir direncin sahip olduğu klasik özellikler ile sınırlandırılamaz (Tekin 2008).

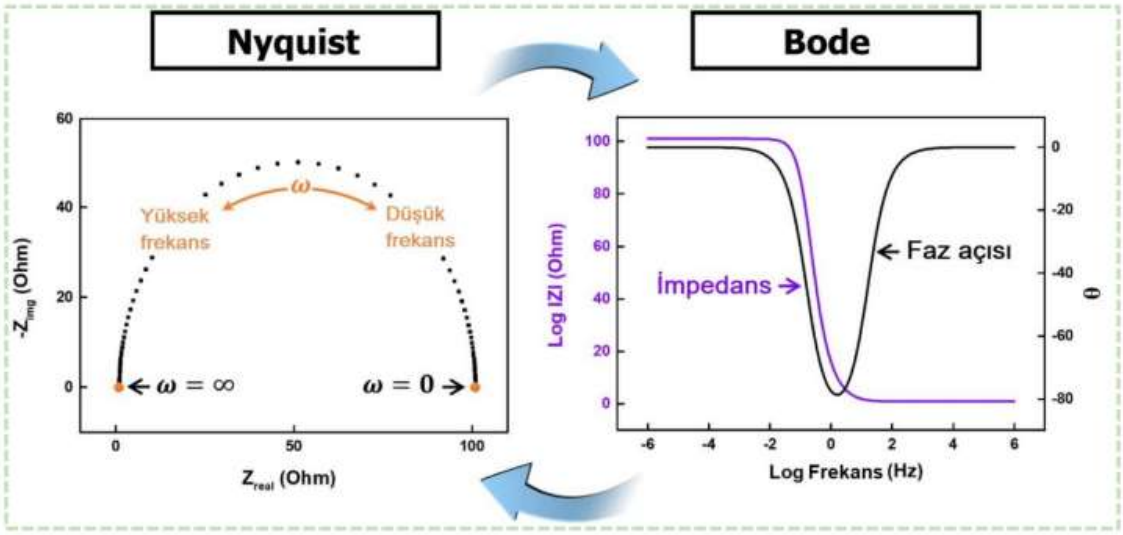
Temel olarak impedans, yüksek frekanslara maruz bırakıldığında indüktif farklılıklardan ve kapasitanstan etkilenen direncin ölçümüdür. Bir sistemin impedansı küçük genlikli bir potansiyel uygulanarak akım yanıtının belirlenmesiyle belirlenir. Böylece impedans potansiyel-zaman fonksiyonunun V(t), akım-zaman fonksiyonuna I(t) bölümü olarak tanımlanır. V_0 ve I_0 değerlerinin maksimum noktada olduğunda t; zaman, f; frekans, φ; potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kayması, Y; kompleks iletkenlik olarak gösterilir. Şekil 2.8’de impedans denklemi gösterilmiştir. Potansiyel-zaman fonksiyonuyla kıyaslandığında faz kayması da gösterdiği için impedansta akım sadece genlik açısından farklılık göstermez. Bu sebeple değer |Z| ve faz kayması φ, reel Z_R ve imgesel Z_I olmak üzere iki farklı şekilde tanımlanabilir. Bu durum şekil 2.9’da ifade edilmiştir. Böylece Bode grafiği (logf’nin fonksiyonu olarak logZ) ve Nyquist grafiği (Z_R ve Z_I) olarak iki farklı şekilde impedans ölçümlerinin sonuçları gösterilebilir. Şekil 2.10’de bu grafiklerin örnekleri verilmiştir (Sezgintürk, 2012).

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\Pi f t)}{I_0 \sin(2\Pi f t + \phi)} = \frac{1}{Y}$$

Şekil 2. 8. İmpedans denklemi (Liedberg, Nylander & Lundstrom, 1983)



Şekil 2. 9. Potansiyel-zaman ve akım-zaman büyüklüklerine bağlı bir impedansın gösterimi (Sezgintürk, 2012)



Şekil 2. 10. Nyquist ve Bode grafiklerinin gösterimi (Xiao-Zi, Song, Wang & Zhang, 2010)

İmpedans birden fazla farklı frekans tayin edebildiği için 'impedans spektroskopisi' adını alır. Birden fazla farklı frekans tayin edebilmesi sayesinde ise membranların, tabakaların ve yüzeylerin üzerinde gerçekleşen değişiklikler hakkında bilgi sahibi olunabilir. Eşdeğer devre sistemi sayesinde analizler gerçekleştirilerek bu bilgilere daha rahat ulaşılabilir. Bu devre genellikle kapasitans ve direnç oluşturarak sistemdeki farklı fizikokimyasal özellikleri de gösterebilmektedir. Elektrokinetik,

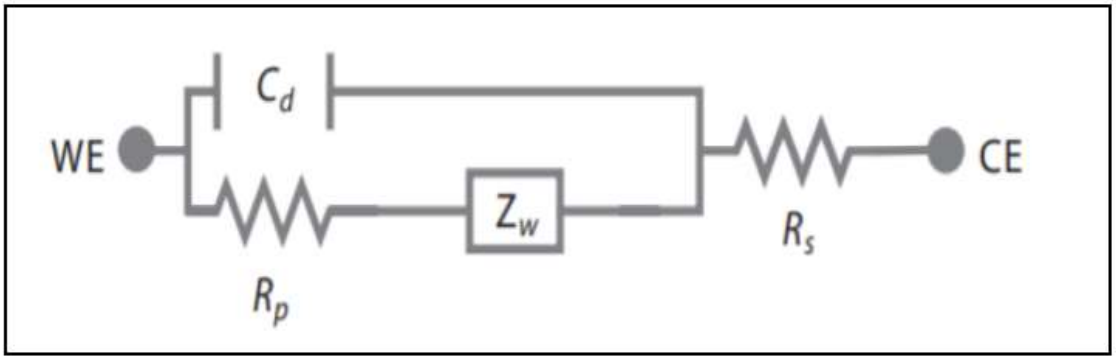
partisyon ve difüzyon gibi temel yasalardan oluşan transfer fonksiyonları temelinde de bu sistem tanımlanabilir. Böylece kapasitans ve direnç değişimleri çözeltinin bir fonksiyonu olarak tanımlanabilmekte ve konsantrasyondaki değişim ile impedans arasında bir ilişki kurulabilmektedir (Orazem & Tribollet, 2008; Macdonald,1987).

EIS'de impedans davranışını açıklamak için kapasitans, sabit faz öğesi, Warburg İmpedansı ve ohmik direnç olmak üzere dört temel ana unsur kullanılmaktadır. Bu tanımların özeti Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2. 8. İmpedans elemanlarının tanımlamaları, frekans bağımlılığı ve faz açısı (Orazem & Tribollet, 2008)

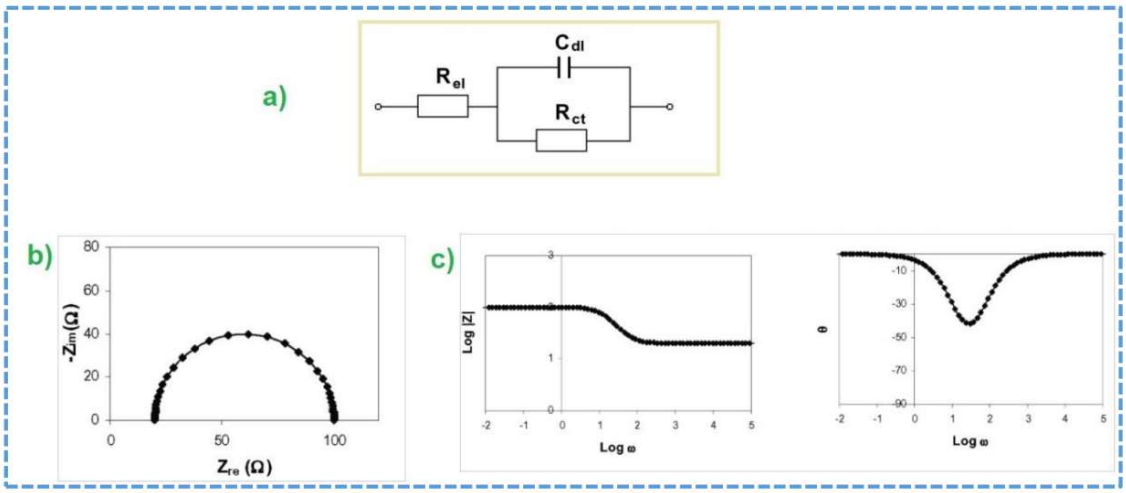
İmpedans elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans bağımlılığı
R	$Z=R$	0°	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^{\alpha}}$	0–90°	Evet
W (infinite)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$ $\sigma = \frac{RT}{n^2F^2\sqrt{2}}\left(\frac{1}{\sqrt{D_O c_O}} + \frac{1}{\sqrt{D_R c_R}}\right)$	45°	Evet

Randles eşdeğer devre modeli, bir elektrolit çözelti ile bir elektrodun birlikte olduğu sistemde yapılan EIS ölçümleri olarak tanımlanmaktadır. Şekil 2.11'de örnek olarak Randles eşdeğer devre modeli gösterilmiştir. (Chang & Park, 2010; Lisdat & Schäfer, 2008).



Şekil 2. 11. Randles eşdeğer devre modeli örneği WE: çalışma elektrodu, CE: karşıt elektrot, C_d ya da C_{dl}: çift katmanlı kapasitör, R_s: çözelti direnci, Z_w; Warburg impedansı ve R_p: polarizasyon direnci, olarak isimlendirilir. (Chang & Park, 2010)

Elektrokimyasal bir sistem için kullanılan en yaygın ve basit model Randles eşdeğer devresidir. Şekil 2.12'te Randles hücresi için Nyquist-Bode ve eşdeğer devre modellerinin tümü gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Tipik bir Randles hücresinin gösterimi a) eşdeğer bir devre, b) Nyquist grafiği ve c) Bode grafiği ((Xiao-Zi, Song, Wang & Zhang, 2010)

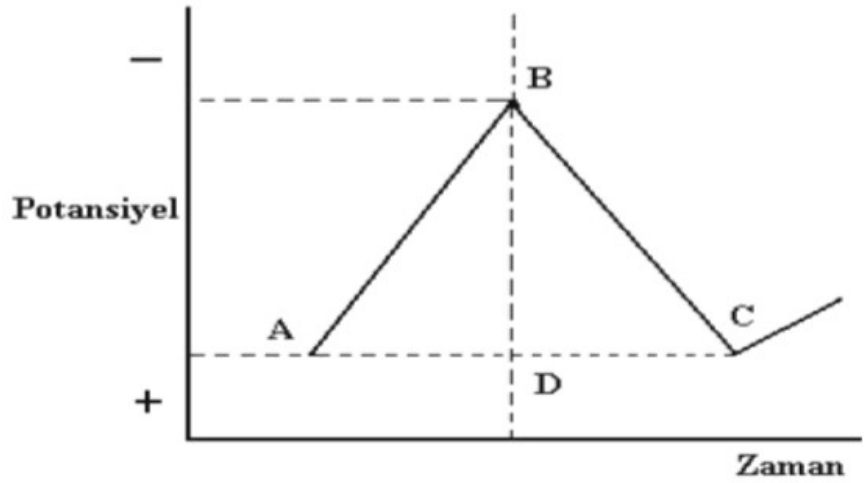
Nyquist grafiği, Randles hücresinde genellikle yarım daire şeklindedir ve modül değişimleri ile frekans değişimlerine karşılık gelen faz açısının eğrisi olarak tanımlanır. Nyquist eğrisinde yarım dairenin çapı yük aktarım direncine eşittir. (Xiao-Zi**,** Song**,** Wang & Zhang, 2010). Bode eğrisinde ise faz açısı değerleri ile frekansa bağlı olarak değişen kazanç (genlik) iki farklı eğri olarak gösterilir. Bu eğrilerde genellikle düşey eksende faz açısı değerleri ile genlik değerleri, yatay eksende ise logaritmik olarak ölçeklendirilmiş

frekans değerleri yer almaktadır. Genlik değerleri desibel cinsinden, faz değerleri de derece cinsinden verilmektedir. Bode eğrilerinin en kullanışlı özelliği, logaritmik ölçekleme ile yüksek ve alçak frekanslardaki karakteristik özellikler tek bir diyagramda görülmektedir (Öztürk, 2010; Özlük, 2011, Yüksel, 2001; Nise, 2007).

2.5. Voltametri ve Döngüsel Voltametri (CV)

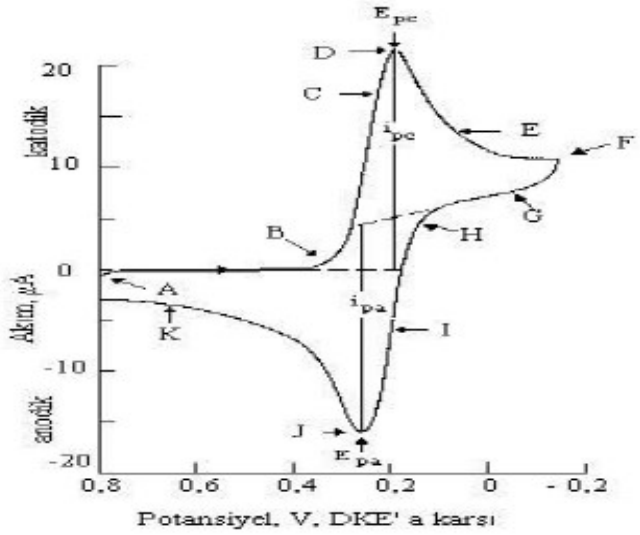
Polarize şartlar altındaki çalışma elektroduna gönderilen potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü ve böylece analit hakkında bilgi sahibi olunduğu elektrokimyasal yöntem 'voltametri' olarak isimlendirilir. Uygulanan gerilim ile ölçülen akım değerinin grafiği de 'voltamogram' olarak adlandırılır. Elektrolit türüne, çalışma elektrodunun türüne ve çözücüye bağlı olarak voltametride çalışılacak gerilim aralığı sınırları belirlenir (Özcan, 2015).

Voltametrik tekniklerde, potansiyel zamanla değiştirilir ve ortaya çıkan akım kaydedilir. Döngüsel voltametri (Cyclic Voltammetry, CV) bu tekniğin en temelidir (Islam & Channon, 2020). Üçlü elektrot sistemi kullanılarak yapılan CV ölçümlerinde hücreden geçen akımın, hücredeki elektrotlara uyguladığı potansiyelin değişmesiyle ölçülen elektroanalitik bir tekniktir. Böylece bu teknikte çalışma elektrodunda, belirli bir tarama hızı ve belirli bir potansiyelde ortaya çıkan akım cevabı zamana karşı kaydedilir (Malhotra & Pandey, 2017). Şekil 2.13'te örnek bir potansiyel grafik verilmiştir.



Şekil 2.13. İkizkenar üçgen dalgası biçiminde uygulanan potansiyel grafiği (Skoog, Holler & Nieman, 1997)

Tarama işlemleri döngüsel voltametri tekniğinde belirli bir potansiyelde ve doğrusal olarak yapılmaktadır. Orijinal potansiyel değerine dönebilmek için daha sonra tarama yönü tersine çevrilir. Tarama hızları her iki yönde de aynıdır ve birkaç kez bu işlem tekrar edilir. Döndürme potansiyelleri ters yöndeki potansiyeller olarak bilinir ve bunların aralıkları bir veya birden fazla analitin indirgenme veya yükseltgenmesinin difüzyon kontrollü olarak meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü numune bileşimine bağlı olarak negatif ya da pozitif olarak belirlenebilmektedir. İleri tarama, negatif potansiyel yönündeki taramalara, ters tarama ise pozitif potansiyeller yönündeki taramalara denir. Şekil 2.14'te üçgen dalga potansiyel uygulandığında ortaya çıkan eğri gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Üçgen dalga potansiyeli verildiğinde ortaya çıkan voltammogram (Skoog, Holler & Nieman, 1997)

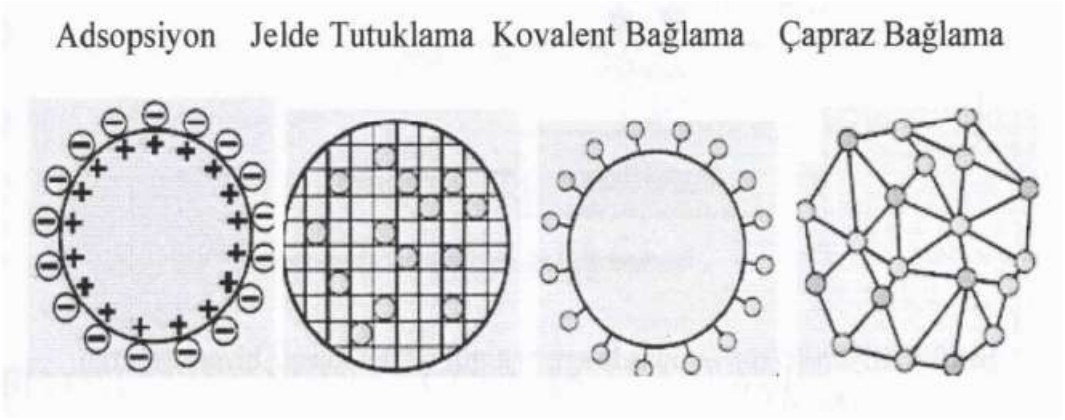
Şekil 2.14'te verilen voltammogramda, sürekli artan katodik gerilim verildiğinde eğrideki ABDF bölgesi elde edilir. B bölümünde indirgenmeden dolayı katodik akım görülür. B ile D arasındaki bölgede ise maddedeki yüzey derişimi azalırken akım hızlı bir şekilde artar. Nernst eşitliği ile verilen denge derişimi ile analitin yüzey derişimini eşitleyebilmek için gerekli olan normal difüzyon kontrollü akım ve kapasitif artışı olmak üzere pik akımı iki bileşenden oluşur. Difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça sonraki ilk akım buna bağlı olarak azalır (D noktasından F noktasına). F noktasındaki katodik gerilim de azalmaya başlar. FH bölgesine kadar indirgenebilen maddelerin indirgenmesi devam eder fakat indirgenmiş olan madde konsantrasyonu azaldığı için akım da azalır. Potansiyelin yeteri kadar pozitif olması daha fazla indirgenme olmayacağını gösterir ve akım sıfıra inerek anodik olur. İleri yöndeki tarama esnasında yüzeyin yakınlarında birikmiş olan indirgenmiş olan maddenin yeniden yükseltgenmesi ile anodik akım oluşur. Bu sebeple anodik akım pik yapar ve de indirgenmiş olan maddenin anodik reaksiyon ile kullanılması sonucu azalır (Skoog, Holler & Nieman, 1997).

