T.C.
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELEKTROKİMYASAL CA 125 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Soner AKTAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Soner AKTAN tarafından hazırlanan **“**ELEKTROKİMYASAL CA 125 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması 24/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Jüri Üyeleri

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "ELEKTROKİMYASAL CA 125 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (24/07/2020).

Soner AKTAN
(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELEKTROKİMYASAL CA 125 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Soner AKTAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Bu araştırmada, bir kanser biyobelirteci olan kanser antijen 125'in (CA 125) elektrokimyasal tayini için yeni bir immünosensör geliştirilmiş ve insan kan serumu numunelerinde uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) ilk olarak indirgenmiş grafen oksit (RGO) ile modifiye edilmiş ardından elektropolimerizasyon tekniği uygulanarak elektrot yüzeyi politiyonin ile kaplanmış, son olarak elektrodepozisyon ile altın nanoparçacıklar (AuNP) yüzeyde oluşturulmuştur. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV), kare dalga voltametri (SWV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) metotları kullanılarak yapılmıştır. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotların yüzeyine Anti-CA 125'nin immobilizasyonu 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA) ve 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid/N-hidroksisüksinimid (EDC/NHS) kullanılarak kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan CA 125 immünosensörünün optimum çalışma parametreleri DPV ve EIS metotları ile belirlenmiş ve optimum Anti-CA 125 konsantrasyonu 66,66 µg/mL, optimum Anti-CA 125 inkübasyon süresi 45 dk ve optimum CA 125 inkübasyon süresi 30 dk olarak bulunmuştur. Optimum şartlarda elektrokimyasal CA 125 immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu yapılmıştır. EIS, DPV ve SWV metotları ile belirlenen doğrusal tayin aralıkları 1-100 $pg.mL^{-1}$, tespit limitleri sırasıyla 0,0012 $ng.mL^{-1}$, 1,61 $pg.mL^{-1}$ ve 1,68 $pg.mL^{-1}$ olarak belirlenmiştir. CA 125 immünosensörünün tekrarlanabilirliği 50 $ng.mL^{-1}$ CA 125 konsantrasyou için test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri EIS, DPV ve SWV metotları için sırasıyla %3,34 (n=10), %2,03 (n=10) ve %1,48 (n=10) olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen CA 125 immünosensörünün uygulama kararlığı 60 gün boyunca, depolama kararlığı ise 12 hafta depolama süresince voltametrik metotlarla incelenmiştir. CA 125 immünosensörünün seçiciliği 9 farklı antijen karışımı varlığında CA 125'in analizinin yapılmasıyla test edilmiş ve antijen karışımının % 4,97'lik bir girişim yaptığı bulunmuştur. Hazırlanan CA 125 immünosensörleri insan kan serumu

örneklerine bilinen miktarda ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki CA 125'in analizi için kullanılmış ve %95'in üstünde geri kazanımlar elde edilmiştir.

2020, 69 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Elektrokimyasal CA 125 immünosensörü, kanser biyobelirteci, indirgenmiş grafen oksit, politiyonin, altın nanopartikül, yüzey baskılı karbon elektrotlar

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL CA 125 IMMUNOSENSOR

Soner AKTAN

Cankiri Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisors: Assist. Prof. Dr. Melike BILGI KAMAC

In this study, a new immunosensor was developed for the electrochemical determination of cancer antigen 125 (CA 125) that is a cancer biomarker and its application was performed on human blood serum samples. In this work, firstly the screen printed carbon electrodes (SPCE) were modified with reduced graphene oxide (RGO), then the electrode surface was coated with poly(thionine) by applying the electropolymerization technique, and finally, gold nanoparticles (AuNP) were created by electrodeposition on the surface. Electrochemical characterizations of the SPCE/RGO/PTH/AuNP electrode were performed using cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), square wave voltammetry (SWV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) methods. Immobilization of Anti-CA 125 to the surface of SPCE/RGO/PTH/AuNP electrodes were carried out by covalent binding method using 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide/N-hydroxy succinimide (EDC/NHS). The optimum working parameters of the prepared CA 125 immunosensor were determined by DPV and EIS methods. The optimum Anti-CA 125 concentration, incubation time of Anti-CA 125 and incubation time of CA 125 were found to be 66.66 µg/mL, 45 min and 30 min, respectively. The analytical characterization of electrochemical CA 125 immunosensors were performed under the optimum working parameters. It was calculated that the linear ranges were 1-100 $pg.mL^{-1}$ by EIS, DPV and SWV methods, limit of detections (LOD) were 0.0012 $ng.mL^{-1}$, 1.61 $ng.mL^{-1}$ and 1.68 $ng.mL^{-1}$, respectively. The repeatability of the CA 125 immunosensor was tested for 50 $ng.mL^{-1}$ CA 125 concentration and relative standard deviation (R.S.D.) values were calculated as 3.34% (n = 10), 2.03% (n = 10) and 1.48% (n = 10) for EIS, DPV and SWV methods, respectively. The operation stability of the developed CA 125 immunosensor was examined by voltammetric methods for 60 days, and the storage stability for 12 weeks. The selectivity of the CA 125 immunosensor was tested by performing CA 125 analysis in the presence of 9 different antigen mixes and it was found that the antigen mixture made a 4.97%

interference. The prepared CA 125 immunosensors were used for the analysis of different concentrations of CA 125 added to the human blood serum samples in a known amount and over 95% recoveries were obtained.

2020, 69 pages

KEYWORDS: Electrochemical CA 125 immunosensor, cancer biomarker, reduced graphene oxide, poly(thionine), gold nanoparticle, screen printed carbon electrodes

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ'a,

İlk günden bu yana engin bilgi ve tecrübesiyle bu çalışmada desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Tez çalışmalarımı yürütmemde yardım eden ve manevi desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN'a, laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Merve YILMAZ'a,

Bölümümüzün her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne,

Her anımda yanımda olup bana destek Y.Lisans öğrencisi eşim Ayla YILMAZ AKTAN'a, her an desteğini arkamda hissettiğim lisans yıllarından beri bir arada olduğumuz Y.Lisans arkadaşım Kadir ERDEM'e, büyük bir inanç ve sevgiyle benden desteklerini eksik etmeyen anne ve babama,

Ve doğduğu günden beri sevgisiyle, bana verdiği enerjiyle bu yüksek lisansı bitirmemde desteği olan biricik oğlum Aren AKTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 118R030 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çalışmamı maddi açıdan destekledikleri için TÜBİTAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Soner AKTAN
Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ i
ÖZET……..... ii
ABSTRACT iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER ve kısaltmalar DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
1.GİRİŞ 1
1.1. Biyosensörler 1
1.1.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 2
1.1.2. Biyosensörlerin Temel Özellikleri 3
1.1.3. Biyosensörlerin Uygulama Alanları 4
1.1.4. Biyomateryallerin İmmobilizasyonu 4
1.2. İmmünösensörler 7
1.3. Kanser 8
1.3.1. Yumurtalık Kanseri 9
1.4. Biyobelirteçler 10
1.5. CA 125 (Kanser Antijen 125) 11
1.6. Elektroanalitik Yöntemler 12
1.6.1. Dönüşümlü Voltametri (CV) 12
1.6.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) 14
1.6.3. Kare Dalga Voltametrisi (SWV) 15
1.7. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) 16
1.8. Politiyonin (PTH) 17
1.9. İndirgenmiş Grafen Oksit (RGO) 18
1.10. Kloro Aurik Asit ($HAuCl_4$) 19
2. KAYNAK TARAMALARI 20
3. MATERYAL ve METOT 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar 23
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Materyaller 23
3.1.3. Elektrokimyasal Ölçüm Sistemi 23
3.1.4. Kullanılan Elektrotlar, Konnektörler ve Elektrokimyasal Hücre 25
3.1.4.1. Kullanılan Elektrotlar 25
3.1.4.2. Kullanılan Konnektörler 25
3.1.4.3. Kullanılan Elektrokimyasal Hücre 26
3.2. Metot 27
3.2.1. Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi 27
3.2.2. Destek Elektrolit Tampon Çözeltisinin Hazırlanması 27
3.2.3. SPCE'lerin RGO ile Modifikasyonu 27
3.2.4. SPCE/RGO Üzerinde Politiyonin (PTH) Hazırlanması 28
3.2.5. SPCE/RGO/PTH'lerin AuNP ile Modifikasyonu 28
3.2.6. Kovalent Bağlama Yöntemi ile CA 125 İmmünösensörünün Hazırlanması 29
3.2.6.1. SPCE/RGO/PTH/AuNP'lerin 3-MPA ve EDC-NHS ile Aktivasyonu ... 29
3.2.6.2. SPCE'ler Üzerinde Anti CA 125 Antikorunun Tutuklanması 29

3.2.7. SPCE'lerin BSA ile Modifikasyonu 29
3.2.8. CA 125 Antijeninin Tutuklanması 30
3.2.9. Elektrokimyasal Ölçümler 30
4. BULGULAR 32
4.1. SPCE'lerin İndirgenmiş Grafen Oksit ile Modifikasyonu 32
4.2. SPCE/RGO/PTH/AuNP Elektrodunun Elektrokimyasal Karakterizasyonu 32
4.3. CA 125 İmmunosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu 36
4.4. CA 125 İmmünösensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi 39
4.4.1. Anti-CA 125 Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu 39
4.4.2. Anti-CA 125 Antikor İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu 42
4.4.3. CA 125 Antijen İmmobilizasyonunun Süre Optimizasyonu 42
4.5. Analitiksel Karakterizasyon 43
4.6. Seçicilik Testi 56
4.7. Gerçek Numune Analizi 57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 59
KAYNAKLAR 64
ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3-MPA	3-Merkaptopropiyonik Asit
AFP	Alfa feto protein
AP	Alkalin fosfataz
AuNP	Altın Nanopartikül
BSA	Sığır serum albümin
CALCITONIN	Kalsitonin
CA 12-5	Kanser Antijen 12-5
CA 15-3	Kanser Antijen 15-3
CA 19-9	Kanser Antijen 19-9
CA 125	Kanser Antijen 125
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CT	Bilgisayar Tomografisi
CV	Dönüşümlü Voltametri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
dsDNA	Çift Sarmallı Deoksiribonükleik Asit
EBV	İnsan Herpes Virüsü
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetil amino propil karbodiimid)
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektrokopisi
GNEE	Üç Boyutlu Altın Nanoelektrotlar
GOD	Glukoz Oksidaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropini
HE4	İnsan Epididim Proteini 4
HOPG	Pirolitik Grafit
HSP70	70 kilodaltonluk ısı şoku proteini
MAGE1	Melanom ile ilişkili antijen 1
MR	Magnetic Rezonans
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NEA	Nano-elektrot dizisi
NHS	N-hidroksisüksinimid
NPs	Nanohibrit Tabanlı Matris
NRs-Au	Altın Nanohibritleri
OC	Over (Yumurtalık) Kanseri
PAK2	Serin / treonin-protein kinaz 2
PAP	Rahim Ağzı Kanser Antijeni
PET	Pozitron Elektron Tomografisi
PSA	Prostat Spesifik Antijeni
PTH	Politiyonin
RGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
RLS	Döner-doğrusal Hareket Sensörleri
RNA	Ribonükleik Asit
SOX2	SRY (cinsiyet belirleme bölgesi Y) -kutu 2
SPCE	Yüzey Baskılı Karbon Elektrot
STIP1	Fosfoprotein 1
SWV	Kare Dalga Voltametrisi

TRAP1	Mitokondriyal ısı şoku proteini 75 kDa
ZnO	Çinko Oksit
WE	Çalışma Elektrodu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin genel gösterimi 1
Şekil 1.2. Etiketsiz İmmünösensörler 7
Şekil 1.3. Etiketli İmmünösensörler. 8
Şekil 1.4. Yumurtalık Kanserinin Gösterimi 10
Şekil 1.5. Dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi 13
Şekil 1.6. Dönüşümlü voltametride akım-potansiyel eğrileri 13
Şekil 1.7. Diferansiyel puls voltametrisinde a) uyarma sinyali ve b) elde edilen 15
voltamogram ($\Delta i = ES_2 - ES_1$) 15
Şekil 1.8. (A) Potansiyel dalga formu, (B) bir potansiyel döngü ve (C) kare dalga voltametrisinde tipik bir voltammogram 16
Şekil 1.9. İmpedans vektörünün belirtildiği Nyquist Eğrisi 17
Şekil 1.10. Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksitin Yapısı 19
Şekil 3.1. Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat 24
Şekil 3.2. Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA 24
Şekil 3.3. Yüzey baskılı karbon elektrotların yapısı 25
Şekil 3.4. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konnektör (kesikli analiz için kablo şeklinde) 26
Şekil 3.5. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konnektör (damlamalı analizler için kutu şeklinde) 26
Şekil 3.6. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre 27
Şekil 3.7. DropSens mikrostat 400 bipotansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi. 30
Şekil 3.8. Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi. 31
Şekil 4.1. SPCE/RGO (A) ve yalın SPCE (B) elektrotlarının SEM görüntüleri 32
Şekil 4.2A. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen dönüşümlü voltamogramları 33
Şekil 4.2B. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,3 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları. 34
Şekil 4.2C. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları. 34
Şekil 4.2D. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları (EIS: 0.5–50000 Hz). 35
Şekil 4.3A. CA125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,5 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125. 37

Şekil 4.3B. CA125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,3 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125. 37
Şekil 4.3C. CA 125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125. 38
Şekil 4.3D. CA125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125 (EIS: 0,5–50000 Hz). 38
Şekil 4.4A. Anti-CA 125'in farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/MPA/Anti-CA 125/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki CA 125 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 40
Şekil 4.4B. Anti-CA 125'in farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/MPA/Anti-CA 125/BSA immunosensörünün farklı konsatrasyonlardaki CA 125 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 41
Şekil 4.5A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 1 ile 100 pg/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği 43
Şekil 4.5B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 1 ile 100 pg/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 44
Şekil 4.5C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 1 ile 100 pg/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 44
Şekil 4.6A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği 45
Şekil 4.6B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 0,01 ile 2,5 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 45
Şekil 4.6C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 0,01 ile 2,5 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 46
Şekil 4.7A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 10 ile 50 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği 46
Şekil 4.7B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 10 ile 50 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 47