2.6. Biyosensör Tasarımları İçin İmmobilizasyon Yöntemleri

2.6.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyonun kelime anlamı hareketsizleştirmedir. Biyomoleküllerin aktivitelerini kaybetmeden fiziksel lokalizasyonları ve biyoalgılama sisteminin oluşumu immobilizasyon olarak ifade edilir. Biyolojik materyaller kısa ömürlü oldukları için uygun bir matriks içinde saklanmalıdır. Biyoreseptörün tekrar kullanılabilirliği ve kararlılığı açısından immobilizasyon yöntemleri oldukça avantajlıdır.

Biyokomponentlerin sinyal dönüştürücü üzerine immobilizasyonu fiziksel bağlama ya da kimyasal bağlama ile gerçekleştirilir. Fiziksel immobilizasyona; polimer matrikste tutuklanma, adsorpsiyon gibi yöntemler örnek gösterilebilir. Kimyasal immobilizasyona; çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi yöntemler örnek olarak verilebilir. Seçilen biyoreseptör ve dönüştürücüye bağlı olarak hangi yöntemin immobilizasyon işlemi için kullanılacağı belirlenir (Dinçkaya, 1999).



Şekil 2.15. Biyosensörlerin immobilizasyon yöntemleri (Dinçkaya, 1999)

Biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olmasının sağlanması adsorpsiyon yöntemi ile olur. Van der Walls kuvvetleri, hidrojen bağları ve tuz köprüleri gibi non-kovalent etkileşimler ile biyokomponentin sinyal dönüştürücü yüzeyine immobilizasyonu prensibine dayanır. Adsorpsiyon yönteminde kullanılan adsorban örnekleri; selüloz, polimerik aromatik reçineler, silikajel ve kollajen gibi kimyasallardır (Joshi, 2006).

Tutuklama yönteminde biyoreseptör, polimer matrisi içerisinde ya da transduser yüzeyi yakınında bir jel tarafından tutuklanır. Tutuklama için kullanılan temel kimyasallar; nişasta, akrilamid polimerleri, naylon, polivinil klorür ve jelatin tabakalardır (Dinçkaya, 1999; Joshi, 2006).

Çapraz bağlama yöntemi, en az iki molekülün birbirlerine kovalent bağlarla bağlanması yöntemidir. Genellikle bu işlemde aminler, sülfidriller gibi iki veya daha çok reaktif fonksiyonel grup içeren kimyasallar kullanılır. Bu yöntemde en çok tercih edilen çapraz bağlayıcılar; hekzametilen diizosiyanat, glutaraldehit, 1,5 dinitro-2,4 diflorobenzen gibi kimyasallardır. Çapraz bağlama ile biyotanıma materyalinin sabitlenmesi sağlanır (Mayes, 2002).

Kovalent bağlanma yöntemi ise enzim üzerindeki fonksiyonel gruplar sayesinde gerçekleşir bu sebep ile kovalent bağlanmanın oluşabilmesi için biyomolekül yüzeyinde ve/veya bağlanma yüzeyinde karbonil (-C=O), karboksil (-COOH), hidroksil (-OH), tiyol (-SH) ve amin ($-NH_2$) gibi reaktif gruplar içermesi gerekir. Biyokomponentler önceden hazırlanmış uygun bir film ya da tabaka ile kaplı dönüştürücüye ya da direkt dönüştürücü üzerine kovalent olarak bağlanabilirler. Biyokomponentlerin kovalent bağlanması ile sıcaklık, pH gibi değişkenlere karşı direnç oluşturarak biyosensörün daha dayanıklı olması sağlanabilir (Dinçkaya, 1999).

2.6.2. Elektrokimyasal Polimerleşme

Elektrolit, çözücü ve monomerden oluşan bir çözeltiye harici akım uygulandığı zaman anyonik, katyonik ya da radikalik mekanizmalar ile polimer oluşturulabilir (Garg, Raff & Subramanian, 1978). Elektropolimerizasyon işlemi, metal üzerinde pasif ince film oluşturmak için ideal bir yöntemdir. Elektrokimyasal polimerleşme yönteminde polimerizasyonun başlaması için iki farklı yöntem vardır. İlk yöntemde; monomer molekülü direkt indirgenerek ya da oksitlenerek aktifleşir ve elektrot yakınında bulunan monomer ile etkileşerek polimerizasyon gerçekleştirilir. Monomerin indirgenmesi kattotta meydana gelirken oluşan aktif monomer serbest radikal ya da radikal-anyon formunda olur. Monomerin yükseltgenmesi ise anotta meydana gelir ve oluşan aktif monomer de serbest radikal ya da radikal-katyon formunda olur. Bu yöntemdeki polimerizasyonun başlaması pek olağan değildir ve monomerin indirgenme ya da

oksitlenme eğilimine de bağlıdır. İkinci yöntemde ise; elektropolimerizasyon işlemi elektrokimyasal bir başlatıcının oksitlenmesi ya da indirgenmesi ile gerçekleşir. Bu yöntem farklı monomer sistemlerinde ve özellikle vinil grubu içeren monomerlerde uygulamaya oldukça elverişlidir (Cram, Spinks, Wallace & Brown, 2002, 2003a, 2003b).

Elektrokimyasal polimerizasyon; iletken polimerin oluşturulduğu filmin iletkenliği, kalınlığı, seçilen iyonların kontrollü birleştirilmesi, morfolojisi ve aşağıda verilen birçok avantajlardan dolayı günümüzde ilekten polimer elde etmek için geniş bir uygulama alanına sahip olan polimerizasyon tekniğidir. Bunlar:

- Tepkimenin oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi
- Polimerin katalizör, monomer ve çözücüden ayrılması gibi hiçbir işlem gerektirmemesi
- Elektrot yüzeyinde polimer filmlerin oluşturulabilmesi
- Akım ve potansiyel şiddetini değiştirerek film kalınlığının ayarlanabilmesi
- Homojen olarak film elde edilebilmesi
- Polimerleşmenin başlama ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmesi
- Seçici gerilim kontrolü ile istenilen özellikte kopolimerlerin üretilebilmesi

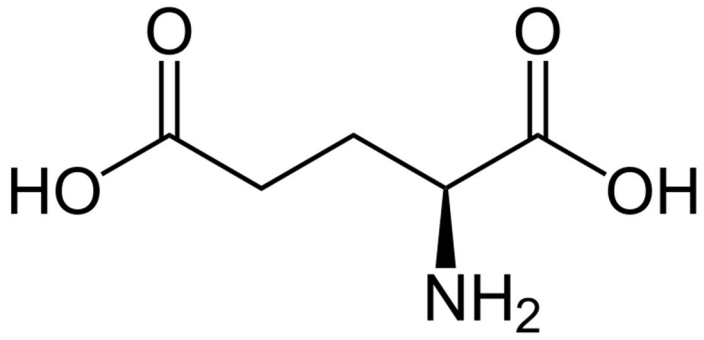
(Karayünlü, 2002; Bülbül, 2005).

Elektrokimyasal polimerleşmeye etki eden faktörler;

- Elektrot
- Uygulanan geriliminin etkisi
- Elektrolit
- Sıcaklık
- pH
- Çözücü türü
- Monomer konsantrasyonu (Korsacılar, 2012).

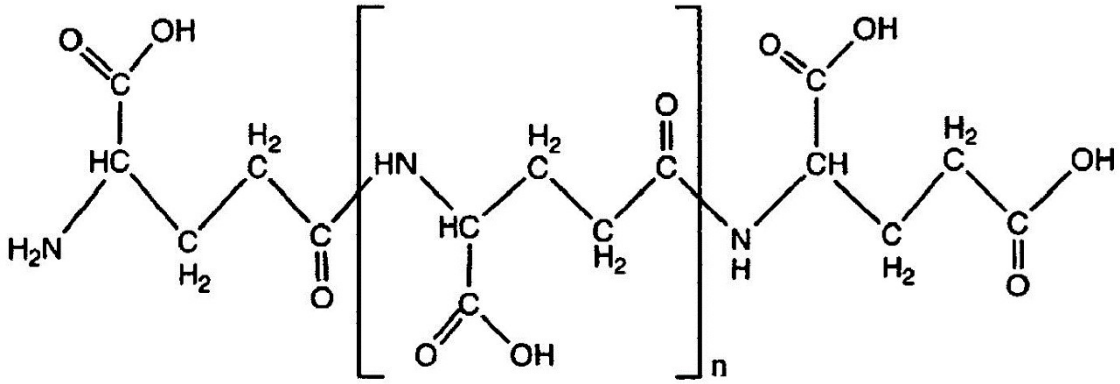
2.6.2.1. Glutamik asit ve glutamik asidin elektrokimyasal polimerleşmesi

Son zamanlarda hızlı hazırlanmaları ve biyo-uyumlulukları bakımından polimerize aminoasitler biyosensör tasarımlarında oldukça sık tercih edilmeye başlanmıştır (Yeşil vd., 2016). Glutamik asit, sentetik aminoasitler arasında en çok tercih edilenlerden biridir ve elektrot yüzeyine doğrudan elektropolimerize edilebilir (Lin vd., 2014). 1800 yılında glutamik asit, buğday gluteninden yola çıkılarak Karl Heinrich Ritthausen tarafından keşfedilmiştir. Glutamik asit Şekil 2.16'de görüldüğü gibi iki karboksilik grup ile bir zincir yapısına sahiptir.



Şekil 2.16. Glutamik asidin yapısı

Elektrot yüzeyini modifiye etmek için poli-glutamik asit (PGLU) uygulaması oldukça ilgi görmektedir. PGLU polimer yapısında tekrarlanan glutamat birimleri, a-amino ve δ-karboksilik asitler fonksiyonel grupları ile birbirlerine bağlanır (Richard & Margaritis 2001). İyi bir stabiliteye, hızlı hazırlanma yöntemine, tekrarlanabilirliğe ve yapısında serbest karboksilik gruplara sahip olması sebebi ile büyük avantaja sahiptir.



Şekil 2.17. Poli Glutamik asit (PGLU)

Literatürde de glutamik asidin elektropolimerizasyonuna yönelik biyosensör çalışmaları oldukça fazladır (Gross vd., 1998). Dönmez ve arkadaşları 2015 yılında poli-glutamik asit kullanarak Hepatit C virüsü genotip 1a'nın saptanması için bir nükleik asit biyosensörü tasarlamışlardır (Dönmez, Arslan & Arslan, 2015).

Sheng X ve arkadaşları tarafından ise 2017 yılında yaptıkları çalışmada poli-glutamik asit kullanarak karsinoembriyonik antijenin hassas tayini için impidimetrik bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir (Sheng vd., 2017).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Araç Gereçler

Bu çalışmada visfatin analizi için elektrokimyasal impedans yöntemini temel alan bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiş, elektrokimyasal üçlü elektrot ölçüm sistemi; çalışma elektrodu olarak 2.01 mm^2 yüzey alanına sahip GC (Glassy Carbon) elektrot, referans elektrot olarak 3M KCl ile doygunlaşmış Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak 10 cm uzunluğunda platin tel kullanılarak oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan tüm elektrotlar BASi, Warwickshire, UK firmasından temin edilmiştir.

Elektrot yüzeyinin modifikasyonu ve tasarlanan biyosensör ile visfatinin elektrokimyasal analizi döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla Echem Analyst yazılımını içeren (Gamry Instruments, 37 Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostate/Galvanostate, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan tüm cihazlar; Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda mevcut olarak bulunan cihazlardır, deneysel çalışmalarda kullanılan tüm cihazların listesi;

- Hassas terazi (Precisa XB220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland)
- Ultrasonik su banyosu (Wise Clean DAIHAN, WUC, AO3H, Kore)
- Mikro pipetler (Eppendorff, Middle East & Africa)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer MSH 300)
- pH metre (6173 pH, made in China for USA)
- Ultra saf su cihazı (ELGA PURELAB OPTION-Q)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Biyosensör sistemi geliştirilirken kullanılan bütün çözeltiler taze olarak hazırlanarak günlük olarak tüketildi. Visfatin ve anti-visfatin deneylerde kullanılacak konsantrasyon miktarına göre seyreltilerek porsiyonlandı ve derin dondurucuda (-20 ºC) saklandı.

- Çalışmanın gerçekleştirildiği redoks probunda bulunan potasyum ferrisiyanat ($K_3[Fe(CN)_6]$ ve potasyum ferrosiyanat ($K_4[Fe(CN)_6]3H_2O$) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Etanol (Absolute %99.9) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- Elektrot yüzeyinde polimerleşme için kullanılan glutamik asit Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- GC elektrot yüzeyindeki aktifleştirme işlemi için kullanılan EDC/NHS çözeltisi 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Visfatin ve Anti-visfatin Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA.
- Antikor oluşumundan sonra elektrot yüzeyinde nonspesifik bağlanmaların önüne geçilmesi için kullanılan Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albümin, BSA) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Tampon çözeltilerde kullanılan KH_2PO_4, NaCl, KCl ve Na_2HPO_4 Merck KGaA, Darmstadt, Almanya.
- Yapay serum hazırlamada kullanılan Serum replacement Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

- Yapay serum hazırlığında kullanılan $CaCl_2$ KCl ve NaCl Merck KGaA, Darmstadt, Almanya.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanışı

0.08 M Glutamik asit çözeltisi: 0.2942 g GLU tartılıp 25 mL fosfat tamponu (pH: 7.0) ile çözülmüştür. Her çalışmada GLU çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır.

%0.5'lik BSA çözeltisi: 125 mg BSA tartılıp 25 mL saf su içerisinde çözüldü. Bu çözelti 4 haftada bir yenilenmiştir. 4 hafta boyunca buzdolabında (+4C) saklanmıştır.

0.4 M EDC çözeltisi: 11.88 mg EDC tartılıp 100 µL pH: 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

0.1 M NHS çözeltisi: 5.76 mg NHS tartılıp 500 µL pH: 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

EDC/NHS çözeltisi: Hazırlanan EDC ve NHS çözeltileri (1:1) oranında karıştırıldı.

50 mM pH:7.0 fosfat tamponu: 3.549 g Na_2HPO_4 tartılıp saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. 3.4015 g $KHPO_4$ tartılıp saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Bu iki çözelti birbiri ile karıştırılarak pH metre yardımı ile pH:7.0 olması sağlandı.

0.01 M pH:7.4 fosfat tamponu: 70.98 mg Na_2HPO_4 tartılıp ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. 68.03 mg KH_2PO_4 tartılıp ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu iki çözelti birbiri ile karıştırılarak pH metre yardımı ile pH: 7.4'e ayarlandı.

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ Ferri-Ferro redoks prob çözeltisi: 0.1646 g $K_3[Fe(CN)_6]$ tartılıp pH: 7.0 fosfat tamponu ile 100 mL içerisinde çözüldü. 0.2112 g $K_4[Fe(CN)_6]$ tartılıp pH: 7.0 fosfat tamponu ile 100 mL içerisinde çözüldü. 1.488 g KCl tartılıp hazırlanan 200 mL'lik $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisine ilave edildi. Kahverengi şişede buzdolabında (+4C) saklandı.

Yapay serum çözeltisi (1x): Serum replacement çözeltisi 1/50 oranında seyreltildi, daha sonra son konsantrasyonlar 4.5 mM KCl, 5 mM CaCl2, 145 mM NaCl olacak şekilde tuz ilaveleri yapıldı, son olarak istenilen konsantrasyonda visfatin örnekleri eklendi

3.2. Yöntem

3.2.1. GC Elektrot Hazırlığı ve Visfatin Biyosensörünün Tasarım Stratejisi

3.2.1.1. Elektrot Temizliği

GC elektrot her biyosensör hazırlığı öncesinde ve ölçümler tamamlandıktan sonra fiziksel ve kimyasal olarak temizlendi. Temizlik aşamaları şu şekildedir:

I. Bir miktar Alüminyum oksit (Al_2O_3 < 50 nm partikül büyüklüğü) sentetik suni ipek (Buehler Microcloth PSA, Buehleri UK) bir yüzey üzerine alındı (elektrot yüzeyinin çizilmemesi için). Birkaç damla saf su damlatılıp, alümina pelte kıvamına gelene kadar karıştırıldı. Yaklaşık olarak 3 dakika boyunca elektrot alümina üzerinde sekiz şeklinde gezdirilerek yüzeyde herhangi bir kirlilik varsa mekanik olarak giderildi.

II. GC elektrot saf su ile yıkandıktan sonra adsorbe partikülleri gidermek için sonikatörde 5 dakika önce saf su içinde, daha sonra 5 dakika etanol (% 99.9) içinde sonike edildi. Ultra saf su ile tekrar durulanan elektrot yüzeyine saf argon gazı gezdirilerek kurutma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1.2. GC Elektrot Yüzeyinde Aktif Karboksil Gruplarının Biriktirilmesi

Tasarlanan biyosensörde, anti-visfatin moleküllerinin GC çalışma elektrodu yüzeyinde immobilize edilmesi için GLU elektropolimerleştirme yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı şekilde temizlenen GC elektrot yüzeyinde taze olarak hazırlanan 10 mL 0.08 M GLU çözeltisi kullanılarak elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon CV tekniği kullanılarak -0.8 V ile 2 V aralığında 100 mV/s tarama hızında ve 8 döngüde gerçekleştirildi. GC çalışma elektrodu yüzeyinde GLU elektropolimerizasyonu tamamlandıktan sonra elektrotlar saf su ile yıkanıp argon gazı ile kurutuldu. Bu aşamadan sonra elektrot GC-GLU olarak isimlendirildi.

3.2.1.3. EDC/NHS ile Aktivasyon

Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı gibi karboksillenmiş olan GC elektrotlardaki GLU karboksil uçlarını aktifleştirebilmek ve bu aktif uçların antikorun -NH_2 grupları ile etkileşime girebilmesini sağlamak için taze olarak hazırlanan 0.4 M EDC ve 0.1 M NHS (1:1) içeren çözeltiden 20 µL GC elektrot yüzeyine yayılarak 1 saat karanlık, nemli ve kapalı bir köpük kutu içerisinde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından elektrotlar saf su ile yıkanarak yüzeyde bağlanmamış olan moleküller uzaklaştırıldı ve ardından CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirildi.

3.2.1.4. Anti-Visfatin İmmobilizasyonu ve Biyosensörün Tasarım Stratejisi

Bölüm 3.2.1.2 ve 3.2.1.3'de anlatıldığı şekilde GC elektrot yüzeyinde aktif karboksil grupları biriktirilip EDC/NHS molekülleri aktive edildikten sonra elektrotlar 10ng/10µL anti-visfatin ile 1 saat oda sıcaklığında, karanlık, nemli ve kapalı bir ortamda inkübasyona bırakıldı. GLU'nun aktif karboksil uçları ile anti-visfatinin amin gruplarının etkileşime girerek anti-visfatinin kovalent olarak yüzeye bağlanması sağlandı.

Anti-visfatinin elektrot yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmesinden hemen sonra elektrot yüzeyinde amin grupları ile etkileşime girmeyen aktif karboksil uçlarını bloklamak amacı ile elektrot, bloklama ajanı olarak kullanılan BSA (% 0.5) ile 1 saat oda sıcaklığında, karanlık, nemli ve kapalı bir ortamda inkübasyona bırakıldı ve inkübasyonun ardından CV ve EIS ölçümleri alındı. Bu modifikasyonlar gerçekleştirildiğinde çalışma elektrodları sırasıyla;

-GC- Bare (yalın) çalışma elektrodu

-GC-GLU- Glutamik asit elektropolimerleşmesi ile modifiye edilmiş çalışma elektrodu

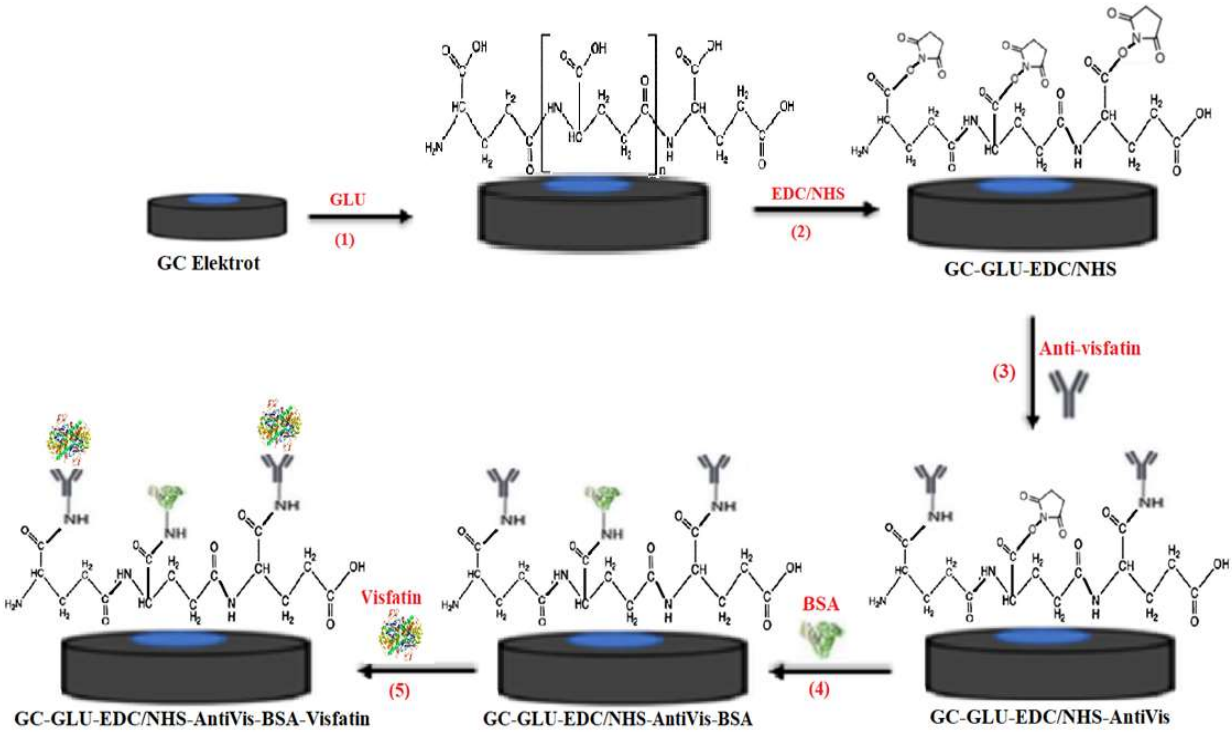
-GC-GLU-EDC/NHS- Glutamik asit elektropolimerleşmesi sonrası aktifleştirilmiş çalışma elektrodu

-GC-GLU-EDC/NHS-AntiVis- Anti-visfatin immobilize edilmiş çalışma elektrodu

-GC-GLU-EDC/NHS-AntiVis-BSA- Visfatin Biyosensörü

olarak isimlendirildi.

Elektrotların immobilizasyon adımları tamamlandıktan sonra standart olarak porsiyonlanmış (20pg/10µL) visfatin çözeltileri kullanılarak CV-EIS ölçümleri alındı. Visfatin biyosensörünün tasarım aşamaları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Visfatin biyosensörünün tasarım aşamaları

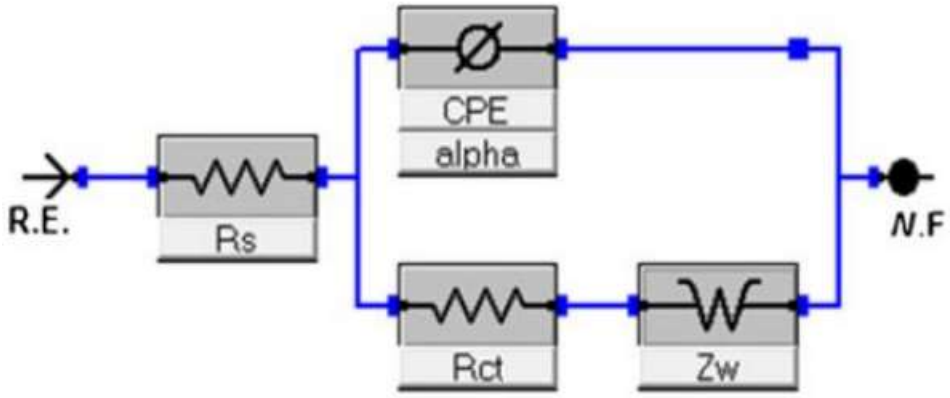
3.2.2. Visfatin Biyosensörünün Ölçüm Prensibi

Glutamik asit ile elektropolimerizasyon işlemi için CV tekniği kullanıldı. Çalışma potansiyel aralığı -0.8 V ile 2 V, tarama hızı 100 mV/s, adım büyüklüğü 10 mV ve 8 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tasarım aşamaları tamamlanan biyosensörün immobilizasyon adımları, optimizasyon basamakları ve karakterizasyon çalışmaları EIS ve CV teknikleri ile yapıldı. CV yönteminde çalışma potansiyel aralığı -0.1 V ile 0.5 V, tarama hızı 49.9999 mV/s, adım büyüklüğü 1 mV ve 4 döngü olacak şekilde seçilerek işlemler gerçekleştirildi. Yapılan ölçümlerin hepsinde ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) ve 0.1 M KCl içeren çözelti kullanıldı. EIS yönteminde

ise 10 mV alternatif akımda ve impedans spektrumları 50.000-0.05 Hz aralığında olacak şekilde seçilerek ölçümler yapıldı.

Hedef analit çalışma elektrodunun yüzeyine bağlandığı zaman, hedef analitin konsantrasyonu ile orantılı olarak elektrot yüzeyinin yük transfer direnci değişir, bu değişimin ölçülmesi için elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği en etkili yöntemdir ve analit konsantrasyonunu kolaylıkla belirleyebilir. Nyquist eğrileri EIS ölçümleri ile yük transfer direncinin hesaplanması için elde edilir. Nyquist eğrileri iki kısımdan oluşur, yük transfer direnci Nyquist eğrisinin yarım daire şeklindeki kısmının çapının ölçülmesiyle yazılım tarafından sanal bir eşdeğer devre modeline göre modellenerek hesaplanır. Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm impedans hesaplamaları Gamry Analyst yazılımı ile geliştirilen sistemin modellediği ve Şekil 3.2'de gösterilen eşdeğer devre modeli kullanılarak yapıldı. Şekilde Zw; Warburg İmpedansı, Rct; yük transfer direnci, CPE-alpha; sabit faz elemanı kapasitansı ve Rs; çözelti direnci olarak belirtildi.

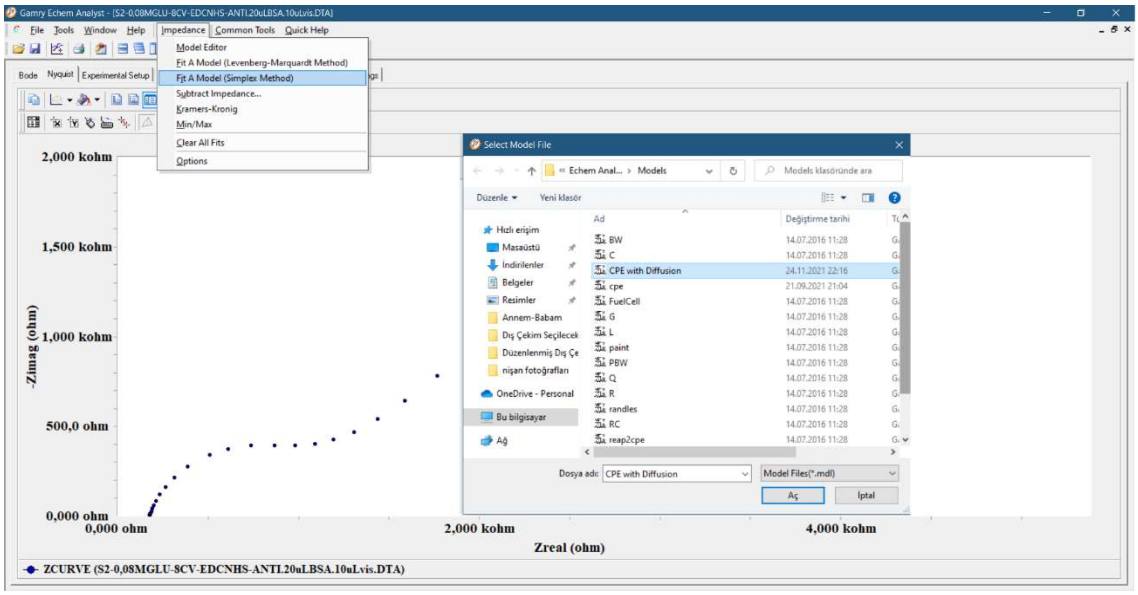


Şekil 3.2. Örnek eşdeğer devre modeli

3.2.2.1. Yük transfer direncinin (Rct) hesaplanması

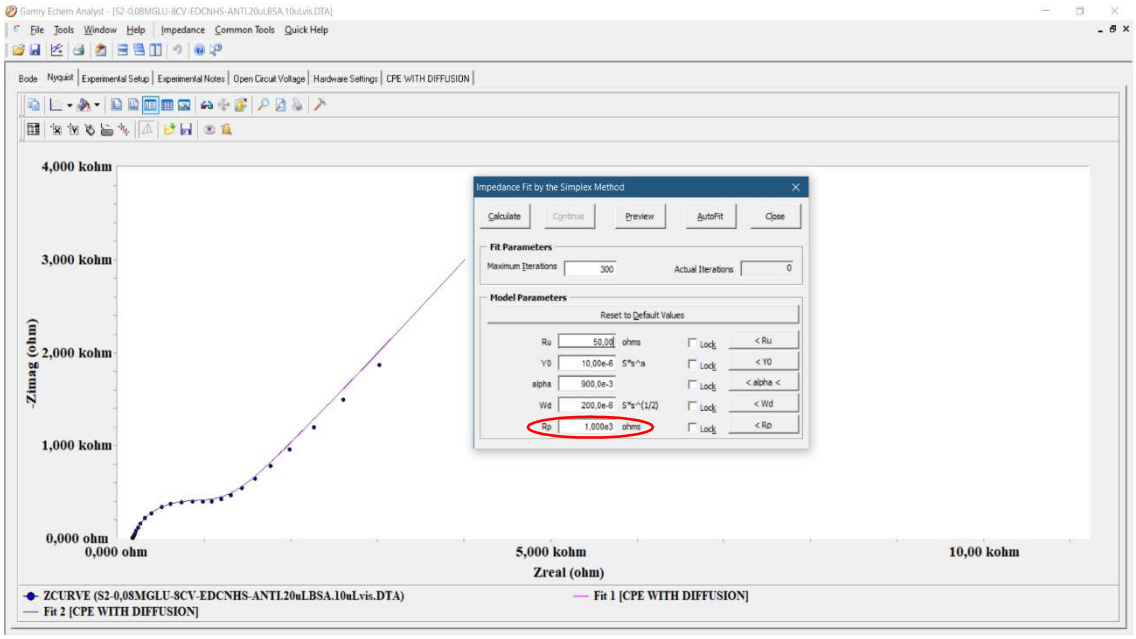
Gamry Analyst yazılımında yük transfer direncinin sayısal olarak hesaplanması istenilen Nyquist diyagramı seçilir. Yazılımda bulunan üst menüden impedans sekmesinde 'Fit A Model (Simplex Method)' bölümü seçilir. Daha sonra gösterilen pencereden daha önceden hesaplama yöntemleri belirlenmiş devre sistemlerinden

çalışmaya uygun olan ‘CPE with Diffusion’ devre türü seçilir. Şekil 3.3’te örnek verilmiştir.



Şekil 3.3. Gamry Analyst yazılımında bulunan devre modelleri

Çalışma için doğru devre seçiminden sonra açılan hesaplama ekranında “reset to default values” sekmesi değerlerin sıfırlanabilmesi için seçilir. Çalışma sonucunda ortaya çıkan Nyquist eğrisi ile ortaya çıkan hesaplama eğrisi ile uyuşana kadar “calculate” bölümüne birkaç kez tıklanır. Şekil 3.4’te örnek gösterilmiştir. Son olarak hesaplama ekranında bulunan Rp değeri Rct değerine karşılık gelmektedir ve Rp değeri her Nyquist eğrisi için kaydedilir.



Şekil 3.4. Rct değerini hesaplama tablosu

3.2.3. Biyosensör İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu

Visfatin biyosensörünün yanıtının ve hassasiyetinin arttırılması amacı ile biyosensörün tasarımında her bir immobilizasyon adımı için optimum koşullar belirlenmiştir. Tekrar üretilebilir ve hassas biyosensör elde edebilmek adına GLU konsantrasyonu, elektropolimerizasyon işleminde döngü sayısı, inkübasyon süresi ve anti-visfatin konsantrasyonu gibi parametreler ile optimize edilmiştir.

3.2.3.1. Glutamik asit konsantrasyonu optimizasyonu

Elektropolimerizasyon işlemi ile yüzeye bağlanacak olan glutamik asidin konsantrasyonun anti-visfatinin yüzeye bağlanmasında kritik bir rolü bulunmaktadır. Bu sebeple elektrot yüzeyinde kararlı, dayanıklı bir yapı oluşturmak ve optimum GLU konsantrasyonunu belirlemek amacıyla temizlenmiş elektrot yüzeyinde 6 farklı konsantrasyonda (0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M, 0.1 M, 0.12 M) glutamik asit kullanılarak elektropolimerizasyon gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon CV tekniği kullanılarak potansiyel aralığı -0.8 V ile 2 V, tarama hızı 100 mV/s, adım büyüklüğü 10mV olacak şekilde yapıldı. Denemelerde EDC/NHS (0.4 M-0.1 M), 10 ng/µL anti-

visfatin, % 0.5 BSA konsantrasyonları sabit tutuldu. Yukarıda belirtilen GLU konsantrasyonlarında hazırlanan GC elektrotlar 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda visfatin çözeltileri ile 1 saat kapalı, karanlık, nemli bir kutu içerisinde inkübe edildikten sonra EIS ölçümleri alındı. Sonuçlar doğrultusunda optimum GLU konsantrasyonu belirlendi.

3.2.3.2. Elektropolimerizasyon işleminde döngü sayısı optimizasyonu

Optimum glutamik asit konsantrasyonu belirlendikten sonra anti-visfatin immobilizasyonu için en uygun elektropolimerleşme döngü sayısının belirlenmesi amacıyla üç farklı döngü sayısı (6, 8, 10) kullanılarak GLU elektropolimerleşmesi yapıldı. Elektropolimerizasyon CV tekniği kullanılarak potansiyel aralığı -0.8 V ile 2 V, tarama hızı 100 mV/s, adım büyüklüğü 10mV olacak şekilde yapıldı. Elektrotların hazırlanması aşamasında EDC/NHS (0.4 M-0.1 M), 10ng/uL anti-visfatin, % 0.5 BSA, konsantrasyonları sabit tutuldu. GLU polimerleşmesi için belirtilen 3 döngü sayısı kullanılarak elektrotlar ile 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda visfatin çözeltileri ile 1 saat kapalı, karanlık, nemli bir kutu içerisinde inkübe edildikten sonra EIS ölçümleri alındı. Sonuçlar doğrultusunda optimum döngü sayısı belirlendi.

3.2.3.3. Anti-visfatin konsantrasyon optimizasyonu

GLU polimerleşmesi için en uygun olan glutamik asit konsantrasyonu ve döngü sayısı belirlendikten sonra antikor konsantrasyonunun optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla altı farklı anti-visfatin konsantrasyonu kullanılarak (5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL) biyosensörler hazırlandı. Denemelerde GLU konsantrasyonu ve döngü sayısı belirlenen optimum değerlerde kullanıldı ve EDC/NHS (0.4 M- 0.1 M), % 0.5 BSA konsantrasyonları ise sabit tutuldu. Altı farklı anti-visfatin konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan biyosensörler 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda visfatin çözeltileri ile 1 saat kapalı, nemli ve karanlık bir kutuda inkübe edildikten sonra EIS ölçümleri alınarak optimum anti-visfatin konsantrasyonu belirlendi.