Şekil 4.7C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 10 ile 50 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 47
Şekil 4.8A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 50 ile 500 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği 48
Şekil 4.8B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 50 ile 500 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 48
Şekil 4.8C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 50 ile 500 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği 49
Şekil 4.9. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA immünosensörünün 50 ng/mL CA125 derişimine karşı elde edilen ortalama % bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği 55
Şekil 4.10. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125 immünosensörünün 50 ng/mL CA125 derişimine karşı elde edilen ortalama % bağıl akım değerleri-hafta sayısı grafiği 56
Şekil 4.11. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile CA 125 ve antijen karışımına karşı elde edilen % ortalama bağıl akım grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 57

ÇİZELGELER DİZİNİ

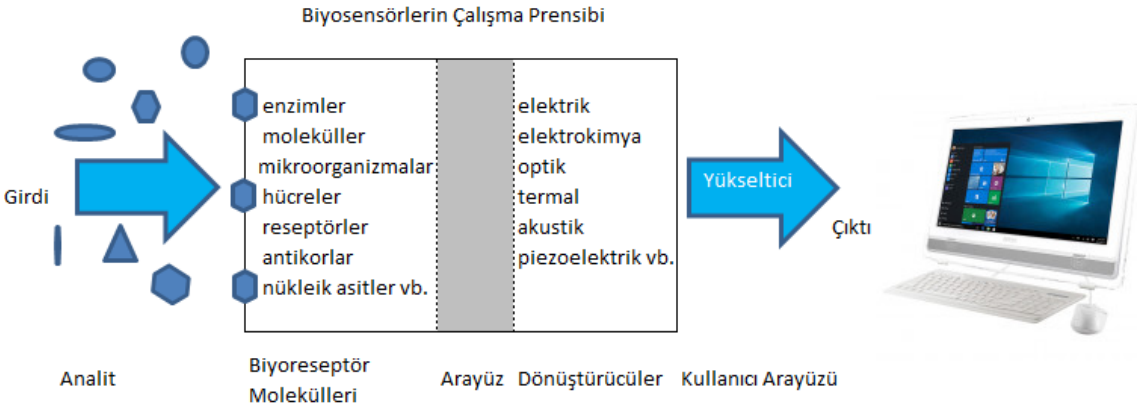
Çizelge 3.1. Elektrokimyasal ölçüm parametreleri……..…31
Çizelge 4.1. SPCE/RGO/PTH/AuNP transduserinin hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç değerleri ve CV, DPV ve SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri……..…….35
Çizelge 4.2. CA125 immünosensörünün hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç ve CV, DPV ile SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri…….……...…39
Çizelge 4.3. Şekil 4.4(A) ve Şekil 4.4(B)'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri……..…...41
Çizelge 4.4. CA 125 immünösensörü için analitiksel karakterizasyon parametreleri...50
Çizelge 4.5. CA 125 immünösensörü için tekrarlanabilirlik testi sonuçları……...51
Çizelge 4.6. Literatürde hazırlanan CA 125 immünosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen CA 125 immünosensörünün performans karşılaştırması…...52
Çizelge 4.7. Yapay insan kan serumu örneklerinde CA 125 analizi……..57

1.GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

Biyosensörler, ölçümü istenen analit ile spesifik olarak etkileşime giren uygun bir biyobileşen (biyoreseptör) arasındaki etkileşimin sinyal çeviriciler (transduser) yardımı ile elektriksel sinyallere dönüştürüldüğü analitik cihazlardır. Biyosensörler üç bileşenden oluşur. Bu bileşenler, seçici olarak analiti tanıma kapasitesine sahip biyobileşen (biyoreseptör), bu biyobileşenin analit ile etkileşimi sonucu oluşan sinyali elektronik sinyale dönüştüren çevirici (tranduser) ve bu sinyalin işlendiği elektronik bölümlerdir. Biyoreseptörler, enzimler, antikorlar, antibodiler, mikroorganizmalar, nükleik asitler, aptamerler, hücreler, bakteriler veya organeller olabilir (Kuralay et al., 2008).

Biyoreseptörler ve analit arasındaki etkileşim analit derişimine bağlı olarak sinyal çevirici yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışık absorpsiyonu ya da bir kütle değişimi gibi ölçülebilir sinyallere dönüşür (Wang, 2005; Kuralay et al., 2011). Biyosensör tanımıyla bilim dünyasının ilk kez tanışması 1962 yılında L.C. Clark ve C. Lyons sayesinde olmuştur. Tanımlanan bu biyosensör glukoz oksidaz (GOD) enzimiyle Clark tipi bir oksijen elektrotunun kombinasyonundan ibarettir (Kılınç, 1996). Şekil 1.1'de biyosensörlerin genel gösterimi mevcuttur.



Şekil 1.1. Biyosensörlerin genel gösterimi

1.1.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler farklı şekillerde sınıflandırılabilmektedir. Genel anlamda biyosensörler sinyal çevirici ve biyobileşenin türüne göre sınıflara ayrılmaktadırlar. Biyobileşenin türüne göre, enzim sensörleri, hücre esaslı sensörler, immunosensörler, biyomimetrik sensörler, nükleik asit sensörleri, doku esaslı ve organel esaslı sensörler olarak sınıflandırılabilirler (Cornell et al., 1997). Sinyal çeviricinin türüne göre genellikle 4 farklı grupta incelenirler.

Optik Biyosensörler: Etkileşim sonucunda meydana gelen absorplanan ya da açığa çıkan ışık şiddetinin ölçülmesi temeline dayanırlar. Absorpsiyon, floresans, biyolüminesans gibi prensipler çerçevesinde çalışırlar.

Piezoelektrik Biyosensörler: Analit ile biyobileşen arasındaki etkileşim sonrası meydana gelen kütle değişiminin ölçülmesi prensibine dayanırlar (Clark, 1956).

Kalorimetrik Biyosensörler: Bunlar bir biyoalgılama materyalinin (enzim, organel, mikroorganizma, bitki - hayvan hücresi veya doku) termometre, termopil veya termistör gibi bir fiziksel transdüser ile bütünleştirilmesi ile geliştirilmişlerdir (Kroger et al., 1997)

Elektrokimyasal Biyosensörler: Bu biyosensörlerde ise etkileşim sırasında elektrokimyasal türlerin harcanıp oluşurken ortaya çıkan elektroaktif sinyalin ölçülmesi temeli esastır (Clark, 1956).

Biyosensörlerin kullanım alanlarına göre farklı dezavantajları ortaya çıkmaktadır. Optik sensörler bulanık ortamlarda kullanılamazlar. Piezoelektrik biyosensörlerin kullanım alanı genelde dardır. Termal biyosensörler ise küçük ısı değişimlerinin meydana geldiği sistemlerde yüksek hassasiyette kullanılamazlar. Fakat bu tip dezavantajlara çoğu elektrokimyasal biyosensörlerde rastlanmamaktadır. Özellikle, tek kullanımlık elektrot teknolojisi kullanım kolaylığını oldukça artırmaktadır. Bu elektrotlar düşük maliyet ve seri analiz sistemlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ayrıca, elektrokimyasal ölçüm sistemleri küçük boyutlarda, taşınabilir ve

ekonomiktir. Elektrokimyasal sensörlerin en önemli avantajlarından biri bulanık ortamlarda çalışabilmeleridir (Thevenot et al., 2001). Elektrokimyasal biyosensörler üç ana başlık altında incelenir;

Amperometrik Biyosensörler: Sabit potansiyelde elektrokimyasal reaksiyon yardımıyla oluşan akımın ölçülmesi prensibine dayanırlar (Martin, 2001). Amperometrik biyosensörler diğerleriyle kıyaslandığında çok daha fazla ilgi çekmektedir. Seçicilik, hassasiyet, hızlı yanıt, üretim kolaylığı ve tekrar üretilebilirliğinden dolayı substrat analizi için kullanışlı bir tekniktir (Yang et al., 2014).

Potansiyometrik Biyosensörler: İyon seçici elektrotta meydana gelen iyonik reaksiyon nedeniyle meydana gelen potansiyel değişimi ölçerler. Çalışma elektrodundaki elektrodun yüzeyi iyi bir seçicilik elde etmek için dizayn edilmiştir. Potansiyel fark ölçümü, çalışma elektroduyla referans elektrodunun arasında akımın geçmediği bir anda alınır. Bu fark tanımlanan iyonun aktivitesine bağlıdır ve Nerst eşitliği ile ifade edilir (Martin, 2001).

Konduktometrik Biyosensörler: Biyokimyasal reaksiyon nedeniyle örnek çözeltide veya ortamda oluşan elektriksel iletkenlikteki değişimleri tespit etmede kullanılırlar (Skoog et al. 2007).

1.1.2. Biyosensörlerin Temel Özellikleri

Biyosensörler çoğunlukla kararlıdırlar. Geriye dönme süreleri çok kısadır. Kullanım ömürlerinin uzun olması tercih edilme nedenlerindendir. Biyosensörün ömrü yapılan ölçüm sayısına ve kullanılan reaktifin konsantrasyonuna göre değişir. İdeal bir biyosensördeki en temel özellik seçici olmalarıdır. Ayrıca yüksek duyarlılık ve az kalibrasyon gerekliliği istenen özellikler arasındadır. İdeal bir biyosensörün elektrodu aynı koşullar altında tekrarlanabilir ölçümler yapabilmelidir. Elektrotların küçültülebilmesi ve steril edilebilmesi çok önemlidir. Hızlı cevap süresi, basit yapıları ve ucuz olmaları biyosensörlerin önemini arttırmaktadır (Hall, 1990).

Biyosensör teknolojisinin avantajları olduğu kadar bu konuda çözülmesi gereken bazı dezavantajları da vardır. İmplante edilen sensörlerin uzun süre steril tutulamaması, biyokomponentlerin ömrünün kısa olması, mikroorganizmaların genetik kararlılıklarının düşük olması, biyosensör hazırlama süresinin uzun olması, biyokompatibilite sorunları ve moleküler biyolojik olaylar hakkında yeterli bilgi birikimi olmaması bazı dezavantajlar olarak sayılabilirler (Yüce, 2011).

1.1.3. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Elektrokimyasal biyosensörler farklı amaçlarla birçok alanda kullanılmaktadır. Son yıllarda nanomalzemelerin (karbon nanotüpler, grafen, peptit nanotüpler, nanopartiküller, biyouyumlu polimerler) biyosensör sistemine dahil edilmesi, uygulama alanlarını daha da genişletmiştir. Daha duyarlı ve seçici hale gelen bu biyosensörler özellikle hastalıkların teşhisi ve tedavisi için hızlı, pratik, tekrarlanabilir ve doğru analiz sonuçları veren küçük, portatif veya tek kullanımlık ölçüm sistemlerinin hazırlanmasına olanak sağlamıştır. Elektrokimyasal biyosensörler; tıp, eczacılık, gıda, tarım, adli kimya, çevre analizleri gibi farklı uygulama alanlarında kendine yer bulmaktadır (Telefoncu, 1999).

1.1.4. Biyomateryallerin İmmobilizasyonu

Uygun biyoreseptör ve transduserin (dönüştürücü) seçildikten sonra birbirlerine bağlanmaları biyosensör immobilizasyonu olarak isimlendirilir. İmmobilizasyon, biyoreseptörün tekrar kullanımı ve kararlılığı açısından çok büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda; kovalent bağlama, tutuklama, çapraz bağlama, adsorpsiyon ve biyolojik bağlama olmak üzere başlıca beş yöntem kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999).

Kovalent Bağlama: Biyoreseptörün dönüştürücü yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanmasıdır (Telefoncu, 1999). Bu yöntem diğer yöntemlere göre karmaşık işlemler içerir ve pahalıdır. Kovalent bağlanma kullanılarak hazırlanan bir biyosensör, pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değişikliklerine karşı dirençlidir. Ayrıca taşıyıcı materyallerin seçiciliği ve bağlanma metodundan

dolayı kovalent bağlanma yöntemi geniş bir seçim aralığına olanak sağlar (Tischeri vd., 1999). Yüzey baskılı bir karbon elektrodun, 3-MPA (3-Merkaptoprpiyonik asit) ile immobilizasyonundan sonra EDC-NHS (1-Ethyl-3-(3dimetilaminopropil) karbodiimid - N-hidroksisüksinimid asit) ile tutuklanması bu konuya iyi bir örnek olabilir. 3-Merkaptopropiyonik asit (3-MPA), $HSCH_2CH_2CO_2H$ formülüne sahip bir organosülfür bileşiğidir. Hem karboksilik asit hem de tiol gruplarını içeren iki işlevli bir moleküldür. Hidrofilik altın nanoparçacıklarını hazırlamak, altının kükürt ligandlarına olan afinitesinden faydalanmak için kullanılır (Vaidyanathan et al., 2004). 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC, EDAC veya EDCI) genellikle hidroklorür olarak işlenen suda çözünür bir karbodiimiddir (Richards et al.,2001). Genellikle 4.0-6.0 pH aralığında, amid bağları vermek üzere birincil aminlerin birleştirilmesi için bir karboksil aktive edici ajan olarak kullanılır. Ayrıca fosfomono-esterler ve fosfodiesterler oluşturmak için fosfat gruplarını aktive etmek için de kullanılabilir. Bu karbodiimidin yaygın kullanımları arasında peptit sentezi, nükleik asitlere protein çapraz bağlanması, aynı zamanda immüno-konjügatların hazırlanmasında bulunur. EDC genellikle büyük biyomoleküllerin immobilizasyonu için N-hidroksisüksinimid (NHS) ile kombinasyon halinde kullanılır (Mitchell et al., 2019, Wang et al., 2019). NHS olarak bilinen N-Hidroksisüksinimid, nükleofillerle birleşmeyi desteklemek için karboksilik asitlerin NHS esterlerine aktivasyonunda yaygın olarak kullanılan bir hidroksillenmiş süksinimiddir (Lapidot, 1967). Burada 3-MPA'nın kükürt grubu altın ile bağ yaparken karboksil grubu EDC-NHS ile bağ yapar. EDC-NHS'nin karboksil grubu antikora kovalent bağlanma ile bağlanır.