3.2.3.4. Visfatin inkübasyon süresi optimizasyonu

İmmobilizasyonun ilk aşaması olan GLU polimerleşmesi için en uygun GLU konsantrasyonu, polimerleşme döngü sayısı ve anti-visfatin konsantrasyonu belirlendikten sonra, daha duyarlı ve doğrusal sonuçlar elde etmek adına visfatinin elektrot yüzeyine maksimum verim ile bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörler 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda visfatin çözeltileri ile 30 dk, 45 dk ve 1sa boyunca nemli ve karanlık bir kutuda inkübe edildikten sonra EIS ölçümleri alınıp optimum inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.4. Biyosensörün Yüzey Karakterizasyonu

3.2.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Biyosensör tasarımında anti-visfatin'in çalışma elektrodunun yüzeyine immobilizasyon basamaklarının optimizasyonu tamamlandıktan sonra, immobilizasyon işlemlerinin herbir basamağında elektrot yüzeyinde meydana gelen değişiklerin incelenmesi amacıyla alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FEI-Quanta FEG 250) ile yüzey görüntüleri elde edildi. Elektrot yüzeyine ait SEM görüntülerinin elde edilmesinde kullanılan hızlanma gerilimi 5 kV'dır.

3.2.4.2. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR)

Biyosensör tasarımında anti-visfatin'in immobilizasyonu ve öncesinde çalışma elektrodu yüzeyinde oluşan kimyasal bağların incelenmesi için FTIR tekniği kullanıldı. Bu amaçla bare ve anti-visfatin immobilizasyonu yapılmış elektrotlar için 4000–400 cm^{-1} aralığında işletilen FTIR spektrumları kaydedildi.

3.2.4.3. Biyosensörün yüzey alanının hesaplanması

Biyosensör tasarımında kullanılan GC elektrot yüzeyinin anti-visfatin antikor ile hangi oranda kaplandığını belirlemek amacı ile bare elektrot ve antikor bağlı elektrot kullanılarak 10 farklı potansiyelde (1→100 mV) CV ölçümleri alındı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Laviron eşitliği kullanılarak anti-visfatin antikorunun hangi oranda elektrot yüzeyine bağlandığı belirlendi.

Laviron Eşitliği:

$$\mathbf{Q = n \times F \times A \times r}$$

Q: Yük Miktarı

n: 10 farklı tarama hızında elde edilen CV yardımıyla hazırlanan katodik akım-potansiyel grafiklerinin eğimi

F: Faraday sabiti (96485 C/mol),

A: Elektrot Alanı (0.15 cm^2)

r: Kaplanan yüzey alan (mol/cm^2)

3.2.5. Biyosensörün Analitik Karakterizasyonu

Tasarlanan biyosensörün visfatin tayinindeki başarısının incelenmesi için analitik karakteristik özellikleri incelendi. Bu sebeple belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirlik, doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, yüzey alanı ölçümü ve yapay serumda uygulama analizleri yapıldı.

3.2.5.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Bölüm 3.2.4'te belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörlere altı farklı visfatin konsantrasyon (1-6 ng/mL) aralığında EIS ve CV ölümleri alındı ve elde

edilen sonuçlar doğrultusunda kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiği hazırlanırken yük transfer direnci değerleri $\Delta Rct=Rct_{(antijen)}-Rct_{(antikor)}$ denklemi kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.2. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Biyosensörün tekrar üretilebilir olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla optimum değerler kullanılarak farklı günlerde hazırlanan 9 adet biyosensörün 1-6 ng/mL visfatin konsantrasyon aralığında EIS ve CV ölçümleri yapıldı. Sonuçlar doğrultusunda elde edilen Nyquist eğrileri ile hesaplanan ΔRct değerleri kullanılarak derişime karşılık yük transfer direnci grafiği çizildi ve bu grafikteki denklemler aracığıyla hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği değerlendirildi.

Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla 2, 3, 4 ve 5 ng/mL visfatin konsantrasyonlarında 4'er tekrar ölçüm alındı. Alınan impedans ölçümlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarından seçilen konsantrasyonlarda ölçülen visfatin miktarlarının ortalaması alınarak standart sapmaları ve geri kazanımları hesaplandı.

3.2.5.3. Yapay Serumda Visfatin Analizi

Bu karakterizasyon çalışması ile yapay serum içerisindeki protein ve tuzların visfatin biyosensörü cevabına olan etkisi incelendi. Yapay serum hazırlamak için ticari olarak satılan serum replacement çözeltisi ilk olarak 1/50 oranında seyreltilerek konsantrasyonları 4,5 M KCl, 5 mM $CaCl_2$ ve 145 mM NaCl şeklinde olacak şekilde tuz ilaveleri yapıldı ve sonrasında istenilen konsantrasyonlarda visfatin yapay serum çözeltisine ilave edildi. Bölüm 3.2.4'teki optimum koşullarda hazırlanan elektrotlara bu çözelti ilave edilerek EIS ölçümleri yapıldı.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

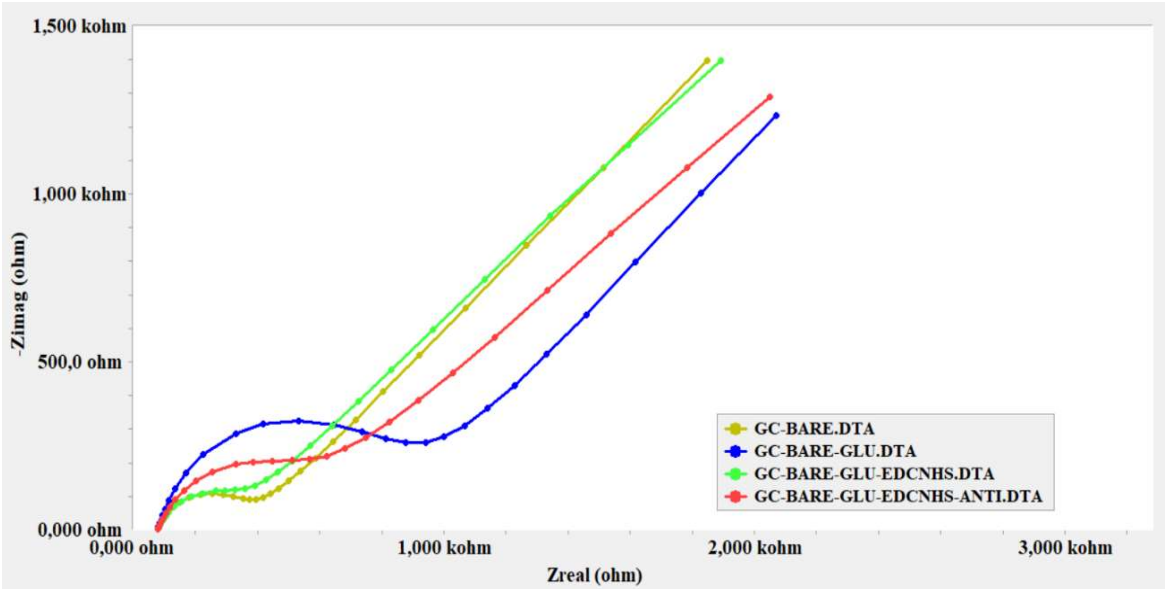
4.1. Visfatin Biyosensörü ile Elde Edilen Veriler

4.1.1. Biyosensör Tasarımında Elde Edilen Veriler

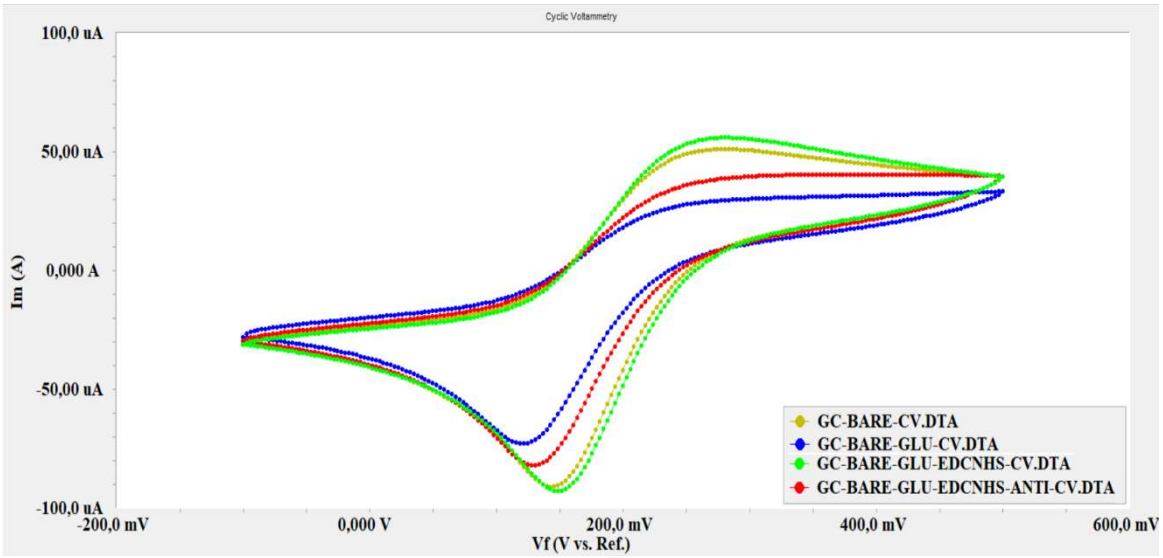
Visfatin tayini için tasarlanmış olan biyosensörün her immobilizasyon aşamasından sonra GC elektrodun yüzeyinin incelenebilmesi için CV ve EIS ölçümleri alındı. Ölçümlerden sonra elde edilen grafikler Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmektedir. Her immobilizasyon adımından sonra elde edilen Rct (yük transfer direnci) değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1'de gösterilen immobilizasyon adımlarının kısaltmaları:

1. **GC-BARE:** Temizlenmiş yalın GC çalışma elektrodu
2. **GC-BARE-GLU:** Glutamik asit ile modifiye edilmiş GC çalışma elektrodu
3. **GC-BARE-GLU-EDC/NHS:** Elektropolimerizasyon sonrası EDC/NHS ile aktifleştirilmiş GC çalışma elektrodu
4. **GC-BARE-GLU-EDC/NHS-ANTİ:** Antikor immobilize edilmiş GC çalışma elektrodu



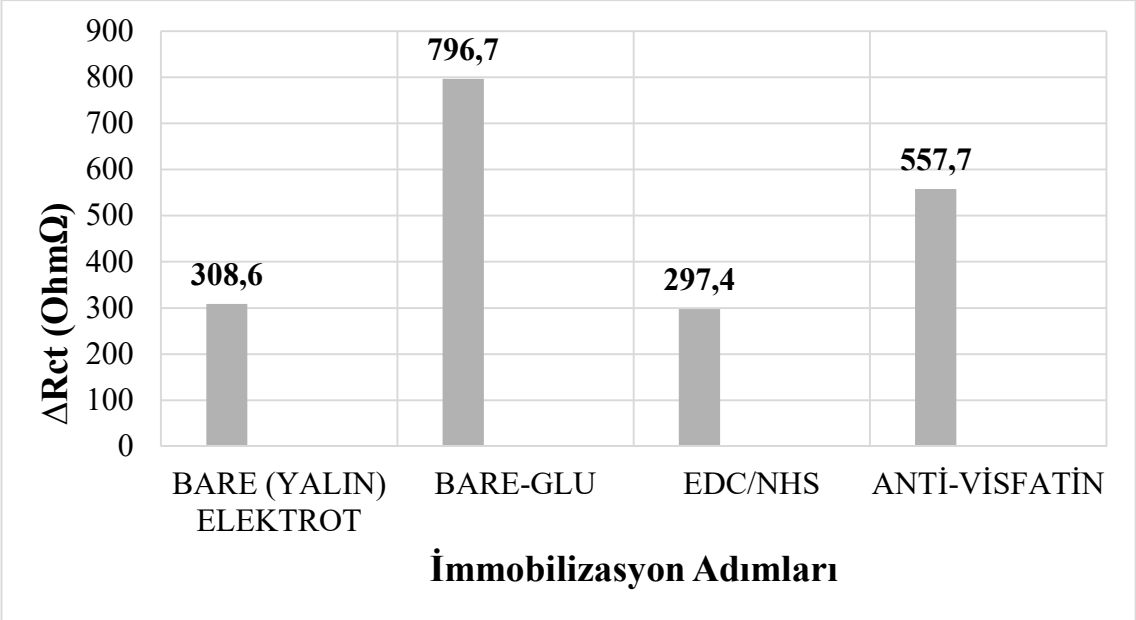
Şekil 4.1. Visfatin biyosensörün her bir immobilizasyon adımında elde edilen impedans spektrumları



Şekil 4.2. Visfatin biyosensörünün her bir immobilizasyon adımında elde edilen döngüsel voltammogramları

Çizelge 4. 1. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarının EIS ölçümlerinden hesaplanan yük transfer direnci değerleri

ELEKTROT YÜZEYİ	Rct (ohm)
BARE	**308,6**
BARE-GLU	**796,7**
BARE-GLU-EDC/NHS	**297,4**
BARE-GLU-EDC/NHS-ANTİ	**557,7**



Şekil 4.3. Her immobilizasyon adımları sonrasında elde edilen Rct değerlerine bağlı sütun grafik

Şekil 4.1'deki EIS ölçümü sonrasında elde edilen Nyquist eğrilerindeki yarım daire çapları yük transfer direncini göstermektedir. Şekil 4.2'deki döngüsel voltamogramlar ise CV ölçümleri sonrasında elde edilen grafiklere ait pik yükseklikleri çalışma elektrodu yüzeyindeki elektrik akımı ile doğru orantılıdır.

Şekil 4.1'de bulunan Nyquist eğrileri ile Çizelge 4.1'deki yük transfer dirençleri incelendiğinde; Bare elektroda göre elektropolimerleşme oluşumunu gerçekleştiren GLU moleküllerinden dolayı yük transfer direnci değerinde artma meydana gelmiştir.

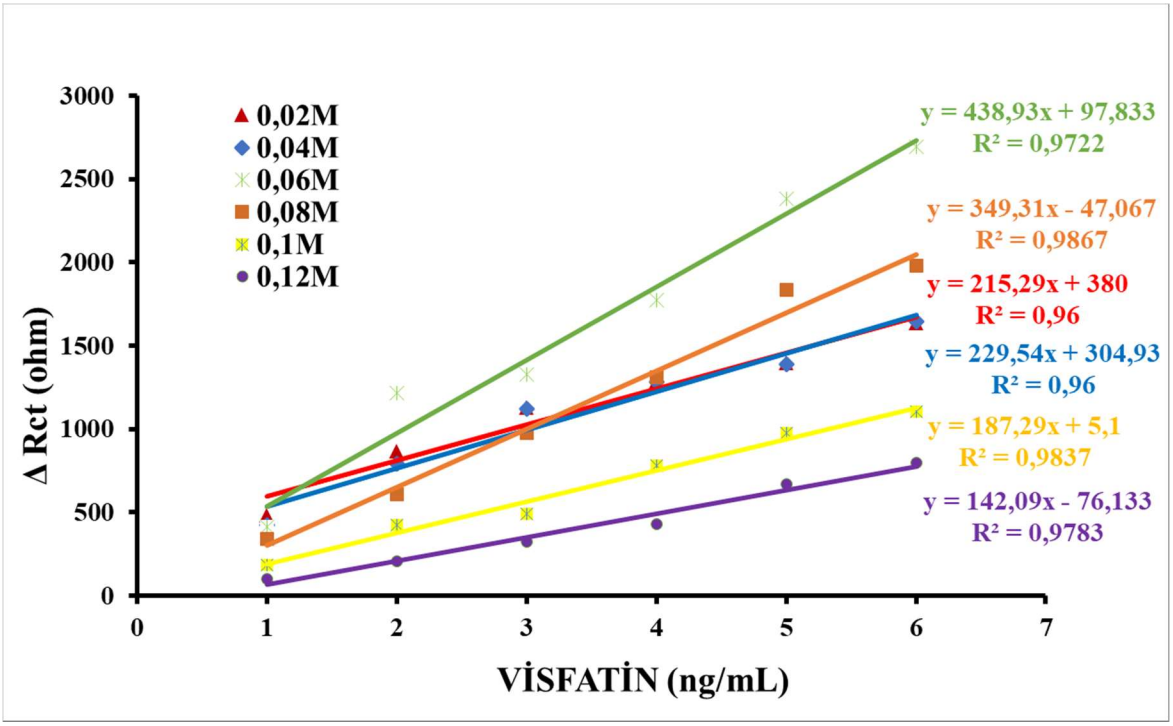
Çalışma elektroduna GLU modifiyesinden sonra EDC/NHS ile aktivasyonunda yük transfer direnci değerinde azalma meydana gelmiştir ve elektrot yüzeyinde belirgin bir iletkenlik artışı söz konusudur.

Çalışma elektrodu yüzeyine antikor immmobilizasyonu sonrasında yük transfer direnci değerinde yine bir artış söz konusudur. Bu sonuç beklenmekle birlikte yüzeyde hacimli antikorun bulunması ve birçok proteinin de düşük iletkenliğe sahip olması değerlendirildiğinde elektrodun iletkenliğini düşürebileceği sonucuna varılabilir.

4.2. Visfatin Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

4.2.1. Glutamik Asit Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Optimum glutamik asit konsantrasyonunun belirlenebilmesi için 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M, 0.1 M ve 0.12 M olmak üzere altı farklı konsantrasyonda glutamik asit çözeltileri hazırlandı ve altı farklı visfatin konsantrasyon (1-6 ng/mL) aralığında impedans ölçümleri yapılarak her bir biyosensör için ayrı ayrı ΔRct değerleri hesaplanıp kalibrasyon grafikleri çizildi. ΔRct değerlerine karşı visfatin konsantrasyonu çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Kalibrasyon grafikleri sonucunda elde edilen doğruların doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.4. GLU konsatrasyonları farklı olarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4. 2. GLU konsantrasyonları farklı olarak hazırlanan biyosensörlerin elde edilen doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

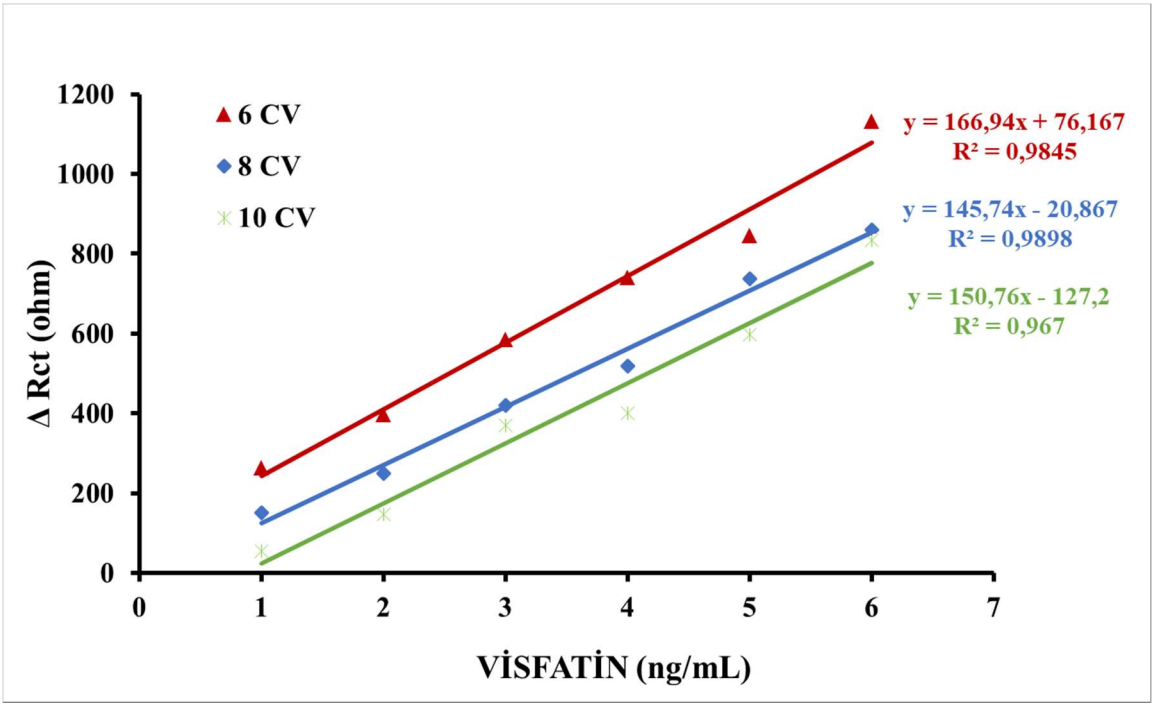
GLU KONSANTRASYONU	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	DOĞRU DENKLEMİ
0.02 M	0,9600	y=215,29x + 380
0.04 M	0,9600	y=228,97x + 307,6
0.06 M	0,9722	y=438,93x + 97,833
0.08 M	0,9867	y=349,31x - 47,067
0.1 M	0,9837	y=187,29x + 5,1
0.12 M	0,9723	y= 142,09x - 76,133

Polimerleşme için yüksek GLU konsantrasyonu kullanılması elektrot yüzeyinde daha fazla karboksil grubuna sebep olur, bu nedenle daha fazla antikor immobilizasyonu gerçekleşmesi beklenir. Bu durumda antikor antijen etkileşim sayısının da artmasıyla Rct

değerinin artacağı düşünülmektedir. Fakat fazla karboksil grubu oluşması aynı zamanda daha fazla BSA bağlanmasına da neden olacaktır. Yüzeyde fazla miktarda BSA bulunması ve glutamik asidin molekül ağırlığının büyük olması sebebi ile (147.13 g/mol) sterik engel oluşturmuş olabilir ve bu sebeple yüksek konsantrasyonlarda GLU çözeltisi kullanıldığında düzensiz bağlanmaların sayısı artmış, istenilen spesifik bağlanmaların sayısının ise azalmış olması olasıdır ve bu nedenle daha düşük Rct değerleri elde edilmiş olabilir. Diğer GLU konsantrasyonlarındaki Rct değerleri karşılaştırıldığında ise en iyi sonucu **0.08 M GLU** konsantrasyonu verdiğinden çalışmalara bu konsantrasyon ile devam edilmiştir.

4.2.2. Elektropolimerizasyon İşleminde Döngü Sayısı Optimizasyonu

Optimum GLU konsantrasyonu 0.08 M olarak belirlendikten sonra çalışma elektrodunun yüzeyi 6, 8, 10 döngü olacak şekilde elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilerek biyosensörler hazırlandı ve altı farklı visfatin konsantrasyonunda (1-6 ng/mL) impedans ölçümleri yapılarak her bir biyosensör için ayrı ayrı ΔRct değerleri hesaplanıp kalibrasyon grafikleri çizildi ve Şekil 4.5'de verildi. Bu grafikten yola çıkarak hesaplanan doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Aynı konsantrasyonda hazırlanan GLU çözeltisinin farklı döngü sayılarına göre verdiği cevaplar

Çizelge 4. 3. Aynı konsantrasyonda hazırlanan GLU çözeltisinin farklı döngü sayılarına göre verdiği cevapların doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

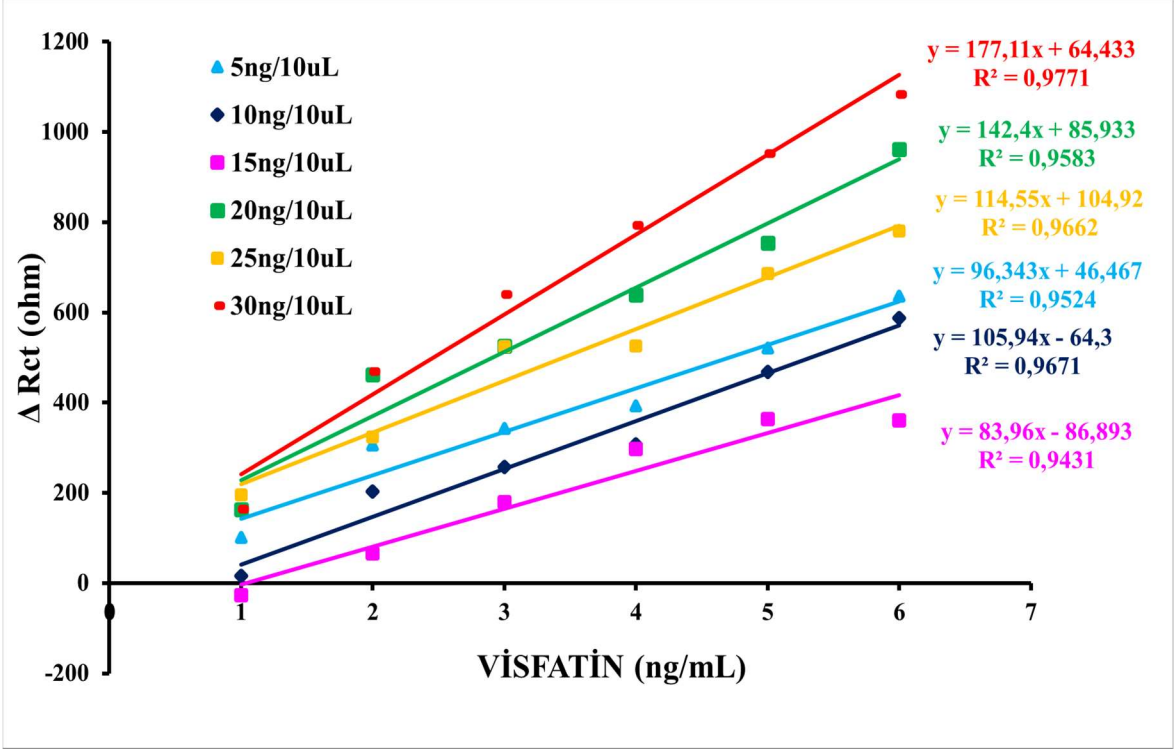
DÖNGÜ SAYISI	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	DOĞRU DENKLEMİ
6	**0,9845**	**y=166,94x + 76,167**
8	**0,9898**	**y=145,74x - 20,867**
10	**0,9670**	**y=150,76x - 127,20**

Elektrot yüzeyindeki polimerik tabaka antikorun immobilizasyonu ve antijeni etkin olarak bağlamasını etkiler. Döngü sayısı arttıkça polimerik tabakanın kalınlığı etkilenir. Çizelge 4.3'teki doğrusallık katsayılarından yola çıkarak 8 döngü ile yapılan elektropolimerizasyon işleminde diğer döngü sayılarına kıyasla daha iyi verim alınmıştır. Döngü sayısı fazla olduğunda elektrot yüzeyinde daha kalın bir tabaka oluşması beklenen bir sonuçtur fakat tabakanın kalınlaşmasıyla çalışma elektrodu yüzeyinde serbest

karboksil uçlarının üzerinin yeni oluşan glutamik asit polimeri tarafından kapatılması da olasıdır. Bu durumda biyosensörün hassasiyeti azalır. Bu sebeple çalışmalarımıza **8 döngü** sayısı ile devam edilmiştir.

4.2.3. Anti-visfatin Konsantrasyonun Optimizasyonu

Daha önceki çalışmalarda belirlenen optimum koşularda 5 ng/10 µL, 10 ng/10 µL, 15 ng/10 µL, 20 ng/10 µL, 25 ng/10 µL, 30 ng/10 µL anti-visfatin konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmış olan biyosensörler ile altı farklı visfatin konsantrasyonunda yapılan EIS ölçümlerinin Nyquist eğrilerinden elde edilen yük transfer direnci değerleri ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6'da ve bu grafikten elde edilen doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Anti-visfatin konsantrasyon optimizasyon basamağına ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4. 4. Anti-visfatin konsantrasyon optimizasyon sonucundan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

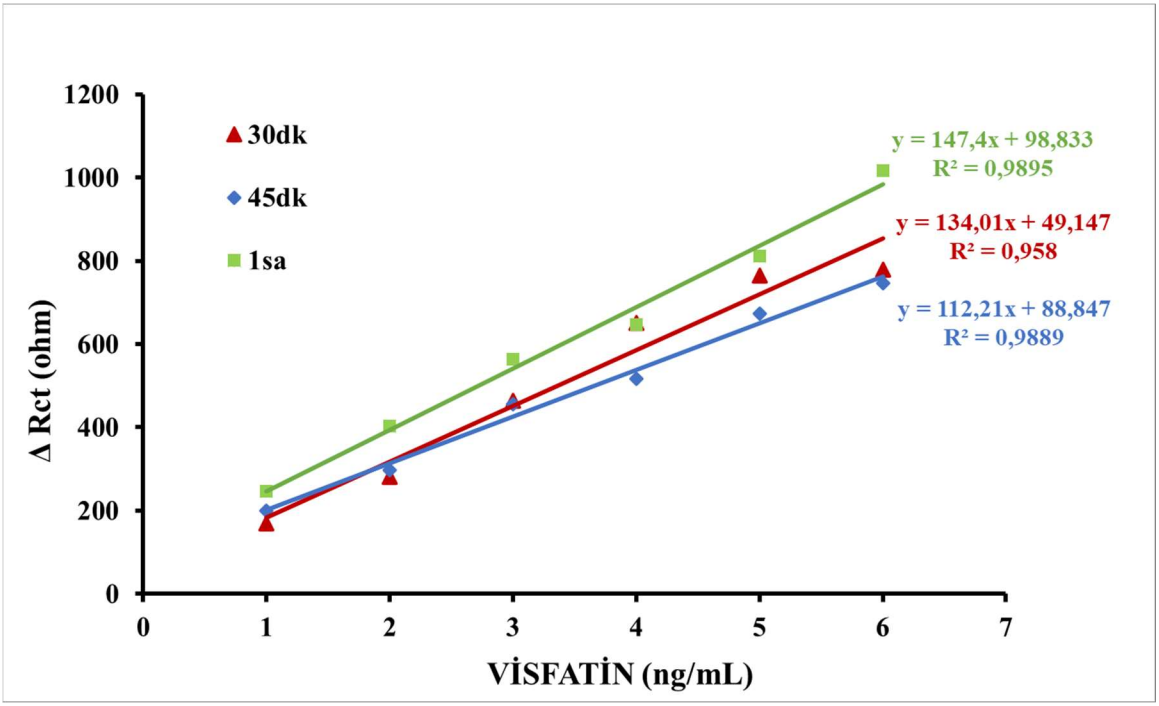
ANTİ-VİSFATİN KONSANTRASYONU (ng/10µL)	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	DOĞRU DENKLEMİ
5	**0,9524**	**y=96,343x + 46,467**
10	**0,9671**	**y=105,94x - 64,300**
15	**0,9431**	**y= 83,96x - 86,893**
20	**0,9583**	**y=142,4x + 85,933**
25	**0,9662**	**y=114,55x + 104,92**
30	**0,9771**	**y=177,11x + 64,433**

GC çalışma elektrodu yüzeyine immobilize edilen anti-visfatin miktarının artması elektrot yüzeyine yük transferini azaltır ve Rct değerinde artış görülür. Ancak daha fazla antikor bağlanması elektrot yüzeyinde yer alan polimer tabakanın bu yükü taşıyamaz hale gelmesine ve yüzeyde bozulmalara sebep olabilir. 30 ng/10 µL antikor kullanılarak hazırlanan biyosensörde göreceli olarak korelasyon katsayısı 10 ng/10 µL antikor kullanılarak hazırlanan biyosensörün korelasyon katsayısına yakındır. Fakat üç kat kazla antikor kullanımı biyosensörün maliyetini artırması sebebiyle tercih edilmemiştir. Bu sebeple çalışmalara **10 ng/10 µL anti-visfatin** konsantrasyonu ile devam edildi.

4.2.4. İnkübasyon Süre Optimizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde diğer immobilizasyon basamaklarının optimum konsantrasyonları kesinleştikten sonra daha doğrusal ve duyarlı sonuçlar elde etmek adına visfatinin maksimum verim ile bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlendi. Bu amaçla altı farklı visfatin konsantrasyon (1-6 ng/mL) aralığında visfatinin inkübasyon süreleri sırasıyla 30 dk, 45 dk ve 1sa olacak şeklide değiştirilerek biyosensör cevapları incelendi elde edilen Nyquist eğrilerinden belirlenen yük transfer direnci ve kalibrasyon grafiği

Şekil 4.7'de ve bu grafikten yola çıkarak hesaplanan doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri ise Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Visfatin inkübasyon süresi optimizasyon basamağına ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4. 5. Visfatin inkübasyon süresi optimizasyon basamağında belirlenen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

VİSFATİN İNKÜBASYON SÜRESİ	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	DOĞRU DENKLEMİ
30 dk	**0,9580**	**y=134,01x + 49,147**
45 dk	**0,9889**	**y=112,21x + 88,947**
1sa	**0,9895**	**y=147,4x + 98,8330**

Elektrodun yüzeyinde antijenin kalma süresi uzadıkça antikor tarafından bağlanma miktarının artması beklenir. Fakat yeterli süreye ulaştığı durumlarda biyosensör cevabında önemli bir artışın olmaması da olası sonuçtur. Bu sebeple elektrot yüzeyinde 30 dk bekletilen visfatinin yüzeyde daha az ve düzensiz bağlanmalar meydana

getirdiğinden Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere doğrusallık katsayısı düşük çıkmıştır. Doğrusallık katsayılarına ve doğru denklemlerine bakıldığında en iyi sonucu **1sa** inkübasyon süresi ile verdiğinden bu süre çalışma süresi olarak belirlenmiştir.

4.2.5. Tüm İmmobilizasyon Basamaklarının Optimum Çalışma Değerleri

Yukarıda açıklanan şekilde hazırlanan visfatin biyosensörünün geliştirilmesi esnasında yapılan immobilizasyon basamaklarının optimum çalışma değerlerinin hepsi Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. Çizelgede bulunan sonuçlar visfatin biyosensörünün analitik karakteristik özelliklerinin belirlenebilmesi neticesiyle gerçekleştirilen bundan sonra yapılacak tüm çalışmalarda kullanılmıştır.

Çizelge 4. 6. Visfatin biyosensörünün optimum çalışma şartları

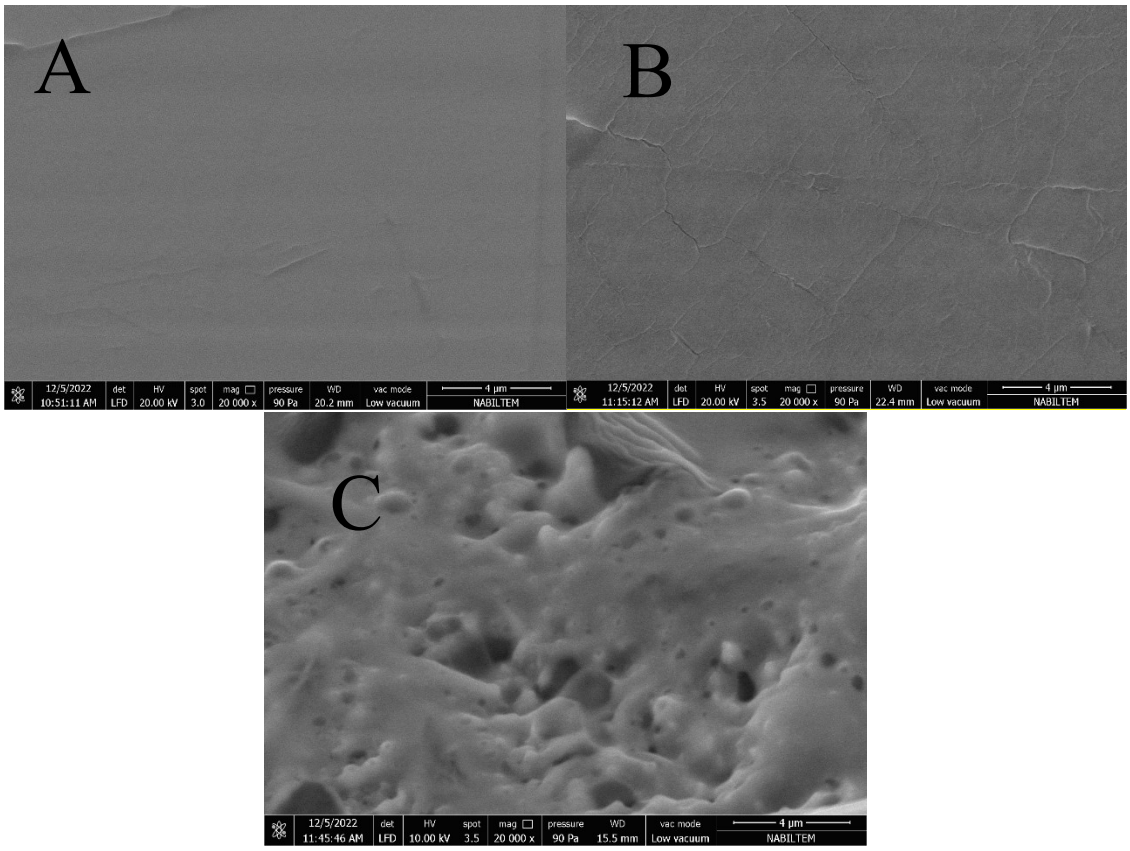
OPTİMİZASYON PARAMETRELERİ	OPTİMUM DEĞERLER
Glutamik asit konsantrasyonu	**0.08 M**
GLU döngü sayısı	**8**
Anti-visfatin konsantrasyonu	**10 ng/10 µL**
İnkübasyon süresi	**1 sa**