Hücrelerdeki antijenleri tanımlamak için antikorların kullanıldığı immünohistokimya sırasında, doku kesitleri spesifik olmayan bağlanma bölgelerini bağlamak için genellikle BSA blokerleri ile inkübe edilir. BSA immünosensörlerde biyolojik bileşenlerin yüzeye tam immobilize olamadığı durumlarda bloklama ajanı olarak sıklıkla kullanılır. BSA ineklerden türetilen bir serum albümin proteinidir (Farwell et al., 1999). BSA'nın spesifik olmayan bağlanma bölgelerine bu şekilde bağlanması, antikorların sadece ilgili antijenlere bağlanma şansını arttırır. BSA engelleyici, bölgeler orta derecede reaktif olmayan proteinle kaplandığından arka plan gürültüsünü azaltarak hassasiyeti artırır (Ouellet et al., 2006). BSA, tahlillerdeki

sinyali arttırma kabiliyeti, birçok biyokimyasal reaksiyonda etki eksikliği ve düşük maliyeti nedeniyle kullanılır (Kreader et al., 1996)

Tutuklama: Bir membran ya da tabaka içerisinde biyoreseptörün hapsedilmesi tutuklama olarak adlandırılır. Biyomolekül bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Polimer matrik içine kafesleme ve mikrokapsülleme olmak üzere iki şekilde tutuklama gerçekleştirilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, biyomolekülün fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olması bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özelliktir. (Tischeri et al., 1999)

Çapraz Bağlama: Bu yöntem kovalent bağlama ve tutuklama yöntemlerinin birleşimi şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak diizosiyanat, glutaraldehit, disüksinilsuberat, hegzametilen, diflorodinitrobenzen, bismaleimidohegzan kullanılır.

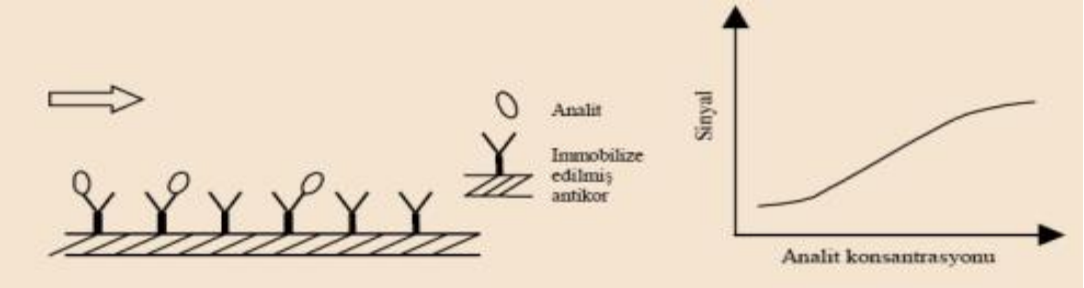
Adsorpsiyon: Bu yöntemde, biyobileşenin tabaka ya da filme adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin fiziksel durumu ve kimyasal yapısına göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimlerde uygulanabilen tüm immobilizasyon metotları protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir (Telefoncu, 1999).

Biyolojik Bağlama: Biyoreseptörün tabaka ya da filme spesifik biyokimyasal bağlanma ile assosiyasyonudur (Telefoncu, 1999). Biyolojik materyallerin bir elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde tutturulması biyosensörlerin geliştirilmesinde en kritik adımdır. İmmobilizasyon aşamasının kimyasal işlem süreci, bir biyosensörün performansında son derece etkili olduğundan bu durum beklenen bir sonuçtur. İmmobilizasyon adımlarının başarılı olması biyosensörün, çalışma ve saklama süresi, cevap zamanı, tekrarlanabilirlik gibi özelliklerinin istenilen kriterlere uygunluğunu etkilemektedir (Andreescu et al., 2004).

1.2. İmmünösensörler

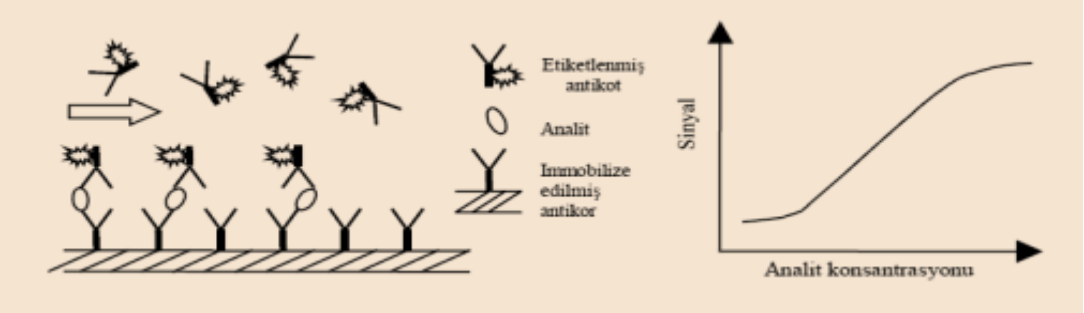
İmmünösensörler, biyoreseptör olarak antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörlerdir. İmmünosensörlerde reseptör tabakaya immobilize edilmiş spesifik bir antikora, antijenin bağlanmasıyla immünokimyasal bir reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyon son derece spesifik bir reaksiyondur. Genellikle bağlanma ve afinite sabiti çok büyük olduğundan, bu gibi sistemler ya tersinir değildir (tek kullanımlık biyosensörler) ya da gerekli tampon çözeltiler kullanılarak kompleksin çözünmesi yoluyla sistemin tekrar kullanımı sağlanabilir (Thevenot et al., 1999). Bütün immünösensörler etiketsiz ve etiketli olarak çalıştırılabilirler;

1. Doğrudan (Etiketsiz) İmmünösensörler: Bu yöntemde antikorlar veya antijenler bir dönüştürücü yüzeyinde sabitlenmiştir ve örnekte bulunan analit sabitlenmiş olan antikorlara veya antijenlere bağlanır (Şekil 1.2). Etiketsiz immünösensörler, potansiyel basitliği ve ucuzluğu sebebiyle immünoanalizlere çok iyi bir alternatiftir (Diaconu et al., 2013).



Şekil 1.2. Etiketsiz İmmünösensörler (Yanbin, 2006).

2. Etiketli İmmünösensörler: Bu metotta antikorlar dönüştürücü yüzeyinde sabitlenmişlerdir. Örnekteki analit, sabitlenmiş antikorlara bağlanır ve daha sonra etiketlenmiş ikincil antikor (veya tespit antikorları) analite bağlanır (Şekil 1.3). Etiketli immünosensörler için kullanılabilen etiketlere peroksidaz, glikoz oksidaz, alkalin fosfataz, katalaz veya lusiferaz gibi enzimler; ferrosen veya In^{+2} tuzları gibi elektroaktif bileşikler ve rodamin, floresin, rutenyum diimin kompleksleri, fosforlu porfirin boyaları, vb. gibi floresanlar örnek verilebilir (Diaconu et al., 2013).



Şekil 1.3. Etiketli İmmünösensörler (Yanbin, 2006).

1.3. Kanser

Vücudun herhangi bir organ yada dokusunda beliren anormal hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz olarak çoğalması sonucu ortaya çıkan hastalık kanser olarak isimlendirilir. Çoğalan bu hücreler bir araya gelerek tümör olarak isimlendirilen bir kitle oluşmasına sebep olurlar. Kanser, oluştuğu vücut kısmına ve mikroskobik görünümüne göre adlandırılır. Örneğin; yumurtalık, cilt, meme, akciğeri ve mide kanseri gibi. Farklı tipteki kanserlerin büyüme hızları, yayılma şekilleri ve tedavilere verdikleri tepki de birbirinden farklıdır. Bu sebepten kanserli hastalara uygulanacak tedavi yöntemi de hastalığın tipine göre değişkenlik gösterir.

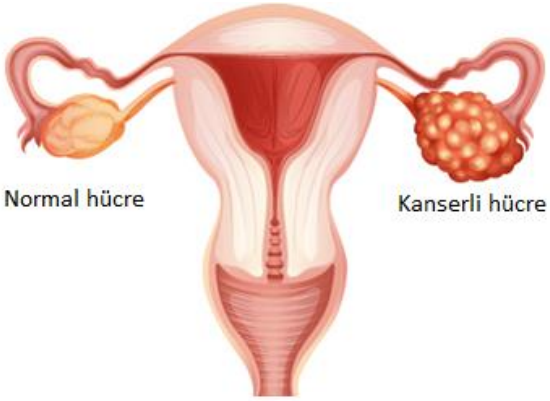
Kanser hücrelerinin oluşumunu tetikleyen faktörler fiziksel, kimyasal ve kalıtsal olarak üçe ayrılır. Hücresel metabolizma, programlı hücre ölümü ve deoksiribonükleik asit (DNA) eşleşme hatalarını kalıtsal faktörlere örnek olarak verebiliriz. Zararlı kimyasalların bir şekilde vücuda girmesi ya da ultraviyole ışınları da kanser hücrelerinin oluşumunu tetikleyen faktörlerdendir.

Kanserin teşhisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere PET (Pozitron Emisyon Tomografisi), MR (Manyetik Rezonans), Genetik tarama, mamografi, tomografi ve PET/CT (Pozitron Emisyon Tomografi-Bilgisayarlı Tomografi) örnek verilebilir.

1.3.1. Yumurtalık Kanseri

Kanser, geçmişten günümüze kadar tüm Türkiye'de ve tüm dünyada en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biridir. Dünyada ölüm nedenleri bakımından ikinci sırada bulunan kanserin, 2030 yılına kadar ilk sıraya yerleşeceği bilim insanları tarafından tahmin edilmektedir. 2030'lu yıllarda kanserin tedavi masraflarının Sağlık Bakanlığı bütçesinden karşılanamaz bir büyüklüğe ulaşacağı öngörülmektedir (Özkan vd., 2014). Kanserin tedavi maliyeti, kanser erken teşhis edildiği takdirde düşecek ve hastanın yaşama şansı artacaktır. Kanserin erken tanısı, kanserlerin etkin bir şekilde tedavi edilebileceği ve iyileştirilebileceği erken dönemlerde saptanmasını içerir (Jemal et al., 2014).

Yumurtalık kanseri, Avrupa Birliği ülkelerinde kadınlarda en sık görülen altıncı, Türkiye'de ise yedinci kanser türüdür (Molina et al., 2011, Drapkin et al., 2005, Ruggeri et al., 2011, Özdemir vd., 2014). Her 100.000 kadından 18'i bu kansere yakalanmaktadır. Yumurtalık kanseri, jinekolojik kanser ölümlerinde birinci sırada iken, onkolojik hastalıkların ölümünde ise üçüncü sıradadır. Yumurtalık kanserinin ölüm oranının bu kadar yüksek olmasının nedeni, erken tanısının zor olmasıdır. Yüksek kalitede tek bir tarama testi yapılarak erken tanı için araştırmalar devam etmektedir. Yumurtalık kanserinde diğer jinekolojik kanserlerden farklı olarak, erken tanı ve spesifik uyarıcı belirtilerinin olmaması insanların herhangi bir nedenle hekime başvurmasının önüne geçmektedir. Hastaların %70'inden fazlasına ancak 3. Evre yada 4. Evrede tanı konulabilmektedir. (Şekil 1.4) Beklenen yaşam süresinin artması ancak erken dönemde konulacak tanı ile mümkün olabilmektedir. Son yıllarda tıp alanında gerçekleşen birçok önemli gelişmeye karşın, yumurtalık kanserinde çok önemli gelişmeler gözlenememiş ve buna bağlı ölümlerde bir azalma olmamıştır. Bu sebepten teşhis sonrası beş yıllık yaşam süresi %47 düzeylerinde seyretmektedir (Dursun, 2013, Özbaşlı, 2009).



Şekil 1.4. Yumurtalık Kanserinin Gösterimi
(https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberleri/yumurtalik-kanseri/, 2020)

Yumurtalık kanserinin tanısında pelvik muayene ve kanser antijen 125 (CA 125) ölçümü en sık kullanılan yöntemlerdir. Rutin yumurtalık kanseri taraması günümüzde yapılmamaktadır. Sadece yüksek riskli seçilmiş kişilere tarama önerilmesi mümkün olabilmektedir (Çolak, 2013). Pelvik muayene yumurtalık kanseri taramasında çok yetersizdir (Üstüner vd., 2004). Transvajinal ultrasonografinin sensitivitesinin daha iyi olmasına ragmen, spesifitesi yeterli değildir. Bu nedenle yumurtalık kanserinin erken teşhisi için kanser biyobelirteçlerin düşük seviyede (kandaki normal değeri 0-35 U/ml) ölçümü oldukça önemlidir.

1.4. Biyobelirteçler

Biyobelirteç kanda, diğer vücut sıvılarında ve dokularda normal ya da anormal bir süreci belirten moleküllere verilen addır. Kanser alanında sıklıkla tümör marker olarak anılırlar. Biyobelirteçler proteinler (enzim ve reseptörler), DNA, ribonükleik asit (RNA), antikor veya peptid yapıda olabilir. Bu moleküller tam kan, serum, plazma, dolaşım veya dışkı, idrar, meme başı akıntısı, tükürük gibi salgılardan analiz edilir. Kanseri önlemek ve tedavi etmek için etkili bir araç olarak kanser belirteçlerinin erken taranması klinik tanıda geniş çapta kullanılmaktadır. (Henry et al., 2012)

Şimdiye kadar tanımlanmış biyobelirteçler; kanser antijeni 15-3 (CA 15-3), karsinoembriyonik antijen (CEA), alfa feto protein (AFP), kanser antijeni 19-9 (CA 19-9), insan koryonik gonadotropini (HCG), kanser antijeni 12-5 (CA 12-5), prostat

spesifik antijeni (PSA), rahim ağzı kanser antijeni (PAP), kalsitonin (CALCITONIN) ve insan herpes virüsü (EBV)'dir. Günümüzde kanser belirteçlerinin tespiti için çeşitli analitik stratejiler ve yöntemler araştırılmaktadır. Bunların arasında, elektrokimyasal immün analiz yöntemi, yüksek duyarlılığı ve taşınabilirliği nedeniyle önde gelen yöntemlerden biri olarak gösterilebilir.