4.3. Biyosensörün Yüzey Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Tasarlanan biyosensörün immobilizasyon adımları sonrası elektrot yüzeyinde meydana gelen değişiklikler taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. SEM ile 20000 X büyütülmesiyle elde edilen görüntüler Şekil 4.8'de verilmiştir. Şekil 4.8(A) BARE GC çalışma elektrodu yüzeyini göstermektedir. Şekil

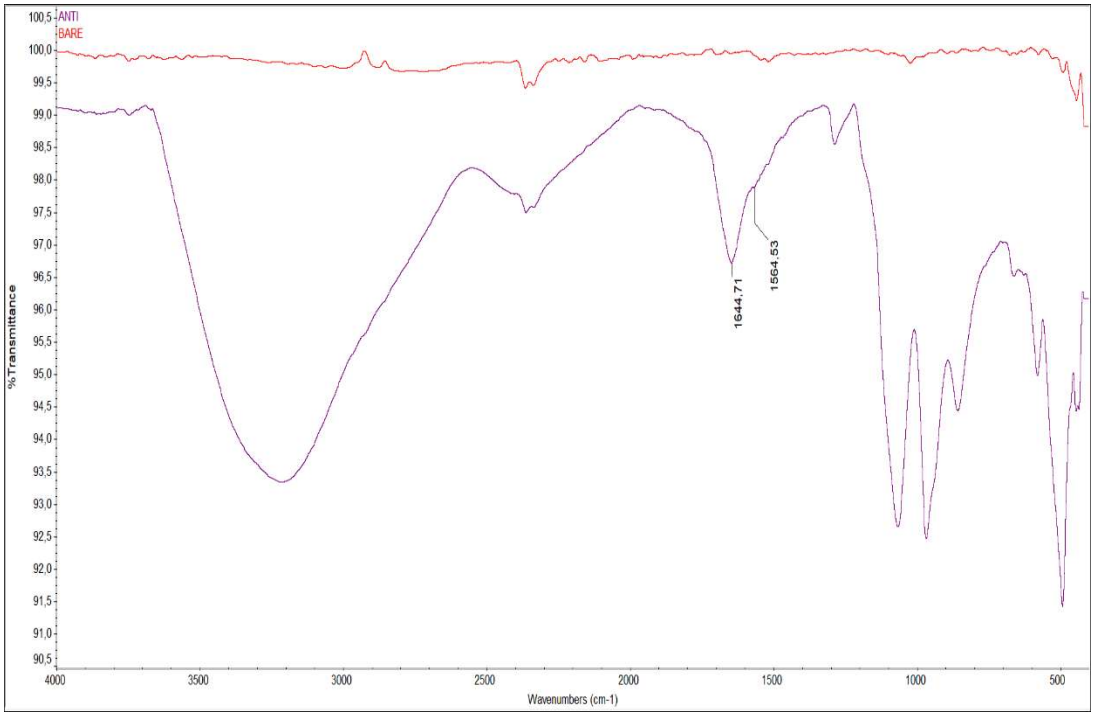
4.8(B) ise GC elektrot yüzeyinde GLU polimerleşmesi yapıldıktan sonra elde edilen SEM görüntüsüne aittir. Anti-visfatin immobilizasyonu sonrası elektrot yüzeyi ise Şekil 4.8(C)'de gösterilmektedir. Herbir immobilizasyon basamağından sonra elektrot yüzey görüntüsünde fark edilir değişimler gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Tasarlanmış olan biyosensörün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri (A) BARE GC, (B) GC-GLU, (C) GC-GLU-EDC/NHS-AntiVis

4.3.2. Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

BARE GC elektrot ve Anti-visfatin immobilizasyonu sonrasında elde edilen FTIR sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir.

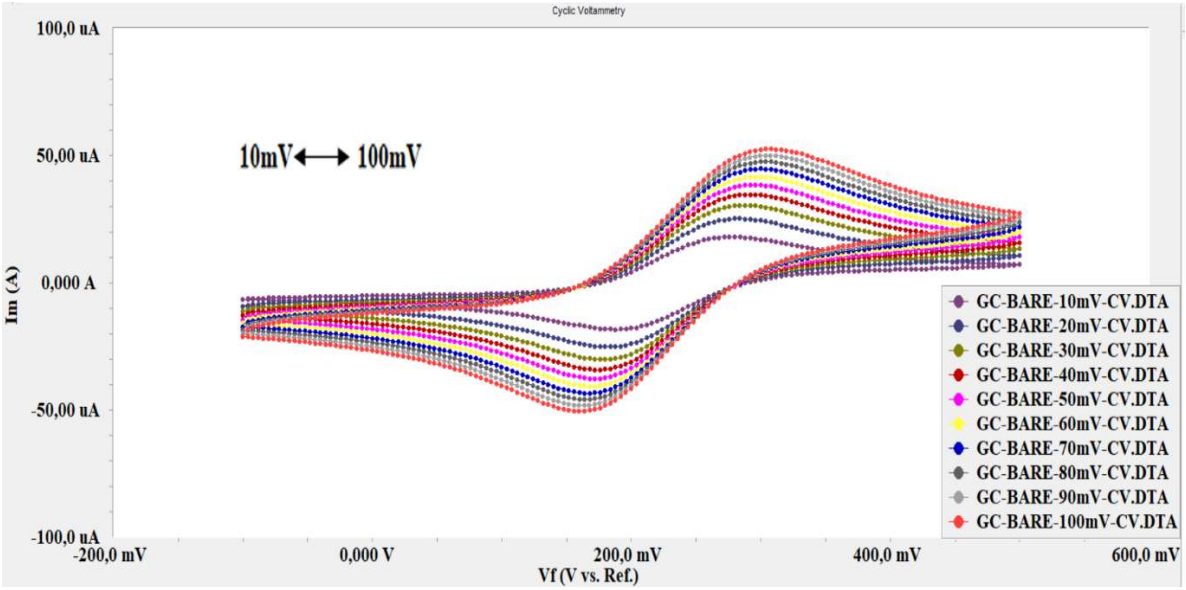


Şekil 4.9. BARE GC ve ANTI-Visfatin elektrotların FTIR spektrumları

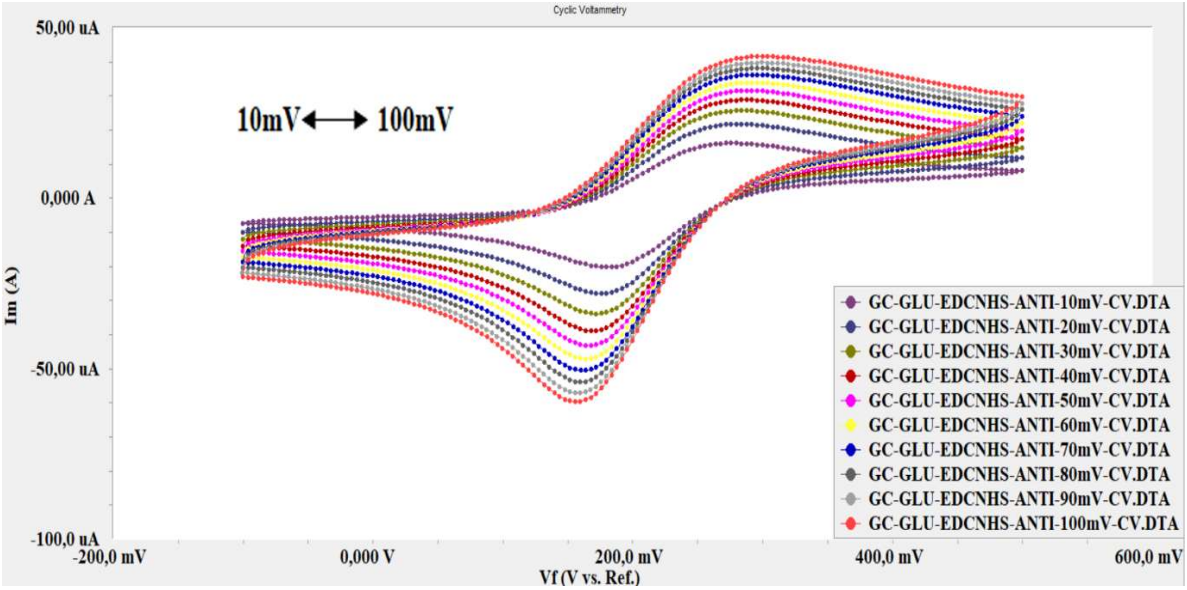
Şekil 4.9'da verilen FTIR spektrumundan görüldüğü gibi BARE GC elektrot yüzeyine ait spektrumda yer almayan 1644 cm^{-1} 'de C=O 87 gerilmesine ait (amid I) ve 1564 cm^{-1} 'de N-H bağına ait (amid II) karakteristik piklerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Sözkonusu bu pik değerleri, ANTI-Visfatin immobilizasyonu sonrasında elektrot yüzeyinde amid bağlarının oluştuğunu kanıtlamaktadır.

4.3.3. Biyosensör Yüzey Alanı Hesaplanması

Biyosensörün tasarım aşamasında çalışma elektrodu olan GC elektrodunun hangi oranda antikor ile kaplandığını tespit etmek amacı ile bare elektrot ve antikor bağlanmış olan elektrot kullanılarak 10 farklı potansiyelde (10→100) CV voltamogramlar ölçüldü. CV voltamogramlardan belirlenen sonuçların Laviron eşitliğine uygulanması ile çalışma elektrodu yüzeyinde ne oranda antikor kaplandığı tespit edildi.



Şekil 4.10. Bare elektrot ile 10 farklı potansiyel sonucunda belirlenen döngüsel voltamogramlar



Şekil 4.11. Tasarlanmış olan biyosensör ile 10 farklı potansiyel sonucunda belirlenen döngüsel voltamogramlar

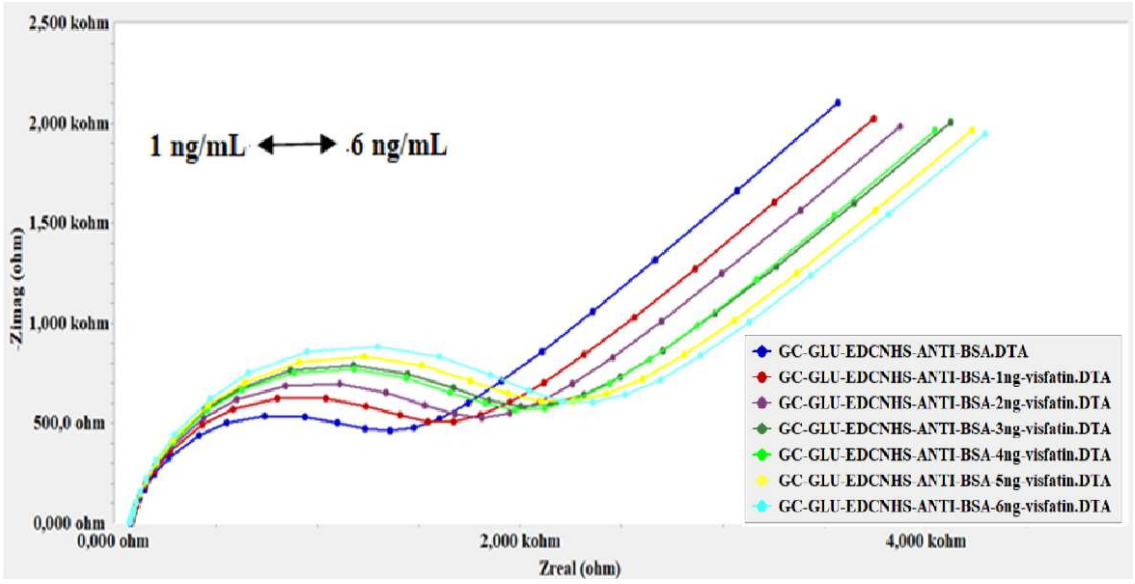
Uygulanan her bir potansiyel sonucunda belirlenen döngüsel voltamogramlardan katodik akımları hesaplanarak ve potansiyel-akım grafiklerinin eğimleri belirlenerek elde edilen veriler Laviron eşitliğine uygulandı. GC bare elektrot için yüzey alanı 3,8328 x 10^{-5} mol/cm^2 anti-visfatin immobilizasyonu sonrası elektrot yüzey alanı 4,5281 x 10^{-5} mol/cm^2 olarak hesaplandı. Bu değerler incelendiğinde antikor immobilizasyonu

sonrasında elektrot yüzey alanında bir artış söz konusudur. Bu artış, antikorun elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.

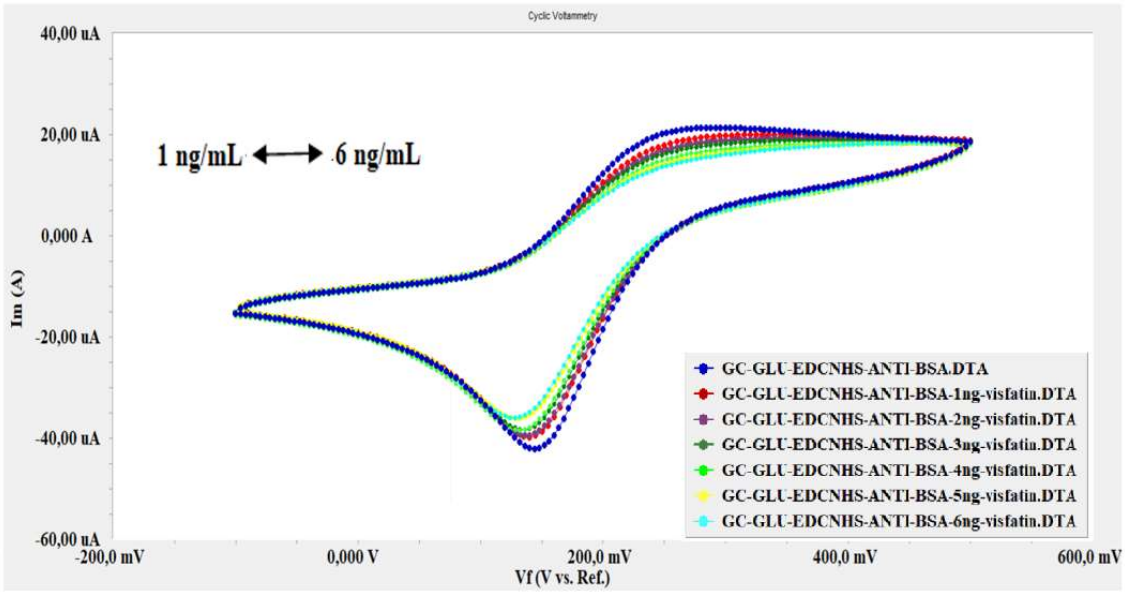
4.4. Visfatin Biyosensörünün Analitik Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.4.1. Doğrusal Tayin Aralığı

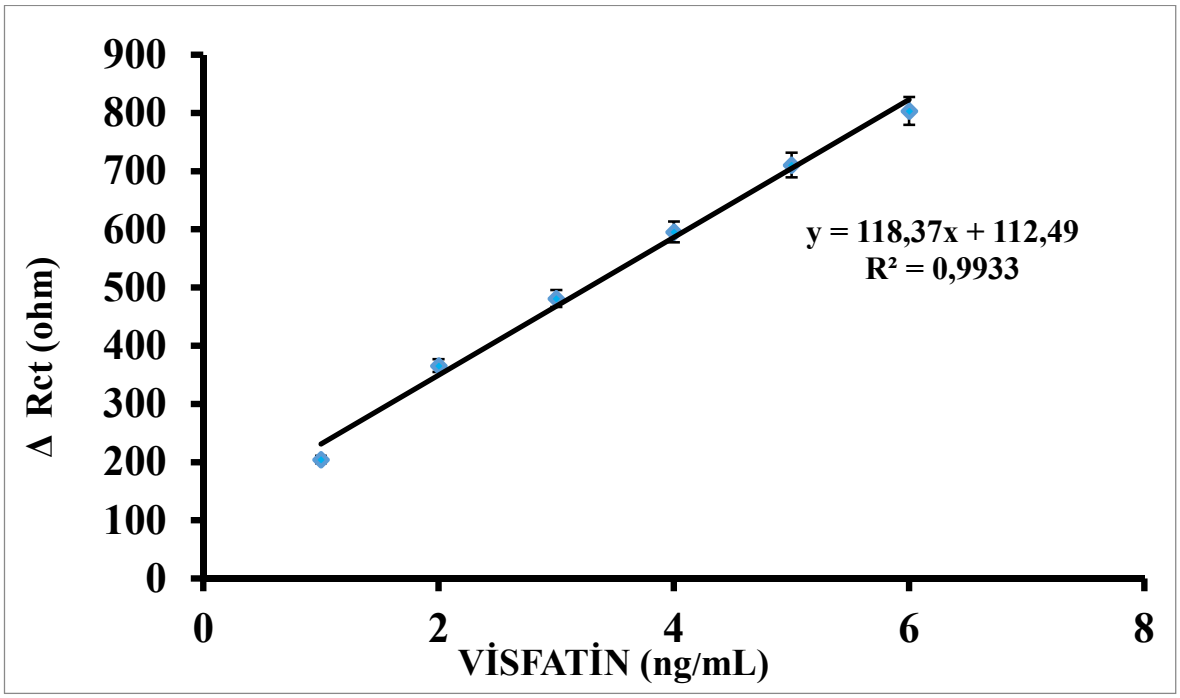
Visfatin biyosensörünün tasarım aşamalarında kullanılan tüm immobilizasyon materyallerinin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra biyosensörün hangi konsantrasyon aralığında en iyi cevabı verdiği belirlenmeye çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda optimum immobilizasyon şartlarında hazırlanan biyosensörler ile artan visfatin (1-6 ng/mL) konsantrasyonlarında EIS ölçümleri alındı. Rct değerlerinin aritmetik ortalamaları hesaplandı, ortalama Rct değerleri doğrultusunda kalibrasyon eğrisi çizildi ve Şekil 4.14'da doğrusal tayin aralığı grafiği olarak gösterildi.