1.5. CA 125 (Kanser Antijen 125)

Antijen karbonhidrat CA 125, epitelyal yumurtalık kanserlerinin izlenmesinde kullanılan bir tümör biyobelirtecidir. CA 125, OC 125 monoklonal antikoru tarafından tanınan büyük molekül ağırlıklı (>200kD) bir glikoproteindir (Bast et al., 1981). Karbonhidrat içeriği %24'tür. CA 125'in yarılanma ömrünün 4,8 gün olduğu yapılan ölçümler sonucu tespit edilmiştir (Canney vd., 1984). CA125'in çözülebilen veya hücresel yüzeye bağlanabilen salgılama mekanizması ile ilgili farklı hipotezler önerilmiştir. CA 125'in bu son formu, mezotelin ve galektin gibi birçok moleküler etkileşime sahiptir. Bu etkileşimler, tümör kanserinin CA 125 yoluyla yumurtalık kanserinin uyarılmasında ve yayılmasında önemli bir rol oynar (Houda Bouanane, 2009).

Bast ve arkadaşları tarafından 1983 yılında yapılan bir çalışmada 888 sağlıklı gönüllüden numune alınmış ve çalışmaya katılanların sadece % 1'inde CA 125 düzeyi 35 U/ml üzerinde tespit edilmiştir. Bu sebepten birçok laboratuvar CA 125 için eşik değerini 35 U/ml olarak kabul eder. CA 125 düzeyinin yükselmesi, tümör büyüklüğü ve evresini belirlemede yardımcı olur (Rosenthal vd., 2006). Ancak CA 125'in duyarlılığı ve özgüllüğü hem menopoza geçiş dönemi hem menopoza girmiş kadınlarda düşüktür. Özgüllüğün düşük olmasının nedeni yaygın görülen benign jinekolojik durumlarda ve jinekolojik olmayan hastalıklarda da yükselmesidir. Bu durum özellikle menopoza geçiş döneminde CA 125'in kullanılabilirliğini azaltmaktadır (Moore et al., 2009).

Yumurtalık kanseri teşhisinde rutin olarak CA 125 seviyesi ölçüldüğü için, CA 125 tayini için birçok immünosensör geliştirilmiştir (Suwansaard et al., 2009, Fu, 2007, Johari-Ahar et al., 2015, Raghav ve Srivastava, 2015). Elektrokimyasal

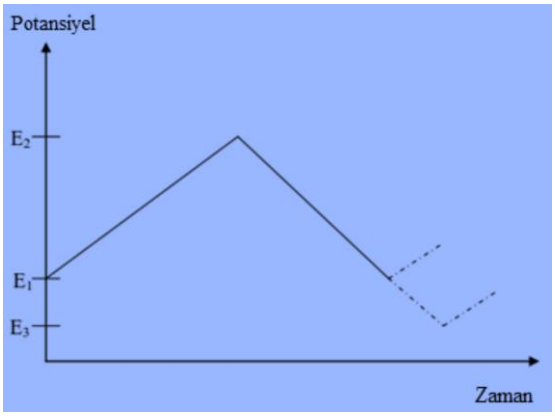
immünosensörler ile ilgili çalışmalar incelendiğinde etiketli ve etiketsiz CA 125 immünosensörlerin tayin sınırlarının oldukça düşük ve hassasiyetlerinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

1.6. Elektroanalitik Yöntemler

Analiz yöntemlerinde maddenin elektrokimyasal özelliklerinin kullanıldığı metotlara elektroanalitik yöntemler denir. Farklı elektroanalitik yöntemler kullanılır ve belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak meydana gelen akım şiddetleri ölçülür. Difüzyona bağlı olarak oluşan bir akım olduğundan ölçülen difüzyon akımıdır. Akım ile difüzyon hızı doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınında yer alan difüzyon tabakasında oluşur (Brett et al., 1992). Bundan dolayı, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki elektriksel özelliklerin ve elektrot reaksiyonlarının temel prensiplerinin anlaşılması için pek çok elektrokimyasal yöntem geliştirilmiştir.

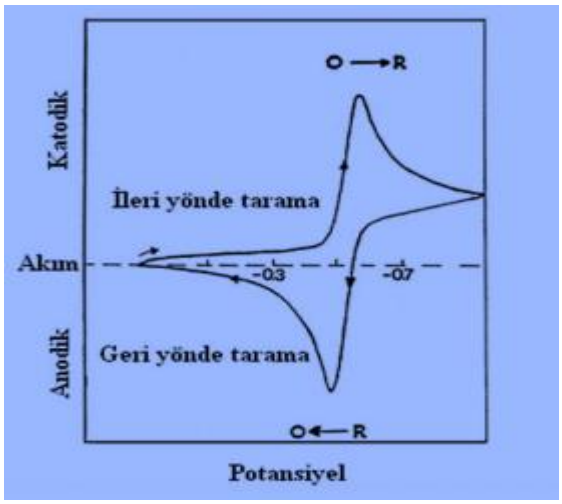
1.6.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)

Elektrokimyasal teknikler içinde en yaygın kullanılan tekniklerden biri Dönüşümlü Voltametri (CV) tekniğidir. Sıklıkla elektrokimyasal analizde maddelerin elektriksel davranışlarını incelemek için kullanılır. Kantitatif tayinlere dayalı analizlerde duyarlılık 10 μM ile sınırlı olduğundan dolayı pek tercih edilmezler. Dönüşümlü voltametri indirgenme-yükseltgenme tepkimelerinde ortamın etkisinin incelenmesinde, elektrokimyasal analizlerde yüzey modifikasyonunda, elektrot yüzeyinin kararlığının araştırılmasında, elektrotların karakterizasyonlarında ve tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasında oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Çolak, 2014). Bu yöntemde zaman bağlı olarak potansiyelin değişmesi tarama hızı olarak isimlendirilir. Potansiyel, E_1 başlangıç potansiyeli ve E_2 potansiyeli arasında uygulanırsa bu yöntem doğrusal taramalı voltametri adını alır. Fakat E_2 potansiyeline ulaştıktan sonra aynı tarama hızında ilk tarama yönüne göre ters yönde bir tarama yapılırsa bu metot dönüşümlü voltametri olarak isimlendirilir. Dönüşümlü voltametride potansiyel E_1'de kalabileceği gibi başka bir E_3 potansiyeline de geri dönebilir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi (Skoog et al., 1999)

Belirli bir potansiyel aralığında ölçülen akımların grafiğe geçirilmesi ile dönüşümlü voltamogramlar elde edilir. Şekil 1.6'da görüldüğü gibi başlangıçta yükseltgenmiş halde bulunan "O" negatif potansiyele doğru ilerledikçe indirgenmeye başlar ve "R" türü oluşur, katodik akım artar. Potansiyelin yönü tersine döndüğünde bu kez "R" molekülleri tekrar "O" moleküllerine yükseltgenir ve anodik pikte bir artış gözlenir.



Şekil 1.6. Dönüşümlü voltametride akım-potansiyel eğrileri (Skoog et al., 1999)

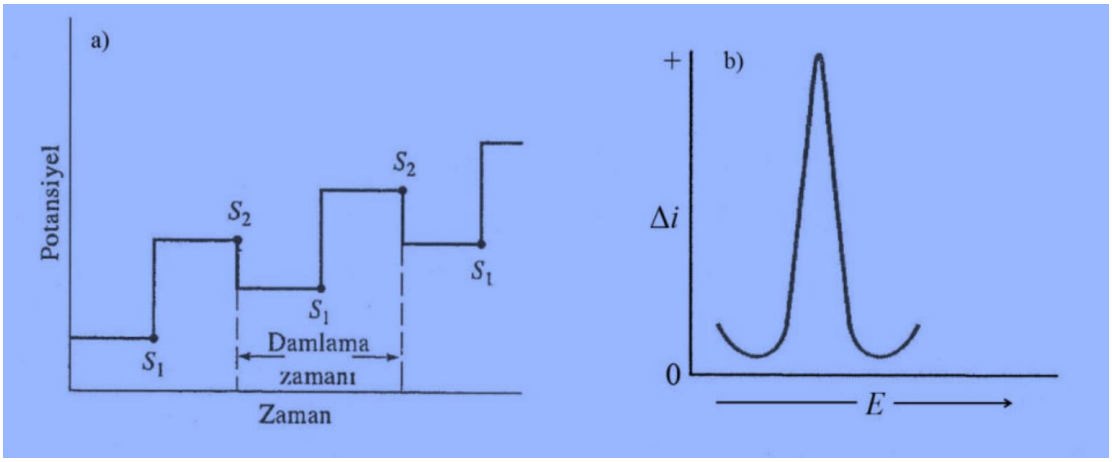
Tersinir bir tepkime için derişim ile pik akımının ilişkisi Randles-Sevcik eşitliği ile verilir.

$$İp = 2{,}69x10^{5}\ n^{3/2}\ A_E\ C^{0}\ D^{1/2}\ v^{1/2} \qquad (1.6.1)$$

Bu eşitlikte İp amper cinsinden pik akımını, n aktarılan elektron sayısını, A_E elektrodun yüzey alanını (cm^2), C^0 derişimi (M), D difüzyon katsayısını ($cm^2.s^{-1}$) ve v tarama hızını ($V.s^{-1}$) belirtmektedir. Eşitlik (1)'de görüldüğü gibi maddenin pik akımı; tarama hızının karekökü ve elektroaktif türün derişimi ile doğru orantılıdır (Bard and Faulkner, 2000). Dönüşümlü voltamogramlar ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde oluşan ürünlerin kararlı olup olmadığını, sistemin indirgenip yükseltgendiği potansiyelleri ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, elektrot tepkimesine giren maddelerin ya da ürünlerin elektrot yüzeyine tutunup tutunmadıklarını, elektrot tepkimesini izleyen bir çözelti tepkimesinin olup olmadığını anlamak mümkündür (Gürler, 2011).

1.6.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Puls voltametri teknikleri, 1952 yılında Barker ve Jenkin tarafından voltametrik çalışmalarda tayin sınırını düşürmek amacıyla önerilmiştir. Böylece, faradayik ve faradayik olmayan akım arasındaki oran arttırılarak, tayin sınırları 10^{-8} M'a kadar düşürülmüştür. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV) çok az miktardaki metalik, organik ve inorganik iyon türlerin tespiti için kullanışlı bir yöntemdir. Bu metotta lineer olarak artmakta olan gerilim üzerine sabit şiddette bindirilen pulslar, belirli zaman aralıklarında çalışma elektroduna uygulanır. Bu yöntemde puls uygulamasından önce ve puls uygulamasının sonuna doğru iki defa akım ölçülür. Puls uygulamasının sonuna doğru yükleme akımının yaklaşık sıfır olduğu durumdur. Akımlar arasındaki farkın gerilime karşı grafiği çizildiğinde pik şeklinde bir voltamogram elde edilecektir. Elde edilen pikin tepe noktasındaki gerilim pik gerilimidir. Pik yüksekliği ise analitin derişimi ile orantılıdır (Monk 2001, Wang 2000). Şekil 1.7'de DPV yönteminde elektroda uygulanan potansiyel programı ve elde edilen akım-potansiyel eğrisi görülmektedir.



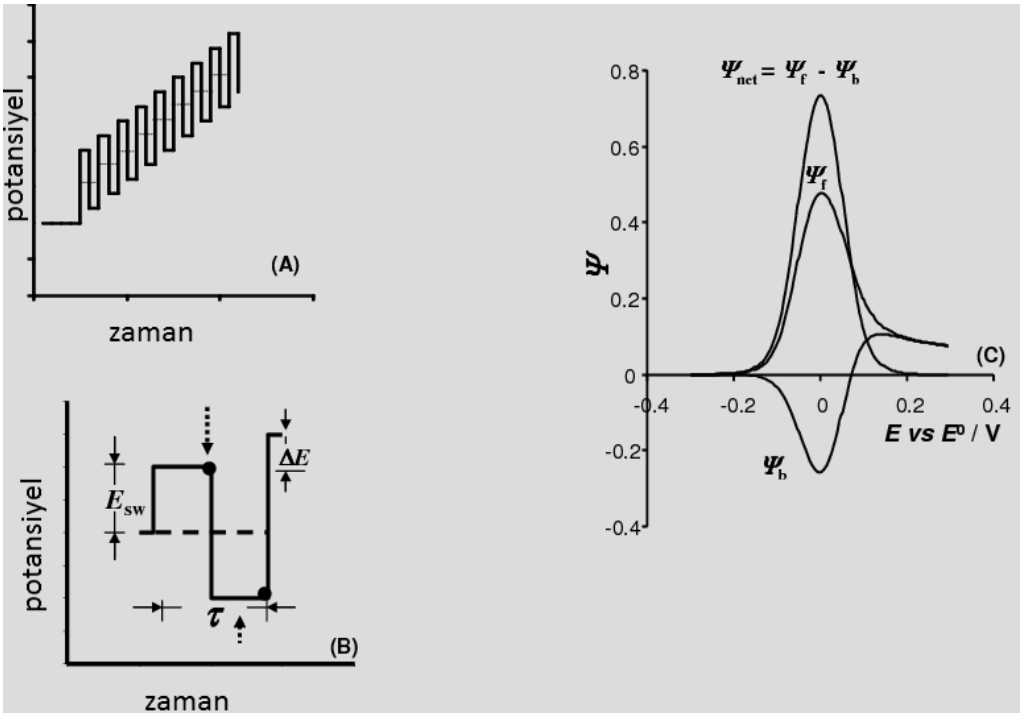
Şekil 1.7. Diferansiyel puls voltametrisinde a) uyarma sinyali ve b) elde edilen voltamogram ($\Delta i = ES_2 - ES_1$) (Skoog et al., 1999)

Diferansiyel puls voltametrisinde ölçümler pik şeklinde olduğundan, yükseltgenme gerilimleri yakın olan türlerin birbirinden ayrılması daha basittir.

1.6.3. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)

Tersinmez sistemlerin kinetiğinin incelendiği çalışmalarda genellikle tercih edilen, hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu metotda çalışma elektroduna simetrik kare dalgalar şeklinde potansiyel uygulanır. Bir kare dalga döngüsü boyunca iki defa akım ölçülür. Bu ölçümler ileri yöndeki pulsun sonunda ve geri yöndeki pulsun sonundadır. Uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak iki akım arasındaki fark alınıp grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir.