Şekil 4.12. Biyosensörün 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığındaki Nyquist eğrileri



Şekil 4.13. Biyosensörün 1-6 ng/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları



Şekil 4.14. Biyosensörün kalibrasyon grafiği

GLU modifiyeli GC elektrotlarda immobilize edilen anti-visfatin ile analitin oluşturduğu komplekslerdeki visfatin konsantrasyon değeri arttıkça EIS ölçümünde elde edilen Nyquist eğrilerinin çapları da artmaktadır. Çaplardaki bu artış ile Rct değerindeki

artış bağlantılıdır. Rct değerindeki artış, antikor-antijen kompleksinden dolayı yüzey iletkenliğinin azalmasının bir göstergesidir. Şekil 4.12'de de görüldüğü üzere Nyquist eğrilerindeki çaplar yani Rct değerleri visfatin konsantrasyonu arttıkça atmaktadır. CV voltammogramlardaki tepe akımları, visfatin konsantrasyonundaki artışın elektrot yüzeyindeki iletkenliği azaltması sebebi ile gittikçe azalmaktadır (Şekil 4.13). Biyosensörün kalibrasyon grafiğine bakıldığında (Şekil 4.14) visfatin konsantrasyonu arttıkça biyosensör yanıtı da (ΔRct) lineer olarak artmaktadır. Böylece doğrusal tayin aralığı 1-6 ng/mL ve doğrusallık katsayısı R^2 = 0,9933 olarak belirlenmiştir.

Tespit limiti (LOD), bir analiz örneğinde tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu, tayin limiti (LOQ) ise makul kesinlik ve doğrulukla miktarlanabilen en düşük analit konsantrasyonudur (Shrivastava ve Gupta, 2011, Uhrovčík, 2014). Tasaralanan biyosensörün visfatin tayini için LOD ve LOQ değerleri standart grafiğin en küçük konsantrasyonunda yapılan 10 ölçüm sonucuna göre sırasıyla 0.236 ng/mL ve 0.787 ng/mL olarak hesaplandı. LOD ve LOQ hesabı aşağıda verilen eşitliklere göre yapıldı:

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

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

4.4.2. Tekrar üretilebilirlik ve Tekrarlanabilirlik çalışmaları

Geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliğini incelemek amacıyla dokuz ayrı biyosensör sistemi optimum koşullarda hazırlandı. Bu biyosensör sistemleri ile EIS ölçümleri, daha önce belirlenen doğrusal tayin aralığı konsantrasyonlarında yapıldı. Bu ölçümler sonucunda ortaya çıkan biyosensör cevapları doğrultusunda hesaplanan yük transfer direnci değerine karşılık konsantrasyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerdeki doğru denklemleri ile doğrusallık katsayıları Çizelge 4.7'de gösterildi.

Çizelge 4. 7. Visfatin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarının doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

BİYOSENSÖR NUMARASI	DOĞRU DENKLEMİ	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	TAYİN ARALIĞI (ng/mL)
1	**y = 129,27x + 93,833**	**R^2 = 0,9823**	**1-6**
2	**y = 125,41x + 136,53**	**R^2 = 0,9927**	**1-6**
3	**y = 89,514x + 98,729**	**R^2 = 0,9973**	**1-6**
4	**y = 121,71x + 6,8857**	**R^2 = 0,9844**	**1-6**
5	**y = 118,07x + 81,915**	**R^2 = 0,9938**	**1-6**
6	**y = 129,46x + 84,418**	**R^2 = 0,9960**	**1-6**
7	**y = 92,319x + 66,505**	**R^2 = 0,9981**	**1-6**
8	**y = 125,08x + 76,823**	**R^2 = 0,9950**	**1-6**

Çizelge 4.7'de gösterildiği üzere ölçümleri yapılan biyosensörlerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri birbirine oldukça yakın sonuçlar olup bu da tasarlanmış olan visfatin biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla 2, 3, 4 ve 5 ng/mL visfatin konsansantrasyonlarında 4'er tekrar ölçüm alındı. Alınan impedans ölçümlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarından seçilen konsantrasyonlarda ölçülen visfatin miktarlarının ortalaması alınarak standart sapmaları ve geri kazanımları hesaplandı, sonuçlar Çizelge 4.8'de verildi.

Çizelge 4. 8. Visfatin biyosensörünün tekrarlanabilirliği

EKLENEN VİSFATİN MİKTARI	BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLEN VİSFATİN MİKTARI (n=4)	STANDART SAPMA	GERİ KAZANIM (%)
2 ng/mL	**1.992 ng/mL**	**0.0750**	**99.60**
3 ng/mL	**2.976 ng/mL**	**0.1169**	**99.225**
4 ng/mL	**4.022 ng/mL**	**0.1916**	**100.5875**
5 ng/mL	**5.023 ng/mL**	**0.1232**	**100.47**

Çizelge 4.8'de verilen sonuçlara göre, tasarlanan biyosensörün 2, 3, 4 ve 5 ng/mL visfatin konsantrasyonlarında yapılan ölçümlerde visfatin konsantrasyonlarının oldukça yakın olarak tespit edebildiği, düşük standart sapmaya ve yüksek geri kazanıma sahip olduğu gösterildi.

4.4.3. Yapay Serumda Uygulama

Bu karakterizasyon aşamasında visfatin analizi için tasarlanmış olan biyosensör için ticari olarak satın alınan yapay serumda var olan protein ve ilave edilen 4,5 mM KCl, 5 mM $CaCl_2$, 145 mM NaCl gibi bileşenlere karşı biyosensör yanıtları incelendi. Böylece yapay serum içerisinde bulunan tuzların ve proteinin biyosensörün cevabına olan etkisi incelendi. Bu amaçla 4 farklı visfatin konsantrasyonu içeren yapay serum çözeltisinde optimize edilmiş koşullarda hazırlanan biyosensörlerle ölçümler yapıldı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔR_{ct} değerleri kullanılarak her bir örnekteki visfatin miktarı tayin edildi.

Çizelge 4. 9. Yapay serum uygulamasında visfatin analizi sonuçları

YAPAY SERUMDA VİSFATİN MİKTARI	BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLEN VİSFATİN MİKTARI	GERİ KAZANIM (%)
2 ng/mL	**1.9190 ng/mL**	**95.950**
3 ng/mL	**2.7718 ng/mL**	**92.393**
4 ng/mL	**3.9075 ng/mL**	**97.687**
5 ng/mL	**4.9454 ng/mL**	**98.908**

Çizelge 4.9'da 4 farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen visfatin analizi sonuçları yer alamaktadır. Çizelgeden de görüldüğü üzere serum içerisinde bulunan protein ve tuzlar biyosensör yanıtına etki etmemektedir. Bu sonuç tasarlanmış olan biyosensörün, serum örneklerinde visfatini hassas ve spesifik bir şekilde belirleme potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

Literatürde visfatin tayinine yönelik tek bir biyosensör tasarım çalışması yer almaktadır. Tasarlanan bu biyosensör altın elektrot yüzeyinde aptemer tabanlı bir kapasitör biyosensörüdür. Jee-Woong Park ve ark. 2012 yılında yapıkları tasarımda ssDNA aptamer tabanlı kapasitif biyosensör kullanılarak insan serumunda Nampt'ın (PBEF/visfatin) hızlı ve hassas tespiti için biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Spesifik olarak Napmt'ı bağlayan ssDNA aptamerleri SELEX işlemi kullanılarak üretilmiş ve Nampt'ı bağlama yetenekleri açısından yüzey plazmon rözenans (SPR) kullanılarak karakterize edilmiştir. Burada seçilen aptamer, Nampt'ın etiketsiz, reaktifsiz, kapasitif tespiti için kararlı ve güvenilir bir tanıma molekülü olarak kullanılmıştır. ssDNA aptamerlerini sensör yüzeyinde dielektrik özelliklerde, yüzey yük dağılımında ve iletkenlikte farklılıklara neden olan Faradaik olmayan sinyaller olarak ölçülen aptamer-Nampt kompleksi oluşturan Nampt proteinini spesifik olarak yakalamak için

kullanılmıştır. Tespit limiti ve kalibrasyon aralığı sırasıyla 1 ng/mL ve 1-50 ng/mL olarak bulunmuştur (Park vd., 2012).

Bu çalışmada ilk kez Visfatin tayinine yönelik olarak tasarlanan EIS temeline dayalı tekrar üretilebilirliği yüksek, ölçüm süresi oldukça hızlı, duyarlı, ucuz bulunabilir kimyasallar ile yapılan ve uygulanabilirliği kolay olan bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Tasarlanan biyosensör literatürde yer alan biyosensör ile değerlendirildiğinde ölçüm sistemleri, elektrot türleri ve tasarım kimyası açılarından tamamen farklı yöntemlerle tasarlanmış aynı amaca yönelik, daha hızlı, daha ucuz, daha hassas ve daha pratik farklı bir alternatif ölçüm sistemi olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Adeghate, E. (2008). Visfatin: Structure, Function and Relation to Diabetes Mellitus and Other Dysfunctions. *Current Medicinal Chemistry*. 15, 1851-62.

Akyılmaz, E. ve Yorgancı, E. (2008). A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 23:1874-7.

Alarie, J.P. & Vo-Dinh T. (1996). Antibody-based submicron biosensor for benzo[a]pyrene DNA adduct. *Polycyclic Aromatic Compounds*, Pages 45-52. Published online: 05 Oct 2006.

American Diabetes Association. (2014). Standards of medical care in diabetes-*Diabetes Care.* 37 Suppl 1:S14-80.

American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. (2017). *Diabetes Care. 40(Supplement* 1), S11–S24.

Arner, P. (2005a). Insulin resistance in type 2 diabetes – role of the adipokines. *Current Molecular Medicine*, 5:333–339.

Arner, P. (2005b). Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia*. 48:2203-5.

Arner, P. (2006). Visfatin: a true or false trail to type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* 91:28–30.

Aydın, S., Aksoy, A., Aydın, S., Kalaycı, M., Yılmaz, M., Kuloğlu, T., Çitil, C. ve Çatak, Z. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*, 30: 1-9.

Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S. & Rand, A.G. (2000). Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors and Bioelektronics,* 615-621, 11–12.

Baez-Duarte, B.G., Sánchez-Guillén, M.D., Pérez-Fuentes, R., Zamora-Ginez, I., Leon-Chavez, B.A., Revilla-Monsal, C. & Islas-Andrade, S. (2010). β-cell function is associated with metabolic syndrome in Mexican subjects. *Diabetes Metabolic Syndrome and Obesity*, 3, 301–309.

Bahadır, E.B. & Sezgintürk, M.K. (2015a). Electrochemical biosensors for hormone analyses, *Biosensors and Bioelectronics,* 68, 62e71.

Bahadır, E.B. & Sezgintürk, M.K. (2015b) Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta,* 132, 162e174.

Beltowski, J. (2006). ‘‘Apelin and visfatin: Unique ‘‘beneficial’’ adipokines upregulated in obesity?’’, *Medical Science Monitor*, 12:112-9.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X.L., Brownlee, M. & Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine,* 7(8):947-953.

Berndt, J., Kloting, N., Kralisch, S., et al. (2005). Plasma visfatin concentrations and fat depotspecific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 54:2911-6.

Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J. & Foster, M.T. (2016). Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation.* 26: 25-42.

Blumer, I., Hadar, E., Hadden, D.R., Jovanovič, L., Mestman, J.H., Murad, M.H. & Yogev, Y. (2013). Diabetes and pregnancy: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* 98(11):4227-4249.

Bonet, M.L., Oliver, P. & Palou, A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1831(5):969-85.

Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, … Valet, P. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 146, 1764.

Boz, B., Paylan, İ.C., Kızmaz, M.K. ve Erkan, S. (2017). Biyosensörler ve Tarım Alanında Kullanımı, *Journal of Agricultural Machinery Science*, 13 (3),141-148.

Brooks, N.L., Moore, K.S., Clark, R.D., Perfetti, R., Trent, C.M. & Combs, T. (2006). Do low levels of circulating adiponectin represent a biomarker or just another risk factor for the metabolic syndrome? *Diabetes, Obesity and Metabolism,* 9:246-258.

Budavari, S. (1996). The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12th ed*., Whitehouse Station*, NJ, Merck Co.

Bulut, Y. (2011 Mayıs). Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış. 6. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumunda sunulan bildiri, Fırat Üniversitesi, Elazığ. Erişim adresi: http://web.firat.edu.tr/iats/cd/subjects/automotive.html.

Chakraborty, A., Tibarewala, D.N. & Barui, A. (2019). Impedance-based biosensors, in: *Bioelectronics and Medical Devices,* pp. 97e122.

Chan, T.F., Chen, Y.L., Lee, C.H., et al. (2006). Decreased plasma visfatin concentrations in women with gestational diabetes Mellitus. *Journal Of The Society For Gynecologic Investigation,* 13:364-7.

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

Chen, X.D., Lei, T., Xia, T. (2004). Increased expression of resistin and tumour necrosis factoralpha in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 6:271-9.

Chen, M.P., Chung, F.M., Chang, D.M., Tsai, J.C., Huang, H.F., Shin, S.J. & Lee, Y.J. (2006). Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* 91: 295-299.

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

Combs, T.P., Pajvani, U.B., Berg, A.H., Lin, Y., Jelicks, L.A., Laplante, … Scherer, P.E. (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*,145(1):367-383.

Copps, K.D. & White, M.F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia,* 55(10), 2565–2582.

Cram, S.L., Spinks, G.M., Wallace, G.G., & Brown, H.R. (2002). Mechanism of electropolymerization of methyl methacrylate and glycidyl acrylate on stainless steel, *Electrochimica Acta*, 47,1935-1948.

Cram, S.L., Spinks, G.M., Wallace, G.G., & Brown, H.R. (2003a). Electrochemical polymerization of acrylics on stainless steel cathodes, *Journal of Applied Polymer Science,* 87, 765-773.

Cram, S.L., Spinks, G.M., Wallace, G.G., & Brown, H.R. (2003b). Electropolymerized acrylic coatings for polymer-metal adhesion enhancement on stainless steel cathodes, *Journal of Adhesion Science Technology,* 17 (10), 1403- 1423.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., … Kahn, C.R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine* 360: 1509-1517.

Çamlıbel, H. (2014). Karaciğer sirozu olan hastalarda serum visfatin, Hba1c, insülin, C peptid ve açlık kan şekeri (AKŞ) düzeyleri, Uzmanlık tezi, Harran Üniversitesi, İç Hastalıkları ABD, Şanlıurfa, Türkiye.

Çolak, Ö., Yaşar, A., Çete, S. ve Arslan, F. (2012). Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly (vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(5), 354-361.

Daviaud, D., Boucher, J., Gesta, S., Dray, C., Guigne, C., Quilliot, … Castan-Laurell, I. (2006). TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB Journal,* 20, 1528.

DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R.R., Herman, W.H., Holst, … Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus*. Nature Reviews Disease Primers.* 1, 15019.

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

Dinççağ, N. (2011). Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisinde Güncel Durum. *İÇ HASTALIKLARI Dergisi,* 18: 181-223. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul.

Dinçkaya, E. (1999). Enzim sensörleri. In Biyosensörler, *Biyokimya Yaz Okulu Kitabı*, (Ed. A Telefoncu):81- 142. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi.

Doğru, T., Sönmez, A. ve Taşçı, I. (2007). Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Research and Clinical Practice, Journal,* 76:24-29.

Dönmez, S., Arslan, F. ve Arslan, H. (2015). A Nucleic Acid Biosensor for Detection of Hepatitis C Virus Genotype 1a Using Poly(L-Glutamic Acid)-Modified Electrode. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 176:1431–1444.

El-Serag, H.B. & Everhart, J.E. (2002). Diabetes increases the risk of acute hepatic failure. *Gastroenterology,* 122:1822-8.

Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology,*115:911-9.

Feero, W.G., Guttmacher, A.E. & McCarthy, M.I. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *New England Journal of Medicine*, 363, 2339–2350.

Filippatos, T.D., Derdemezis, C.S., Gazi, I.F., et al. (2008). Increased plasma visfatin levels in subjects with themetabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation,* 38(1):71-2.

Fioravanti, A., Adamczyk, P., Pascarelli, N.A., Giannitti, C., Urso, R., Tolodziecki, M. & Ponikowska, I. (2015). Clinical and biochemical effects of a 3-week program of diet combined with spa therapy in obese and diabetic patients: A pilot open study. *International Journal of Biometeorology,* 59(7):783-89.

Frühbeck, G., Jebb, S.A. & Prentice, A.M. (1998). "Leptin: physiology and pathophysiology." *Clinical Physiology.* 18.5 : 399-419.

Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., et al. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science,* 307:426-430.

Garg, B.K., Raff, R.A.V., & Subramanian, R.V. (1978). Electropolymerization of monomers on metal electrodes, *Journal of Applied Polymer Science*, 22 (1), 65- 87.

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

Gross, A. (1998). Bacterial y-Poly(glutamic acid). *Biopolymers from Renewable Resources*, 3:195-219.

Grundy, S.M. (2000). Metabolic complications of obesity. *Endocrine*, 13(2), 155–165.

Grundy, S.M., Howard, B., Smith, S., Eckel, R., Redberg, R. & Bonow, R.O. (2002). Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: executive summary: conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. *Circulation.* 105:2231–2239.

Gualillo, O., González-Juanatey, J.R. & Lago, F. (2007). The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends in Cardiovascular Medicine, Journal.* (17):275-283.

Gümüş, P. ve Buduneli, N. (2013). Diabetes mellitus and periodontitis: signs of a bidirectional relationship. *European Medical Journal*. 30-36.

Haider, D.G., Schaller, G., Kapiotis, S., et al. (2006). The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetologia,* 49:1909-14.

Hammarstedt, A., Pihlajamaki, J., Sopasakis, V.R., Gogg, S., Jansson, P.A., Laakso, M. & Smith, U. (2006). Visfatin is an adipokine but it is not regulated by thiazolidinediones. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* 91:28–30.

Hassan, G.A., Sliem, H.A., Ellethy, A.T. & Salama, Mel-S. (2012). Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism,* 16(6), 904–909.