Kare dalga voltametrisinin en büyük avantalı oldukça hızlı bir yöntem olmasıdır. Kare dalganın frekansı (f) ve basamak yüksekliği (ΔEs) değiştirilerek etkin tarama hızı belirlenir. Kare dalga yönteminin bir diğer avantalı da kare dalga sayesinde toplam akıma kapasitif katkısının minimuma indirilmiş olmasıdır. Böylelikle, tarama hızı 1 V/s'ye kadar artırılabilir. Kare dalga metodunda voltametrik pikin kolay okunmasının sebebi net akımın (ΔI) hem ileri hem de geri puls akımlarından daha büyük olmasıdır. Bundan dolayı, Şekil 1.8'de de görüldüğü gibi yöntemin doğruluğu artar ve diferansiyel puls voltametriye oranla daha yüksek duyarlılık elde edilir (Monk, 2001).

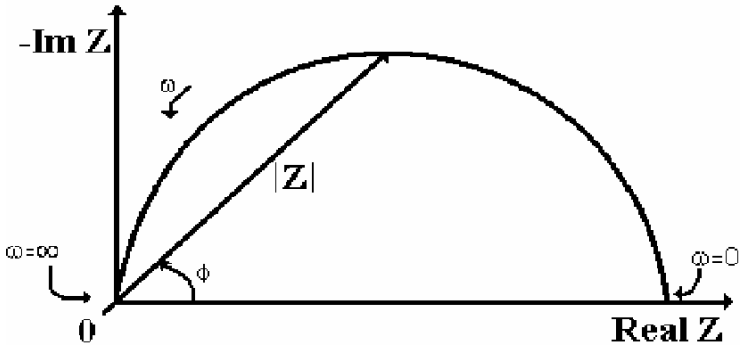


Şekil 1.8. (A) Potansiyel dalga formu, (B) bir potansiyel döngü ve (C) kare dalga voltametrisinde tipik bir voltammogram (Monk, 2001)

1.7. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), bir elektrokimyasal korozyon sisteminin kinetiklerini, özellikle kaplama uygulamalarını anlamak için bir yöntemdir. EIS, kaplamaları değerlendirmek, elektrokimyasal sistemdeki taşıma olaylarını aydınlatmak, korozyon mekanizmalarını ve hızlarını belirlemekte yararlıdır (Lu et al., 1998). EIS, elektrokimyasal hücreye küçük genlikli salınım yapan bir sinüzoidal voltaj sinyali uygulamasını ve akım cevabını ölçmeyi içerir. Nyquist eğrisi olarak bilinen Faradayik impedans spektrumu, gerçek sayılar üzerindeki sanal sayılara bağımlıdır ve ara yüzey ve elektron transfer reaksiyonlarıyla ilgili bilgi verir. Şekil 1.9'da gösterildiği gibi Nyquist eğrileri, genellikle düz bir çizgiyi takip eden eksen üzerinde uzanan bir yarı döngü bölgeyi içerir (Lu vd., 1998, Wang 2006a). Yüksek frekanslarda gözlenen yarı döngü kısmı elektron-transfer-sınırlı olaylara karşılık gelirken, düşük frekans aralığındaki düz çizgi difüzyon-sınırlı olayları gösterir. Böyle bir spektrum elektron transfer kinetiklerini ve difüzyonla ilgili özellikleri açıklamak için kullanılabilir. Çok yavaş elektron transfer işlemi olduğunda impedans spektrumu büyük yarı döngü bölgeyle

karakterize edilirken, çok hızlı elektron transfer işlemi olduğunda yalnızca doğrusal kısım içerir. Yarı döngünün çapı, elektron transfer direncine eşittir (Wang, 2006a).



Şekil 1.9. İmpedans vektörünün belirtildiği Nyquist Eğrisi (Wang, 2006a)

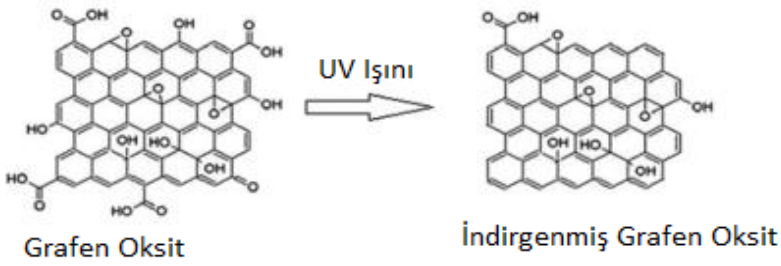
1.8. Politiyonin (PTH)

Elektrokimyasal olarak sentezlenen politiyonin (PTH), elektrot yüzeylerinin modifikasyonu için potansiyel bir iletken ve redoks polimeridir. PTH filmlerin stabilitesi ve elektrokimyasal özellikleri biriktirme koşullarına bağlıdır. Örneğin, H_2SO_4 (sulu) içinde sabit bir pozitif voltaj uygulanarak hazırlanan bir PTH filmi kararlı değildir. Sabit bir oksidasyon potansiyeli ve ardından nötr bir tampon çözeltisi içeren tiyoninde CV metodu ile hazırlanan bir PTH filmi kararlıdır. Yüzey baskılı karbon elektrotlarını modifiye etmek için benzer şekilde hazırlanan PTH filmler hidrojen peroksit (H_2O_2) biyosensörü, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) biyosensörü, glikoz sensörü ve DNA hibridizasyon tespiti için kullanılmıştır (Ahammad et al., 2013). Polipirrol, polianilin, poliasetilen, poliindol, politiyonin ve politiyofen gibi iletken polimerlerin elektropolimerizasyonu ile hazırlanan biyosensörler geniş oranda kullanılmaktadır. Çünkü bu polimerler hem hava hem de sulu çözelti ortamında yüksek iletkenliğe ve kararlılığa sahiptir. Aynı zamanda, elektropolimerize filmin kalınlığı ve immobilize enzimin miktarı elektropolimerizasyon sırasında kolaylıkla kontrol edilebilir (Vidal et al., 1999a, Vidal et al., 2003, Gerard et al., 2002).

1.9. İndirgenmiş Grafen Oksit (RGO)

Grafen ilk olarak Geim ve Novoselov tarafından 2004 yılında yüksek derecede yönlenmiş pirolitik grafitten (HOPG) mekanik ayrıştırma yoluyla elde edilmiştir. Bu yöntemde Geim ve arkadaşları yapıştırıcı bantı yüksek derecede yönlenmiş pirolitik grafit üzerine tekrar tekrar yapıştırıp çekerek tekli grafit katmanından oluşan grafeni izole etmeyi başarmışlardır (Novoselov, 2004). Grafen, bal peteğine benzer hegzagonal örgüye sahip bir atom kalınlığında karbon atomlarından oluşan çok ince, çok dayanıklı ve çok sert bir materyaldir. Karbon nanotüplerin ve fullerenlerin aksine altı halkalı karbon atomları düzlemsel bir yapıda bağlanmışlardır (Stankovıch, 2006). Grafen, yüksek elektrik iletkenliğine ve termal iletkenliğe sahiptir. Kuantum Hall 3 etkisine sahiptir. Yarı metal veya sıfır bant enerjili yarı iletkendir. Transparan, esnek, hafif ve çok kuvvetlidir. Grafen sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, çok fazla kullanım alanına sahip gelecek için umut verici bir malzemedir (Rao et al., 2009).

Grafen, kimyasal indirgeme yöntemiyle sentezlenebilmektedir. Bu metotda grafitin kimyasal yükseltgenme işlemiyle oluşan ve karboksil (-COOH), hidroksil (-OH), karbonil (-C=O), epoksi (-COC) gibi fonksiyonel grupları yapısında bulunduran bileşiklere grafen oksit (GO) denilmektedir. Bu fonksiyonel gruplar sayesinde grafen oksit hidrofilik yapı halini almaktadır (Hsiao vd., 2011). Bu hidrofilik yapı grafen oksitin iletkenliğini düşürdüğünden dolayı elektronik uygulamalarda kullanımı kısıtlanmıştır. Grafen oksitteki fonksiyonel gruplar indirgenme işlemiyle uzaklaştırılır ve indirgenmiş grafen oksite (RGO) dönüştürülür (Şekil 1.10). Genelde indirgeyici olarak sodyum bor hidrür ve hidrazin hidrat gibi kimyasallar kullanılır. Isıyı en iyi ileten malzeme olarak bilinen grafen çelikten bile 100 kat daha kuvvetlidir. Bu özelliklerinden dolayı biyosensörlerde, elektronik cihazlarda, yakıt hücrelerinde, süper kapasitörlerde, pillerde ve kompozitlerde son yıllarda oldukça sık kullanılmaktadır (Zhou et al., 2009; Moon et al., 2010; Zhu et al., 2011). Grafen tabakaları, mükemmel elektron taşıma özelliğine sahiptirler. Birçok biyomolekülün oksidasyonunda yüksek elektrokatalitik özellikler sergiler. Grafenin bir diğer özelliği de birlikte kullanıldığı kimyasalların özelliğinin güçlenmesini sağlamaktır. Bu nedenle, grafen modifiye elektrotlar çeşitli elektrokimyasal uygulamalar için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Grosan et al., 2015).



Şekil 1.10. Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksitin Yapısı (https://www.graphene-info.com/reduced-graphene-oxide-introduction, 2020)

1.10. Kloro Aurik Asit ($HAuCl_4$)

Kloro aurik asit, $HAuCl_4$ kimyasal formülüne sahip inorganik bir bileşiktir. Altının saflaştırılmasında bir ara maddedir. Hem trihidrat hem de tetrahidrat ticari olarak temin edilebilir. Sadece suda değil, aynı zamanda alkoller, esterler, eterler ve ketonlar gibi birçok oksijen içeren çözücüde de çözünür. Organik çözücülerdeki doymuş çözeltiler genellikle spesifik stokiyometrinin sıvı solvatlarıdır. Havada ısıtıldığında, katı $HAuCl_4 \cdot nH_2O$, kristalizasyon suyunda erir, hızla kararır ve koyu kahverengi olur (Marvin et al., 1969). Altının elektriksel iletkenliğinin çok iyi olmasından dolayı AuNP'ler elektrot yüzeyi ile antikor arasında doğrudan elektron alışverişi sağlayabilirler. Ayrıca altın kararlı bir metaldir ve yüksek yüzey hacmine sahiptir. Bu nedenle yüksek potansiyellerde çalışma gereksinimine ihtiyaç duyulmaz. Elektrot yüzeyinde yer alan Altın (Au) elektrot yüzeyindeki 3-MPA'daki kükürt (S) ile güçlü Au-S bağı oluşturarak, diğer uçlardaki fonksiyonel grup ya da gruplara çeşitli uygulamalar için yeni imkanlar sunar.

2. KAYNAK TARAMALARI

2006 yılında Tang ve arkadaşları Çin'de yaptıkları bir çalışmada altın nanopartiküller (Au) ve tiyonin (Thi) modifiye edilmiş karbon pasta elektrodu üzerinde CA 125 antikorunun (anti-CA 125) immobilizasyonuyla CA 125'in tayini için bir elektrokimyasal immünosensör geliştirmişlerdir. Doğrudan bir elektrokimyasal immünoanaliz antijen-antikor reaksiyonu öncesi ve sonrasında akım değişimine dayanan CA 125 antijenini saptamak için kullanılmıştır. Akım değişiminin 1,8 U/ml tespit limitiyle 10-30 U/ml arasında değişen CA 125 konsantrasyonuyla orantılı olduğu görülmüştür. İmmünosensörler, insan serumu örneklerinde CA 125'i analiz etmek için kullanılmıştır. Klinik örneklerin analitik sonuçları, geliştirilen immünoanalizin klinik tanıda CA 125'i saptamak için bir alternatif yaklaşım olduğunu göstermiştir (Tang et al., 2006).

2007 yılında Wu Çin'de yapılan bir çalışmada tümör belirteçlerinin eşzamanlı elektrokimyasal tayini için tek kullanımlık ikili immünosensör önermiştir. Düşük maliyetli bu immünosensörde yüzey baskılı bir çipin iki karbon elektrodu üzerinde tiyonini ve iki tür antijeni birlikte immobilize etmek için selüloz asetat membran kullanılmıştır. Optimum koşullar altında immünosensörün, sırasıyla 0,2 ve 0,4 U/ml tayin sınırları ile CA 19-9 ve CA 125'in hızlı eşzamanlı elektrokimyasal tespiti için kullanılabilirliği bildirilmiştir. Klinikten alınan serum numuneleri geliştirilen biyosensör ile analiz edilmiş ve sonuçlar referans değerlerle karşılaştırılmıştır. Bu immünosensörün hazırlanması için önerilen yöntem, tek kullanımlık elektrokimyasal biyoçipin yüksek verimle üretilmesi için uygun olduğu bildirilmiştir (Wu, 2007).

2012 yılında Viswanathan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, CA 125'i saptamak için üç boyutlu altın nanoelektrotlar (GNEE) üzerinde protein baskılı polimer geliştirmişlerdir. Şablon protein CA 125 başlangıçta ince film kaplamaya dahil edilmiş ve ince film üzerindeki erişilebilir yüzeylerden proteinin çıkarılması üzerine CA 125 için baskılar oluşturulmuştur. CA 125 baskılı GNEE'nin üretim ve analizi, CV, DPV ve EIS teknikleri kullanılarak yapılmıştır. GNEE üzerindeki çok ince, protein baskılı alanların yüzeyleri, CA 125 moleküllerinin immünospesifik olarak yakalanması için kullanılmıştır. Elektrot yüzeyi üzerindeki bağlanma kütlesi,

redoks işaretleyicisinden gelen faradik akımda bir azalma olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullar altında, geliştirilen sensör, çalışılan 0,5-400 U/mL konsantrasyon aralığında iyi artışlar göstermiştir. En düşük tespit sınırının 0,5 U/mL olduğu bulunmuştur. Alkollü insan kan serumu ve bilinmeyen gerçek serum örnekleri analiz edilmiştir. Serumda spesifik olmayan proteinlerin varlığı, tahlilin duyarlılığını önemli ölçüde etkilememiştir. Sentetik polimerler ve nanomalzemeler kullanılarak moleküler baskılama, biyobelirteç proteinlerinin tespiti için alternatif bir yaklaşım sağlamıştır (Viswanathan et al., 2012).

2017 yılında Chen ve arkadaşları Çin'de yaptıkları çalışmada aptamer bazlı floresan ve döner-doğrusal hareket sensörleri (RLS) kullanarak CA 125'in ve fosfoprotein 1'in (STIP1) eşzamanlı olarak tespit edildiği yumurtalık kanserinin erken teşhisi için bir yöntem önermişler. Metil violet ve çift sarmallı deoksiribonükleik asit (dsDNA) etikleşimi ile üretilen RLS sensörü, STIP1 aptamerine hibridize edilmiş CA 125 aptamer ile elde edilmiştir. RLS yoğunluğunun hedef miktarına bağımlılığı, erken evrede yumurtalık kanseri görülmesi için veriler sağlayan CA 125 ve STIP1'in eşzamanlı tespiti için kullanılmıştır. Sonuç olarak floresans sensörlerinin CA 125 ve STIP1'i saptanabilir en düşük konsantrasyonda (0,05 U/ml – 1,0 ng/ml aralığında) bile tespit edilebileceğini bulmuşlardır. Bu da hastalığın tespiti için uygun bir aralıktır. RLS sensörlerinin karışık çözeltide CA 125 ve STIP1'i aynı anda algılayabileceğine vurgu yapmışlardır (Chen et al., 2017).

2017 yılında Brezilya'da yapılan çalışmada Gasparotto ve arkadaşları, Çinko oksit (ZnO) biyobelirteci-Au nanoparçacıklarının nanohibritlerini üreterek CA 125/MUC 126'nın spesifik tespiti için elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör, cam substrat üzerine püskürtülmüş altın ve gümüş elektrotlara dayanılarak geliştirilmiştir. ZnO, altın nanohibritleri (NRs-Au), nanohibrit tabanlı matris (NPs), hidrotermal ve püskürtme yöntemleriyle sentezlenmiş ve CA 125'in saptanması için kullanılmıştır. İmmünosensör, 2,5 ng/μL'lik nispeten düşük bir tespit sınırı, iyi stabilite ve tekrarlanabilirlik göstermiştir (Gasparotto et al., 2017).

Yapılan kaynak araştırmaları ve edinilen bilgiler neticesinde günümüz koşullarında yumurtalık kanserinin erken teşhisinin henüz sağlanamadığı, hatta

belirgin olmayan semptomlardan dolayı erken evrede tespitinin mümkün olmadığı bilinmektedir. Bu sebeple tümör biyobelirteçlerinin kandaki seviyelerinin izlenmesinin yumurtalık kanserini erken tespit etmede daha etkili bir yöntem olduğu düşünülmüştür. Yıllardır yapılan CA 125 biyobelirteci üzerine çalışmalar yeterli olmadığından bu immünösensörün geliştirilmesi gereği doğmuştur. Bu tezde, yumurtalık kanserini daha erken safhada tespit edebilmek için; RGO, PTH, AuNP, 3-MPA, EDC-NHS, anti-CA 125 ve BSA gibi çeşitli materyallerle modifiye edilmiş ve düşük maliyetli CA 125 elektrokimyasal immünosensörün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilecek olan bu CA 125 immünösensörü ile yumurtalık kanserinin erken safhada tespit edilebilmesinin sağlanacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Anti-CA125 antikor ve CA 125 antijeni Novus Biologicals USA firmasından satın alınmıştır. Etanol (EtOH) Carlo Erba firmasından, indirgenmiş grafen oksit (RGO), tiyonin asetat tuzu, kloro aurik asit ($HAuCl_4.3H_2O$), sığır serum albümin (BSA), etil 3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid (EDC) ile N-Hidroksisüksinimid (NHS), potasyum hekzosiyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$), potasyum hekzosiyanoferrit ($K_4Fe(CN)_6$), dimetil formamid (DMF), H6914 kodlu insan kan serumu Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum klorür (KCl), hidroklorik asit (HCl, % 37'lik), sodyum hidroksit (NaOH), 3-Merkaptopropiyonik asit (3-MPA) Merck firmasından satın alınmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Materyaller

Elektrokimyasal ölçümler için; Dropsens μStat 400 Bipotentiyostat/Galvanostat ve Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA cihazları kullanılmıştır. Uygun pH'da tampon çözelti hazırlamak için; Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Bu pH-metre, kullanılmadan önce, standart tampon çözeltiler kullanılarak kalibre edilmiştir. Katı kimyasalların tartımı için; Radwag AS220/C/2 marka 0,01 mg duyarlı elektronik hassas terazi kullanılmıştır. Deneylerde gereken ultra saf suyun tedariği için; Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazı kullanılmıştır.

3.1.3. Elektrokimyasal Ölçüm Sistemi

Deneylerde elektrokimyasal ölçümler aşağıdaki cihazlarla yapılmıştır;
Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat: Bu cihaz, voltametri, kronoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal metotların ölçülebildiği bir cihazdır

(Şekil 3.1). Bilgisayar bağlantılı olan bu cihazın sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat
(http://www.dropsens.com/en/potentiostats_pag.html#stat400 , 2020)

Bu cihaz ile DPV (Diferansiyel puls voltametrisi), CV (Dönüşümlü voltametri), SWV (Kare dalga voltametrisi) ölçümleri alındı ve elektrot temizleme işlemi yapıldı.

Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA: Bu cihaz, döngüsel voltametri, kronoamperometri, kronopotensiyometri, kare dalga voltametrisi, elektrokimyasal empedans spektroskopisi gibi temel fiziksel ve elektroanalitik tekniklerin çalışılabildiği bir cihazdır (Şekil 3.2). Bilgisayar bağlantılı olan bu cihazın sinyalleri Gamry Instrument 1010 yazılımı ile değerlendirilmiştir.



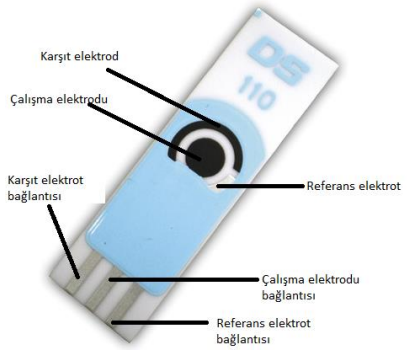
Şekil 3.2. Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA
(https://www.gamry.com/potentiostats/interface-1010e-potentiostat/, 2020)

Bu cihazda EIS (Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi), CV (Dönüşümlü voltametri) ölçümleri yapıldı ve elektrot temizleme işlemleri yapıldı.

3.1.4. Kullanılan Elektrotlar, Konnektörler ve Elektrokimyasal Hücre

3.1.4.1. Kullanılan Elektrotlar

Bu çalışmada DropSens firmasından alınan yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) kullanılmıştır (Şekil 3.3). Yüzey baskılı karbon elektrotların çalışma elektrodu 4 mm çapındadır ve karbondan yapılmıştır. Yardımcı elektrodu karbondan, referans elektrodu ise pseudo Ag/AgCl (0,1 M KCl içinde)'den yapılmıştır.



Şekil 3.3. Yüzey baskılı karbon elektrotların yapısı (https://www.metrohm.com/tr-tr/products overview/electrochemistry/ electrochemistry %20electrodes/110?fromProductFinder=true, 2020)

3.1.4.2. Kullanılan Konnektörler

Elektrotlar, Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazına DropSens'ten alınan konnektörler ile bağlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konnektör (kesikli analiz için kablo şeklinde) (http://www.dropsens.com/en/accesories_pag.html)



Şekil 3.5. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konnektör (damlamalı analizler için kutu şeklinde) (http://www.dropsens.com/en/faqs_dropsens.html)

3.1.4.3. Kullanılan Elektrokimyasal Hücre

Deneylerde kesikli analiz sırasında, elektrotlar için, metil metakrilat malzemesinden imal edilmiş olan elektrokimyasal hücre kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre (http://www.dropsens.com/en/faqs_dropsens.html)

3.2. Metot

3.2.1. Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi

SPCE'lerin yüzeylerinin temizlenmesi için; elektrotlar 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu (0,1 M KCl içinde) içerisinde, -1,0 V ve + 1,0 V potansiyel aralığında 3 döngü CV (dönüşümlü voltametri) ile temizlenmiştir.

3.2.2. Destek Elektrolit Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde; 0,1 M KCl içinde hazırlanan 50 mM KH_2PO_4 ve 50 mM K_2HPO_4 tampon çözeltileri, destek elektrolit olarak kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler, 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. TH çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu hariç diğer tüm çözeltilerde, 50 mM pH 7 fosfat tamponu (0,1 M KCl) kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin pH ayarlaması ise, 1 M NaOH ve 1 M HCl çözeltileri ile yapılmıştır.

3.2.3. SPCE'lerin RGO ile Modifikasyonu

SPCE yüzeyine RGO'nun modifiye edilebilmesi için 0,5 mg RGO ve 1 mL DMF:H_2O (1:1) karışımına 3 saatlik sonikatör uygulamasıyla kararlı ve homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Disperse edilmiş RGO'dan SPCE'lerin çalışma elektrodunun (WE) yüzeyine 2 µL damlatılmış, ardından oda sıcaklığında ve

karanlıkta kurumaya bırakılmıştır (Bilgi ve Ayrancı 2016, Şahin 2013, Şahin ve Ayrancı 2015). Daha sonra, elektrotların yüzeyi ultra saf su ile temizlenip yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. Hazırlanan elektrotlar oda sıcaklığında sabit nem ortamında kuruyana kadar bekletilmiştir. RGO ile modifiye edilen SPCE'ler, SPCE/RGO olarak kısaltılmıştır.

3.2.4. SPCE/RGO Üzerinde Politiyonin (PTH) Hazırlanması

1 mM tiyonin çözeltisi, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. CV uygulanarak tiyoninin SPCE/RGO üzerinde elektropolimerizasyonu sağlanmış yani PTH (politiyonin) elde edilmiştir. Döngüsel voltametri, -0,5 V ile + 1,0 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 20 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Yang vd., 1999). Daha sonra elektrotların yüzeyine yıkama-kurutma işlemi yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında, (0,1 M KCl içerisinde) 50 mM pH 7 fosfat tamponu kullanılarak -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında CV uygulanmıştır. Her basamakta yapıldığı gibi yıkama kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. PTH ile modifiye işleminden sonra elektrot SPCE/RGO'lar SPCE/RGO/PTH şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.5. SPCE/RGO/PTH'lerin AuNP ile Modifikasyonu

SPCE/RGO/PTH'lerin WE yüzeyine, (0,1 M KCl içerisinde) 50 mM pH 7 fosfat tamponu içinde hazırlanan 0,004 M kloro aurik asit çözeltisinden 50 µL damlatılmıştır. Ardından -1,3 V ile -0,2 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 10 döngü CV uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Karaboğa ve Sezgintürk, 2019). Daha sonra yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. AuNP ile modifiye edilen SPCE'ler SPCE/RGO/PTH/AuNP olarak kısaltılmıştır.

3.2.6. Kovalent Bağlama Yöntemi ile CA 125 İmmünösensörünün Hazırlanması

3.2.6.1. SPCE/RGO/PTH/AuNP'lerin 3-MPA ve EDC-NHS ile Aktivasyonu

SPCE/RGO/PTH/AuNP'lerin WE yüzeyine etanol içinde hazırlanmış 50 mM 3-MPA çözeltisinden 3 µL (3 LBL) damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar, karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra daldırıp çıkarma yöntemi ile yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. Bu basamaktan sonra bütün işlemlerde yıkama işlemi bu şekilde olmuştur. 3-MPA ile modifiye edilmiş SPCE'lerin yüzeyine 0,6 mM EDC-0,1 mM NHS çözeltisinden 2 µL damlatılmıştır. Bir saat süreyle sabit nem ortamı ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. EDC ve NHS çözeltileri, (0,1 M KCl içinde) 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde ayrı ayrı hazırlanmış, daha sonra ise bir araya getirilerek EDC-NHS çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra elektrotların yüzeyinin yıkama kurutma işlemine geçilmiştir.

3.2.6.2. SPCE'ler Üzerinde Anti CA 125 Antikorunun Tutuklanması

SPCE'lerin çalışma elektrodu (WE) yüzeyine 50 mM fosfat tamponu (0,1 M KCl içinde) içerisinde hazırlanan 66,66 µg/mL Anti-CA 125 çözeltisinden 3 µL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar oda sıcaklığında sabit nem ortamında 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır.