Haus, J.M., Solomon, T.P.J., Marchetti, C.M., O'Leary, V.B., Brooks, L.M., Gonzales, F. & Kirwan, J.P. (2009). Decreased visfatin after exercise training correlates with improved glucose tolerance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 41(6):1255-1260.

Heinonen, M.V., Purhonen, A.K., Miettinen, P., Paakkonen, M., Pirinen, E., Alhava, E., … Herzig, K.H., (2005). Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul.* Pept. 130, 7.

Hida, K., Wada, J., Eguchi, J. y cols. (2005). Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 102:10610-5.

Hivert, M.F., Sullivan, L.M., Fox, C.S., Nathan, D.M., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W. & Meigs, J.B. (2008). Associations of adiponectin, resistin, and TNF-alpha with insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(8): 3165–3172.

Horton, W.B. & Subauste, J.S. (2016). Care of the athlete with type 1 diabetes mellitus: a clinical review. *International Journal of Endocrinology and Metabolism,* 14(2):e36091.

International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas. 6th edition,* 2013. http://www.idf.org/diabetesatlas

International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, Available from: 2019,Ninth edition, 2019 https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF_Atlas_9th_Edition_2019.pdf.

Irigaray, P., Newby, J.A., Lacomme, S., et al. (2007). Overweight/Obesity And Cancer Genesis: More Than A Biological Link, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, 665-678.

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

ISPAD. (2000). Consensus Guidelines for the Management of Insulindependent Diabetes in Childhood and Adolescence. http://www.ispad.org/

Iyer, A., Fairlie, D.P., Prins, J.B., Hammock, B.D. & Brown, L. (2010). Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nature Reviews Endocrinology,* 6(2):71-82.

Iqbal, N., Seshadri, P., Stern, L. y cols. (2005). Serum resistin is not associated with obesity or insulin resistance in humans. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences,* Sci. 9:161-5.

Joshi, R.M. (2006). Biosensors, *Isha Books*, India.

Justino, C.I., Rocha-Santos, T.A. & Duarte, A.C. (2010). Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications, *Trends in Analytical Chemistry*, 29(10).1172e1183.

Kahn, S.E., Hull, R.L. & Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature,* 444(7121), 840-846.

Karayünlü, S., (2002). "Polipirol/Sülfolanmış Melamin Formaldehit Filmlerin Elektrokimyasal Olarak Eldesi ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmit, 4-40.

Karyakin , A.A. (2009). Biosensors, Sensors for Environment, *Health and Security,* 255.

Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, BJ., … Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17016.

Kim, C., Newton, K.M. & Knopp, R.H. (2002). Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care.* 25(10):1862-1868.

Kim, M.K., Lee, J.H., Kim, H., et al. (2006). Crystal structure of visfatin/pre-B cell colonyenhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anticancer agent FK-866. *Journal of Molecular Biology*. 362:66-77.

King, H., Aubert, R.E. & Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care,* 21:1414-1431.

Kloting, N., Berndt, J., Kralisch, S. y cols. (2006). Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 339:430-6.

Kocełak, P., Olszanecka-Glinianowicz, M., Owczarek, A.J., Krupa, W., Obirek, P., Bożentowicz-Wikarek, M., … Chudek, J. (2015). Plasma visfatin/nicotinamide

phosphoribosyltransferase (visfatin/NAMPT) concentration in elderly subjects with metabolic syndrome. *Polskie Archiwum Medycyny,* 125 (6): 402-413.

Koltai, E., Szabo, Z., Atalay, M., Boldogh, I., Naito, H., Goto, S., … Radak, Z. (2010). Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development,* (131):21-28.

Korsacılar, D. (2012). 'Metalik İmplant Malzeme Yüzeylerinin Elektropolimerizasyon Yöntemi ile Sentetik Hidrojel Polimerle Kaplanarak Biyouyumluluğunun Arttırılması' Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Kökbaş U., Kayrın L. ve Tuli A. (2013). Biosensors and their Medical Applications, *Archives Medical Review Journal,* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD, Adana, Turkey, 22(4):499-513.

Körner, A., Garten, A., Blüher, M., et al. (2007). Molecular characteristics of serum visfatin and differential detection by immunoassays. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92:4783-91.

Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., et al. (2005a). Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Endocrinology*, 185-8.

Kralisch, S., Klein, J., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., Fasshauer, M. (2005b). Therapeutic perspectives of adipocytokines. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 6:863-72.

Krause, S. (2007). Encyclopedia of electrochemistry. *Wiley VCH*, Weinheim. https://doi.org/10.1002/9783527610426.bard030206.

Lazcka, O., Del Campo, F.J. & Munoz F.X. (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics,* 22(7), 1205–1217.

Leung, M.Y., Carlsson, N.P., Colditz, G.A. & Chang, S.H. (2017). The Burden of Obesity on Diabetes in the United States: Medical Expenditure Panel Survey, 2008 to 2012. *Value Health.* 20(1): 77-84.

Lewandowski, K.C., Stojanovic, N., Press, M., et al. (2007). Elevated serum levels of visfatin in gestational diabetes: a comparative study across various degrees of glucose tolerance. *Diabetologia,* 50:1033-7.

Li, L., Yang, G., Li, Q., Tang, Y., Yang, M., Yang, H. & Li, K. (2006). Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes,* 114, 544.

Li, Y., Xu, W., Liao, Z., Yao, B., Chen, X., Huang, Z., … Weng, J. (2004). Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients is associated with improvement of beta-cell function. *Diabetes Care,* 27(11), 2597–2602.

Liedberg, B., Nylander, C. & Lundstrom, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*, Sensors and Actuators*, B4, 239-304.

Lin, Y., Liu, K., Liu, C., Yin, L., Kang, Q., Li, L. & Li, B. (2014). Electrochemical sensing of bisphenol a based on polyglutamic acid/amino-functionalised carbon nanotubes nanocomposite. *Electrochimica Acta,* 133: 492-500.

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

Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Karp, C.L., Brengman,M.L., Wang, D.J., … Diehl, A.M. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB Journal.*12: 57–65.

Luo, X. & Davis, J.J. (2013). Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers, *Chemical Society Reviews*. 42 (13). 5944e5962.

Macdonald, J.R. (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 223(1-2), 25-50.

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

Marks, J.B. & Raskin, P. (2000). Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *Journal of Diabetes and its Complications.* 14(2):108-115.

Martos-Moreno, G.Á, Kratzsch, J., Körner, A., Barrios, V., Hawkins, F., Kiess, W. & Argente, J. (2011). Serum visfatin and vaspin levels in prepubertal children: effect of obesity and weight loss after behavior modifications on their secretion and relationship with glucose metabolism. *International Journal of Obesity.* 35(10):1355-1362.

Mayes, A.G. (2002). Chapter 4: Immobilization chemistry of biological recognition molecules. *Biomolecular Sensors*, 49-86. E. Gizeli, and C. R. Lowe, eds. London, UK: Taylor & Frances.

Mc Ternan, P.G., Kusminski, C.M. & Kumar, S. (2006). Resistin. *Current Opinion in Lipidology,* 17:170-175.

Medina-Gómez, G. (2012). Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism,* 26(6):791-804.

Moran, A., Zhang, H.J., Olson, L.K., Harmon, J.S., Poitout, V. & Robertson, R.P. (1997). Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15. *Journal of Clinical Investigation,* 99(3), 534–539.

Moschen, A.R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M. & Niedderegger, H. (2007). Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *Journal of Immunology.*178:1748–1758.

Murphy, K.G. & Bloom, S.R. (2006). Are all fats created equal? *Nat Med*, 12: (1), 32-3.

Nise, N.S. (2007). Control Systems Engıneering, (With CD). *John Wiley & Sons.*

Nüsken, K.D., Nüsken, E., Petrasch, M., et al. (2007). Preanalytical influences on the measurement of visfatin by enzyme immuno assay. *Clinica Chimica Acta.* 382:154-6.

Ognjanovic, M., Stankovic, V., Knezevic, S., Antic, B., Vranjes-Djuric, S. & Stankovic, D.M. (2020). TiO_2/APTES cross-linked to carboxylic graphene based impedimetric glucose biosensor. *Microchemical Journal.* https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105150

Ognjanovic, S., Bao, S. & Yamamoto, S.Y. (2001). Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 26, 107 17.

Oğuz, A., Telci Çaklılı, O. & Tumerdem Calik, B. ve Investigators P. (2018). The Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) Study: *PURE Turkey*. Turk Kardiyol Dern Ars. 46: 613-23.

Oki, K., Yamane, K., Kamei, N., et al. (2007). Circulating visfatin level is correlated with inflammation, but not with insulin resistance. *Clinical Endocrinology,* 67:796-80.

Orazem, M. E. & Tribollet, B. (2008). Electrochemical impedance spectroscopy, *John Wiley & Sons Inc,* New Jersey, USA.

Otlu, B. (2011). Biyosensörler: Biyoreseptör Moleküller, *6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11),* 16-18 May 2011, Elazığ, Turkey.

Özcan, B. (2015). Bazı Hastalıkların Erken Teşhisi İçin Yeni Biyoalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi. Türkiye.

Özcan, B. & Sezgintürk, M.K. (2021a). A novel and disposable GP- based impedimetric biosensor using electropolymerization process with PGA for highly sensitive determination of leptin: Early diagnosis of childhood obesity. *Talanta,* Volume 225, 121985.

Özcan, B. & Sezgintürk, M.K. (2021b). Highly Sensitive and Single-Use Biosensing System Based on a GP Electrode for Analysis of Adiponectin, an Obesity Biomarker. *ACS Biomaterials Science & Engineering.* Volume; 7, Issue; 8, Page; 3658-3668.

Özdemir, M. & Arslan, H. (2014). Choline-sensing carbon paste electrode containing polyaniline (pani)–silicon dioxide composite-modified choline oxidase. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 42(1), 27-31.

Özlük, M.F. (2011). "Kontrol sistemleri laboratuarı için Matlab tabanlı eğitim seti", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Öztürk, Ş.B. (2010). "RLC filtre devrelerinin eğitimine yönelik Matlab Web Figure kullanılarak asp.net tabanlı web arayüzü tasarımı", Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Pagano, C., Marin, O., Calcagno, A. y cols. (2005). Increased serum resistin in adults with prader willi syndrome is related to obesity and not to insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90:4335-40.

Pagano, C., Pilon, C., Olivieri, M., et al. (2006). Reduced plasma visfatin/pre B-cell colony enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* 91:3165-70.

Pang, S.S. & Le, Y.Y. (2006). Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cellular & Molecular Immunology, Nature.* 3:29-34.

Park, J.W., Kallempudi, S.S., Niazi, J.H., Gürbüz, Y., Youn, B.S. & Gu, M.G. (2012). Rapid and sensitive detection of Nampt (PBEF/visfatin) in human serum using an ssDNA aptamer-based capacitive biosensor. *Biosensors and Bioelectronics.* (38): 233-238.

Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K.G., et al. (2008). Adipokines and Insulin Resistance, *Molecular Medicine,* 14(11-12):741-51.

Revollo, J.R., Grimm, A.A. & Imai, S. (2007). The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Current Opinion in Gastroenterology,* 23(2):164- 70.

Revollo, J.R., Körner, A., Mills, K.F., et al (2007). Nampt/PBEF/Visfatin regulates insülin secretion in β cell as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metabolism,* 6(5):363-75.

Richard, A. & Margaritis, A. (2001). Poly(glutamic Acid) for Biomedical Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 21:219-232.

Roden, M., Petersen, K. & Shulman, G. (2017). Insulin resistance in type 2 diabetes. *Textbook of Diabetes,* 174-186.

Romere, C., Duerrschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F., … Chopra, A.R. (2016). Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell*.165: 566-579.

Rubinstein, I. (1995). Physical electrochemistry Methods and Principles. *Marcel Dekker,* New York.

Saely, C.H., Geıger, K. & Drexel, H. (2010). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology,* 58: 15-23.

Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S. & McNiece, I. (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2):1431-7.

Sandeep, S., Velmurugan, K., Deepa, R., et al. (2007). Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. *Metabolism,* 56:565 70.

Satman, I., Yilmaz, T., Sengül, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., vd. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care,* 25(9):1551-1556.

Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinccag, N., vd. (2013). TURDEP-II Study Group. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of

diabetes and prediabetes in Turkish adults. *European Journal of Epidemiolog,* 2013;28(2):169-180.

Schaffler, A., Neumeier, M., Herfarth, H., Furst, A., Scholmerich, J. & Buchler, C. (2005). Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta,*1732:96-102.

Scott, A.M., Jedd, D., Wolchok, J.D. & Old L.J. (2012). Antibody Therapy of Cancer, *Nature Reviews,* 12: 278-287.

Sethi, J.K. & Vidal-Puig, A. (2005). Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends in Molecular Medicine, Cell Press*, 11(8):344-7.

Sezgintürk, M.K. (2012). Biyosensörlerde İmpedans Uygulamaları, *II. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı.*

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

Sheng, X., Rongli, Z., Wei, Z., Ye, Z., Wei, W., Xiaoya, L. & Jing, L. (2017). Self assembled polymeric nanoparticles film stabilizing gold nanoparticles as a versatile platform for ultrasensitive detection of carcino-embryonic antigen. *Biosensors and Bioelectronics* 92. 570–576.

Shrivastava, A. & Gupta, Vipin B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Review Article.* DOI: 10.4103/2229-5186.79345.

Sigal, R.J., El-Hashimy, M., Martin, B.C., Soeldner, J.S., Krolewski, A.S. & Warram, J.H. (1997). Acute postchallenge hyperinsulinemia predicts weight gain: a prospective study. *Diabetes,* 46(6), 1025–1029.

Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. (1997). Principles of Instrumental Analysis, *Brooks/Cole,* A.B.D.

Sommer, G., Garten, A., Petzold, S., et al. (2008) Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clinical Science,* 115:13-23

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown. E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M. … Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature,* 409:307 312.

Su, L., Jia, W., Hou, C. & Lei, Y. (2011). ‘‘Microbial biosensors,’’ a review. *Biosensors and Bioelectronics,* 26(5), 1788-1799.

Sullivan, P.W., Morrato, E.H., Ghushchyan, V., Wyatt, H.R. & Hill, J.O. (2005). Obesity, inactivity, and the prevalence of diabetes and diabetes-related cardiovascular comorbidities in the U.S., 2000-2002. *Diabetes Care,* 28(7), 1599–1603.

Tabák, A.G., Jokela, M., Akbaraly, T.N., Brunner, E.J., Kivimäki, M. & Witte, D.R. (2009). Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *The Lancet*, 373(9682), 2215–2221.

Tan, B.K., Chen, J., Digby, J.E., et al. (2006). Increased visfatin messenger ribonucleic acid and protein levels in adipose tissue and adipocytes in women with polycystic ovary syndrome: parallel increase in plasma visfatin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91:5022- 8.

Tatemoto, K. (2000). Search for an endogenous ligand of the orphan G protein-coupled receptor--discovery of apelin, a novel biologically active peptide, Nihon rinsho. *Japanese Journal of Clinical Medicine*, 58(3):737-746.

Tekin Ş. (2008). Platin elektrot yüzeylerine tutturulmuş organik moleküllerin elektrokimyasal tekniklerle pka değerlerinin tayini. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Telefoncu, A., (2008). Biyosensörlere Genel Bakış ve Biyosensör Uygulamalarında Son Gelişmeler, Ege Üniversitesi Biyosensör Yaz Okulu Kitabı, İzmir.

Thanakun, S., Watanabe, H., Thaweboon, S. & Izumi, Y. (2014). Comparison of salivary and plasma adiponectin and leptin in patients with metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome,* 6: 19.

The National Cholesterol Education Program (NCEP), (2002).

Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. & Wilson, G.S. (2001). ElectrochemicalBiosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosensors and Bioelectronics*,16 (1–2), 121-131.

Töre, F. & Tunçel, N. (2007). Protein pieces of adipose tissue secretory puzzle. *Biomedical Reviews,* 18: 27-43.

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

Türker, M. ve Süzmeçelik, E. (2010). Türkiye ve Dünyada Rakamlarla Diyabet, *Mised sayı 23-24. Sayfa: 63.*

TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi. (2019).

T.C. Sağlık Bakanlığı: Türkiye Diyabet Programı (2015-2020).

Uhrovčík, J. (2014). Strategy for determination of LOD and LOQ values--some basic aspects. *Talanta.* 119:178-80.

Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., … Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine*, 360(15):1500-8.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. & Adley K. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances,* 28(2), 232–254

Wisse, B.E., Ogimoto, K., Morton, G.J., et al. (2004). Physiological regulation of Hypothalamic IL-1β gene expression by leptin and glucocorticoids: implications for Energy homeostasis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,* 287:1107-13.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K. … Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine,* 7(8):941-946.

Yang, W., Li, Y., Wang, J.Y., Han, R. & Wang, L. (2018). Circulating levels of adipose tissue-derived inflammatory factors in elderly diabetes patients with carotid atherosclerosis: a retrospective study. *Cardiovascular Diabetology,* 17(1):75.

Yeşil, M., Dönmez, S. ve Arslan, F. (2016). Development of an electrochemical DNA biosensor for detection of specific Mycobacterium tuberculosis sequence based on poly(L-glutamic acid) modified electrode. *Journal of Chemical Sciences,* 128:1823-1829.

Xiao-Zi, Y., Song, C., Wang, H. & Zhang, J. (2010). Elektrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells, *Springer,* New York, pp 39-93.

Yüksel, İ. (2001). Otomatik Kontrol Sistem Dinamiği ve Denetim Sistemleri. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basım Evi.

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

Zhang, L., Chen, C., Zhou, N., Fu, Y. & Cheng, X. (2019). Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clinica Chimica Acta,* 489: 183-188.

Zhu, J., Schott, M., Liu, R., et al. (2008). Intensive glycemic control lowers plasma visfatin levels in patients with type 2 diabetes. *Hormone and Metabolic Research,* 40(11): 801-5.

Xydakis, A.M., Case, C.C., Jones, P.H. y cols. (2004). Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89:2697-703.

ÖZGEÇMİŞ

16.08.1994 yılında İstanbul'da dünyaya geldim. Lise eğitimime Bayrampaşa Tuna Lisesi'nde başlayıp 2012 yılında mezun oldum. Ardından 2013 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazanarak 2018 yılında mezun oldum. Trakya Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime 2019 yılında başladım ve halen devam etmekteyim. Yüksek Lisans eğitimime başladığım aynı yıl Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi yenidoğan TPN Ünitesi'nde kimyager olarak işe başladım ve halen devam etmekteyim.

Sabriye KÖKSAL