3.2.7. SPCE'lerin BSA ile Modifikasyonu

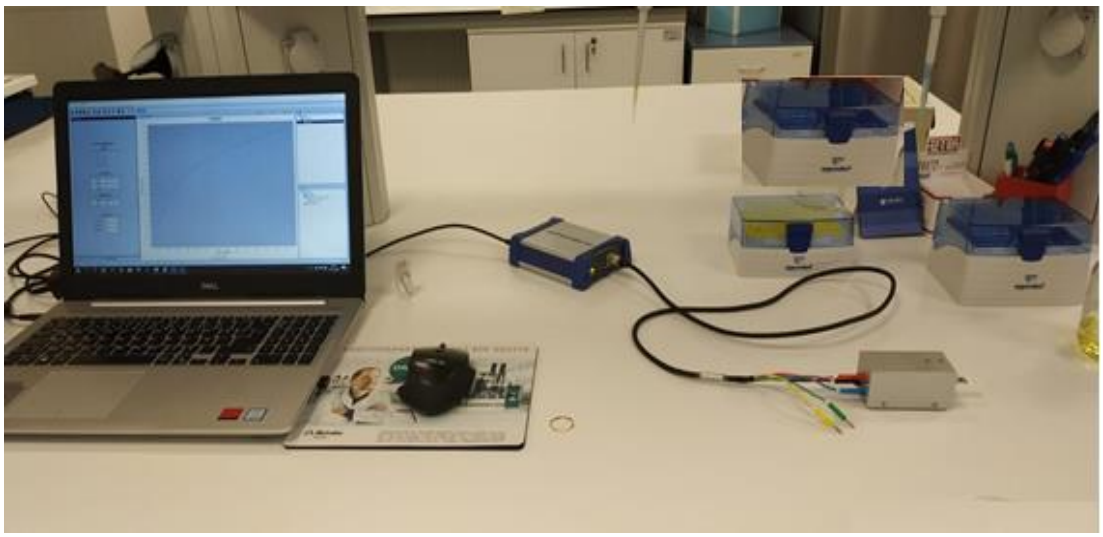
SPCE'lerin WE yüzeyine %1'lik BSA çözeltisinden 3 µL damlatılmıştır. Elektrotlar 30 dk oda sıcaklığında sabit nem ortamında bekletildikten sonra yüzeyi yıkanıp kurutulmuştur. BSA ile modifiye edilen SPCE'ler, SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.8. CA 125 Antijeninin Tutuklanması

SPCE'lerin WE yüzeyine 50 mM fosfat tamponu (0,1 M KCl içinde) içerisinde hazırlanan optimum derişimdeki CA 125 çözeltisinden 3 µL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar oda sıcaklığında sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra yıkama kurutma işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra SPCE'ler SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA/CA 125 şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.9. Elektrokimyasal Ölçümler

Elekrokimyasal ölçümler, elektrot yüzeyine 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinden 100 µL damlatılması ile gerçekleştirilmiştir. CV, DPV ve SWV ölçümleri DropSens mikrostat 400 bipotansiyostat/galvanostat ile yapılmıştır. Elektrokimyasal ölçüm parametreleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri ise Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde başlangıç frekansı 50000 Hz, finalde 0,05 Hz'dir. Bu işlem için elektrot 13 ml 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisi içeren elektrokimyasal hücre içine daldırılmış ve ölçümler bu şekilde alınmıştır.



Şekil 3.7. DropSens mikrostat 400 bipotansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi.



Şekil 3.8. Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi.

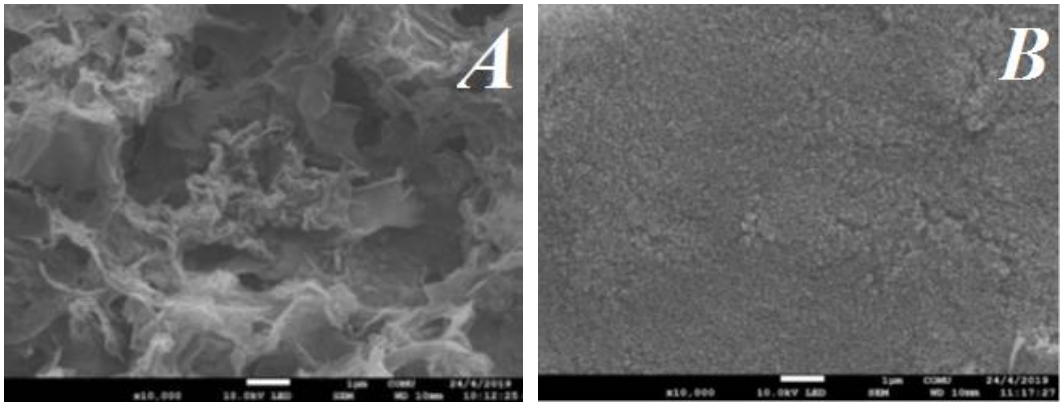
Çizelge 3.1. Elektrokimyasal ölçüm parametreleri

Metot	**Parametreler**
EIS (Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi)	Alternatif akım (AC): 10 mV, Frekans aralığı: 0,5-50000 Hz
CV (Dönüşümlü Voltametri)	Tarama hızı (srate): 50 $mV.s^{-1}$
DPV (Diferansiyel Puls Voltametri)	Vurum potansiyeli (E_{puls}): 70 mV, vurum zamanı (t_{puls}): 0,1 s, basamak potansiyeli (E_{step}): 5 mV, tarama hızı (srate): 10 $mV.s^{-1}$
SWV (Kare Dalga Voltametri)	Basamak potansiyeli (E_{step}): 5 mV, genlik potansiyeli (E_{amp}): 25 mV, kare dalga frekansı (Freq): 5 Hz

4. BULGULAR

4.1. SPCE'lerin İndirgenmiş Grafen Oksit ile Modifikasyonu

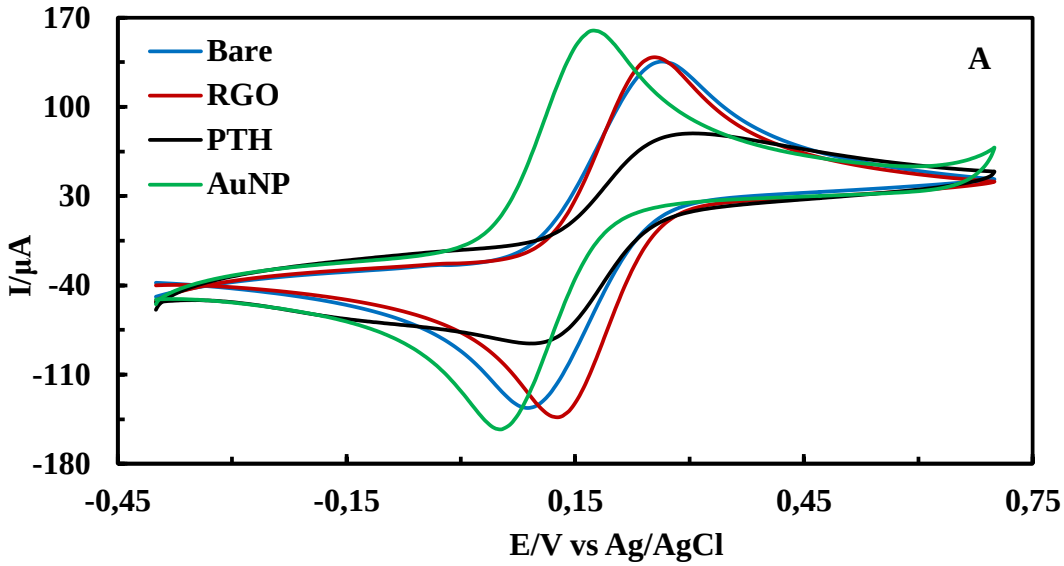
Şekil 4.1(A)'da SPCE elektroduna modifiye edilen RGO'nun katmanlı, rasgele dağılmış birbirine benzer ince katmanlar halinde buruşuk yüzeyli ve dağınık halde üst üste binmiş yapısı gözlenmiştir. Bu gözlemde elde edilen görüntüler literatürle uyum göstermektedir (A. Shalaby et al., 2015, Tiyek vd. 2016). İnceleme sonrası elde edilen sonuçlar, RGO'nun SPCE elektrodunun yüzeyine başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermiştir.



Şekil 4.1. SPCE/RGO (A) ve yalın SPCE (B) elektrotlarının SEM görüntüleri

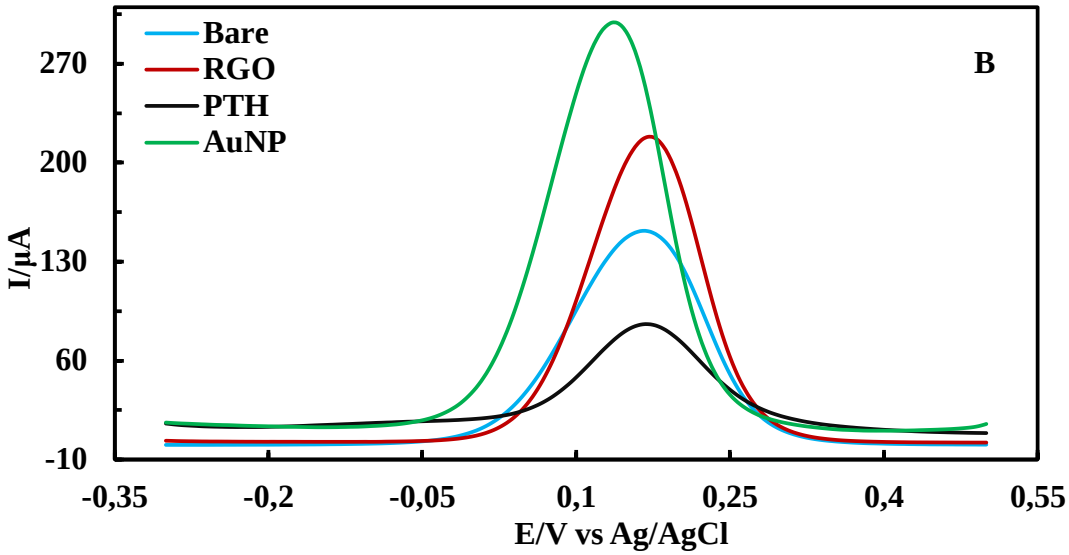
4.2. SPCE/RGO/PTH/AuNP Elektrodunun Elektrokimyasal Karakterizasyonu

SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının elektrokimyasal karakterizasyonu için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Şekil 4.2A, 4.2B ve 4.2C ve 4.2D'de, SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki sırasıyla dönüşümlü voltamogramları, diferansiyel puls voltamogramları ve kare dalga voltamogramları ve elektrokimyasal empedans spektrumları spektrumları verilmiştir.

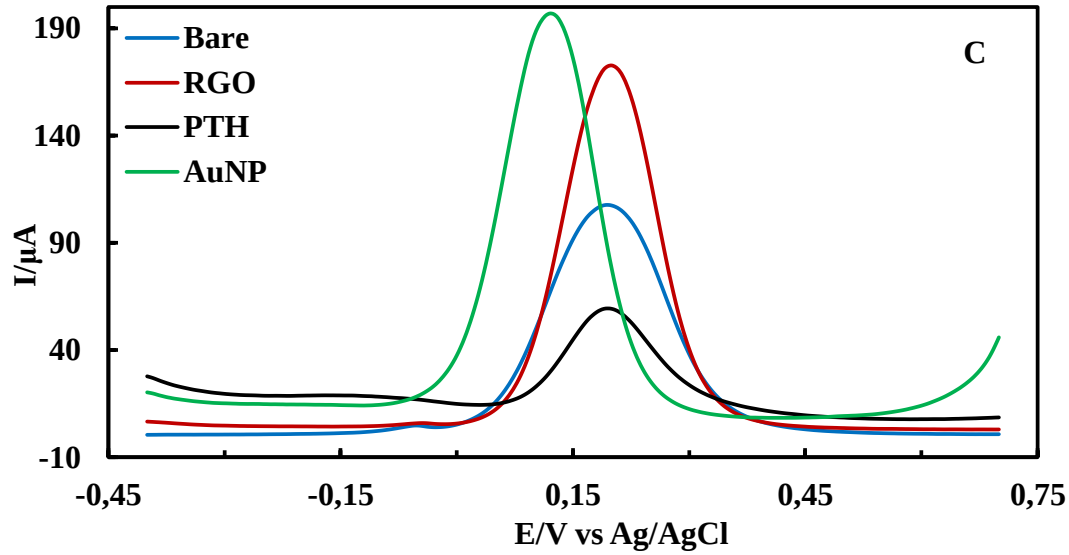


Şekil 4.2A. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen dönüşümlü voltamogramları

CV sonuçlarına göre, SPCE'lerin yüzeyinde RGO'ların modifiye edildiği görülmektedir. Elektrot formülasyonunda RGO'nun yer alması ile anodik ve katodik pik akımlarının arttığı ve pik potansiyelleri arasındaki farkın daraldığı CV'lerden anlaşılmaktadır. Tiyonin, SPCE/RGO'ların yüzeyinde 0,05 M pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, -0,5 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 20 döngü uygulanarak elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiştir. SPCE/RGO üzerinde polimerleşme ile pikte azalma gözlenmiş, AuNP'nin modifikasyonu ile birlikte pik akımında artış gözlenmiştir. RGO, PTH ve AuNP'nin üçünün de aynı anda birlikte yer aldığı SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodunda ise CV, DPV ve SWV metotlarından elde edilen sonuçlara göre pik akım değerlerindeki artış açıkça görülmektedir ve elde edilen pik akım değerlerinin en yüksek değerlere dolayısıyla elektronik iletkenliğin de en yüksek değerlere ulaştığı tespit edilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak; RGO'nun formülasyonda bulunması elektroaktif yüzey alanını ve bunun sonucu olarak da elektrodun elektronik iletkenliğini arttırmıştır (Lai et al., 2014). Şekil 4.2A, 4.2B ve 4.2C'ye göre, PTH, SPCE/RGO'lar üzerinde başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir. DPV sonuçlarına göre, SPCE/RGO'da pik akımının arttığı görülmektedir. Elektrodun RGO ve AuNP ile modifiye edilmesiyle iletkenlik artmış ve direnç azalmıştır. Şekil 4.2A, 4.2B ve 4.2C'ye göre, SPCE/RGO/PTH üzerine AuNP başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir.

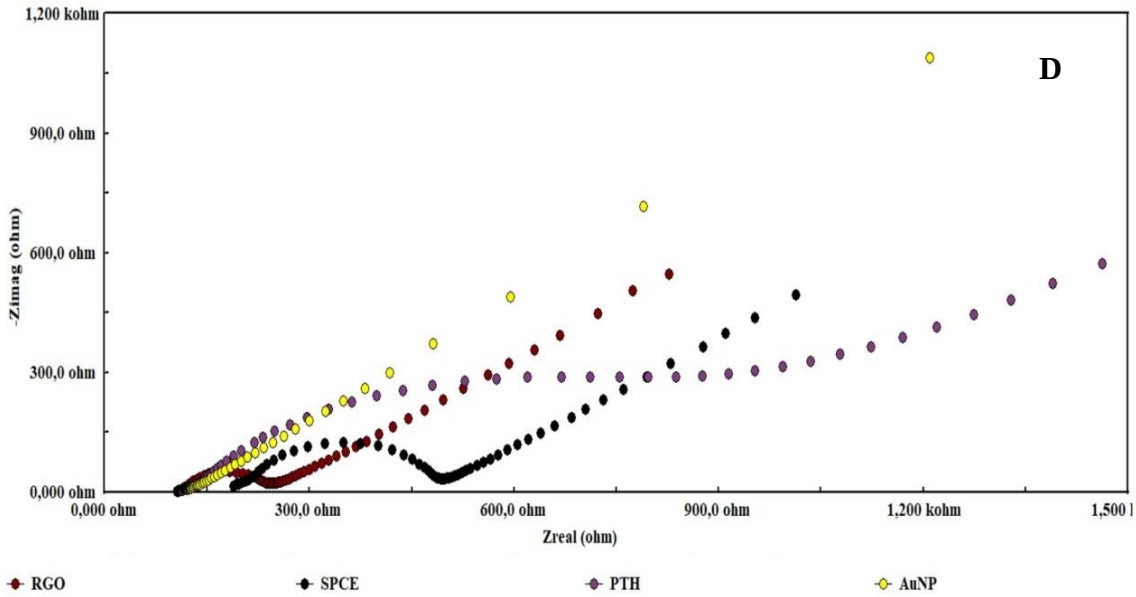


Şekil 4.2B. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,3 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları.



Şekil 4.2C. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları.

Şekil 4.2D'de Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl içinde) çözeltisinde 0.5 ile 50000 Hz frekans aralığındaki elektrokimyasal empedans spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.2D. Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları (EIS: 0.5–50000 Hz).

Şekil 4.2A, 4.2B, 4.2C ve 4.2D'de verilmiş olan dönüşümlü voltamogramlar, diferansiyel puls voltamogramları ve kare dalga voltamogramlarından elde edilen pik akım yükseklikleri ve elektrokimyasal empedans spektrumundan elde edilen direnç değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir:

Çizelge 4.1. SPCE/RGO/PTH/AuNP transduserinin hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç değerleri ve CV, DPV ve SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri.

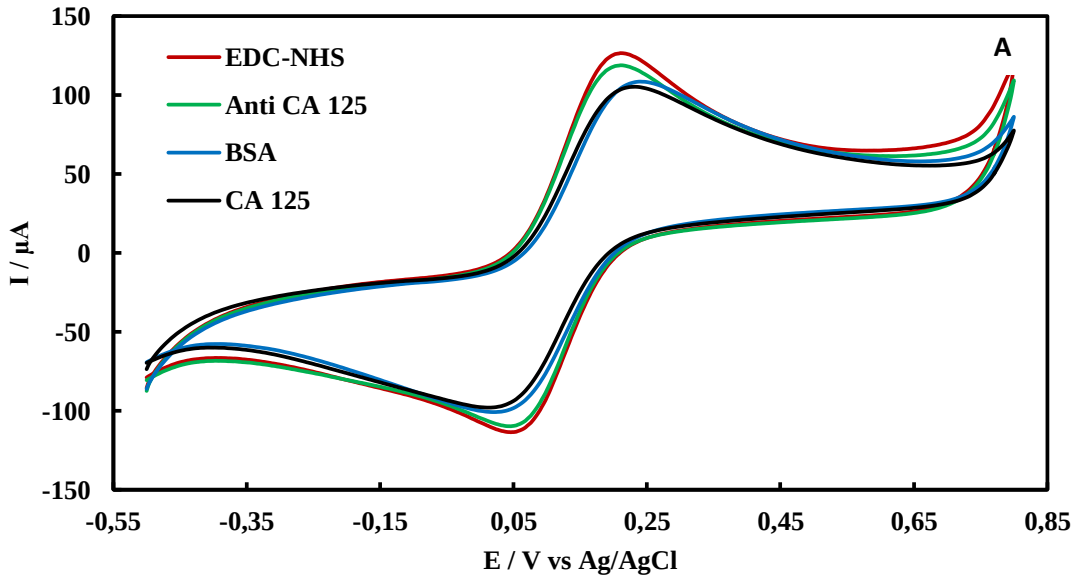
Elektrot türü	**EIS (ohm)**	**CV (µA)**	**DPV (µA)**	**SWV (µA)**
SPCE	293,2	133,7	151,5	104,5
SPCE/RGO	130,8	138,1	216,02	168,4
SPCE/RGO/PTH	941,3	65,3	75,3	46,6
SPCE/RGO/PTH/AuNP	113,1	151,2	287,8	186,2

Çizelge 4.1'de gösterilmiş olan değerler incelendiğinde şu yorumlar yapılabilir: SPCE elektrodunun yüzeyi RGO ile kaplandığında, dirençte azalma olmuş ve anodik pik akımı artmıştır. Bu sonuçlar RGO'nun yüzeye kaplandığını ve iletkenliği artırıcı

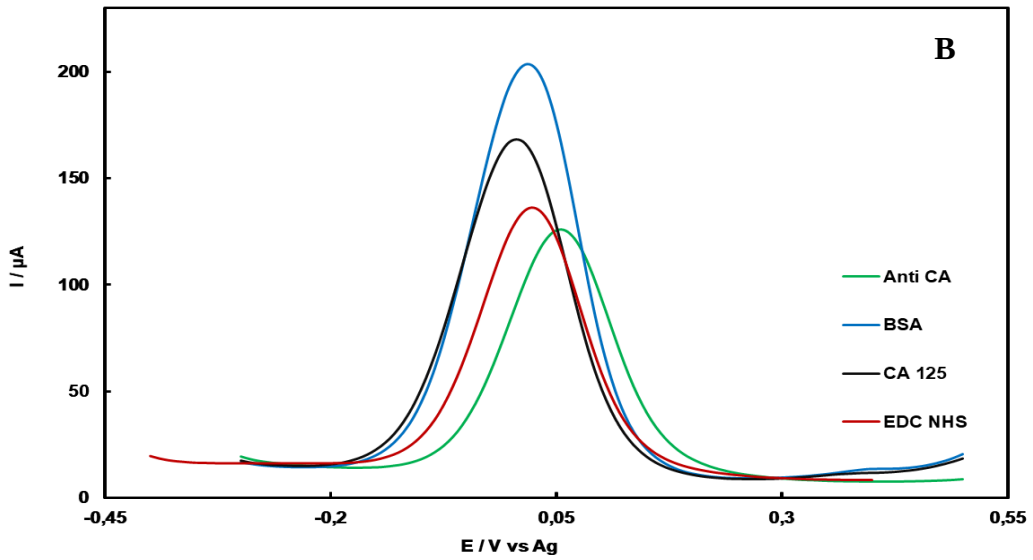
bir etki gösterdiğini ifade etmektedir. SPCE/RGO elektrodunun yüzeyine PTH'in depozite edilmesi sonucu; dirençte artış olmuş ve anodik pik akımı azalmıştır. Ardından SPCE/RGO/PTH elektrodunun AuNP ile modifiye edilmesiyle dirençte azalma olmuş ve anodik pik akımları artmıştır, bu da elektrodun yüzeyine altının kaplandığını ve RGO, PTH ve AuNP'nin sinerjik bir etki ile elektrodun iletkenliğini yüksek oranda artırdığını gösterir.

4.3. CA 125 İmmunosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

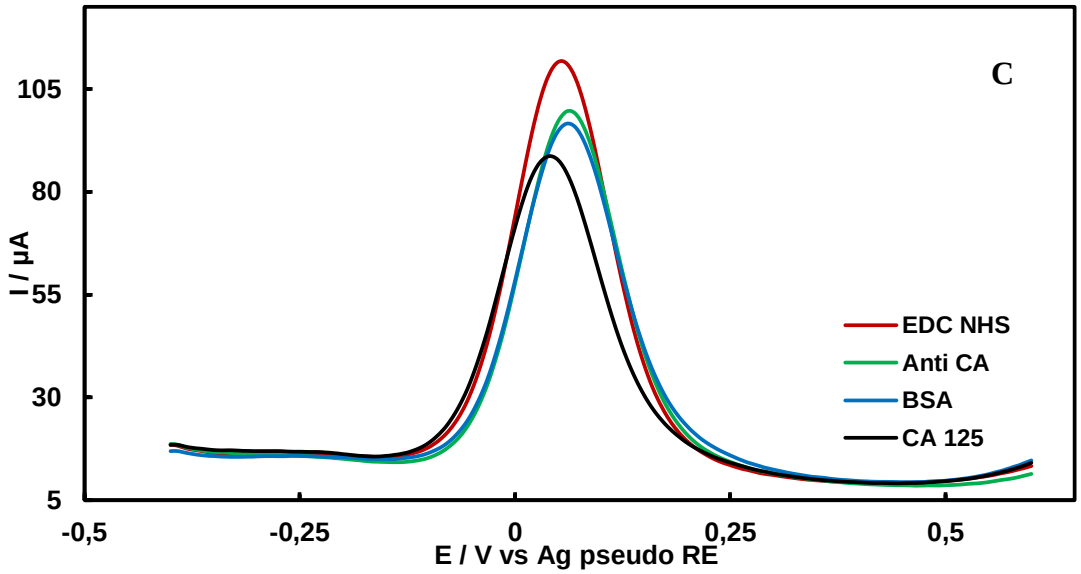
CA 125 immünosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan CA 125 immünosensörleri ile yapılmıştır. Hazırlanan SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA/CA 125 immünosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu için 50 ng/mL CA 125 konsantrasyonunda 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde EIS, CV, DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. CA 125 immünosensörlerinin hazırlanma basamaklarına ait dönüşümlü voltamogramlar, diferansiyel puls voltamogramları ve kare dalga voltamogramları ve elektrokimyasal empedans spektrumları sırasıyla Şekil 4.3A, 4.3B, 4.3C ve 4.3D'de verilmiştir. DPV ve SWV'de elde edilen voltamogramlarda gözlenen pik akım yüksekliklerindeki değişim, CV'de elde edilen voltamogramlara göre daha belirgindir. Voltamogramlarda sırasıyla antikor, BSA ve antijenin modifikasyonuyla difüzyonun azaldığı görülmüştür. Difüzyonun azalması ile sırasıyla antikor, BSA ve antijenin modifikasyon basamaklarından sonra pik akımlarının da azaldığı görülmektedir (Şekil 4.3(A, B, C)). EIS sonuçlarına göre ise sırasıyla antikor, BSA ve antijenin modifikasyon basamaklarından sonra direncin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3D).



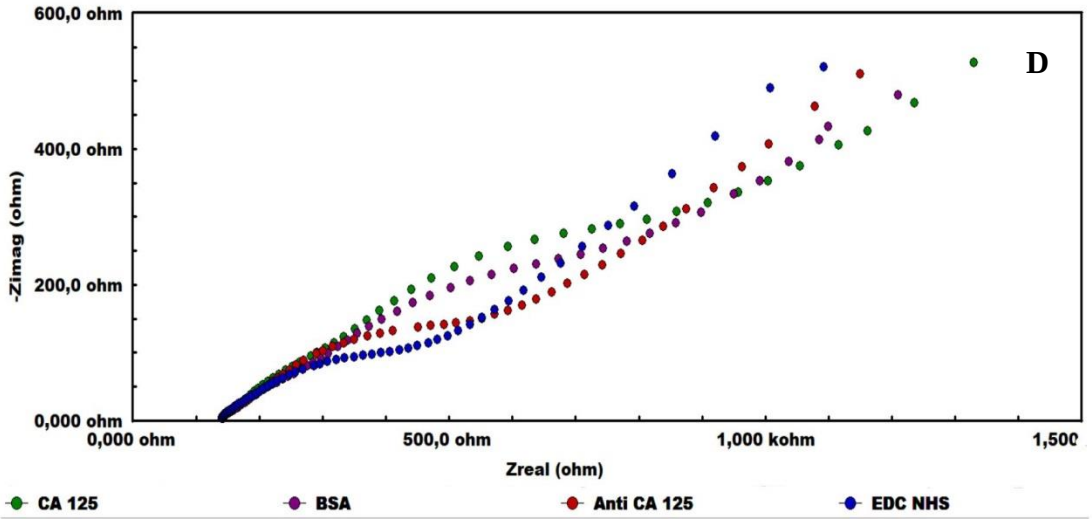
Şekil 4.3A. CA125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,5 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125.



Şekil 4.3B. CA125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,3 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125.



Şekil 4.3C. CA 125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125.



Şekil 4.3D. CA125 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-CA 125, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA, EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125 (EIS: 0,5–50000 Hz).

Şekil 4.3A, 4.3B, 4.3C ve 4.3D'de verilmiş olan dönüşümlü voltamogramlar, diferansiyel puls voltamogramları ve kare dalga voltamogramlarından elde edilen pik akım yükseklikleri ve elektrokimyasal empedans spektrumundan elde edilen direnç değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir:

Çizelge 4.2. CA125 immünosensörünün hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç ve CV, DPV ile SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri.

Elektrot türü	EIS (ohm)	CV (µA)	DPV (µA)	SWV (µA)
EDC-NHS	440,9	110,74	124,2	98,7
EDC-NHS/Anti-CA 125	661,8	105,95	114,6	87,5
EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA	1697	96,51	191,8	83,7
EDC-NHS/Anti-CA 125/BSA/CA 125	1787	94,44	156,0	75,3

Çizelge 4.2'yi incelediğimizde şu yorumu yapabiliriz; Hazırlanan transduserin ölçülen direnç ve pik akımı değerleri; EIS:114,8 ohm, CV:150,6 µA DPV:287,2 µA, SWV:185,6 µA olarak ölçülmüştü. Transduser elektrodunun yüzeyi 3-MPA ve EDC-NHS ile aktive edildiğinde dirençte artış ve anodik pik akımlarında azalma olmuştur. Daha sonra Anti-CA 125 transdusere tutuklandığında dirençte artma ve anodik pik akımlarında azalış olmuştur, bu da Anti-CA 125'in yüzeye tutunduğunu ve iletkenliği azaltıcı bir etki gösterdiğini ifade etmektedir. Daha sonrasında, elektrodunun yüzeyine BSA'nın modifiye edilmesi sonucu; dirençte yüksek miktarda artış ve anodik pik akımlarında genel olarak azalış olmuştur. Bu olay da modifikasyonun gerçekleştiğini gösterir. Son basamakta, elektrodun CA 125 antijeniyle tutuklanması ile dirençte artış olmuş ve anodik pik akımlarında da azalma görülmüştür. Bu da CA 125 antijeninin Anti CA 125 antikoru ile bağlanarak immobilizasyonun gerçekleştiğini gösterir.

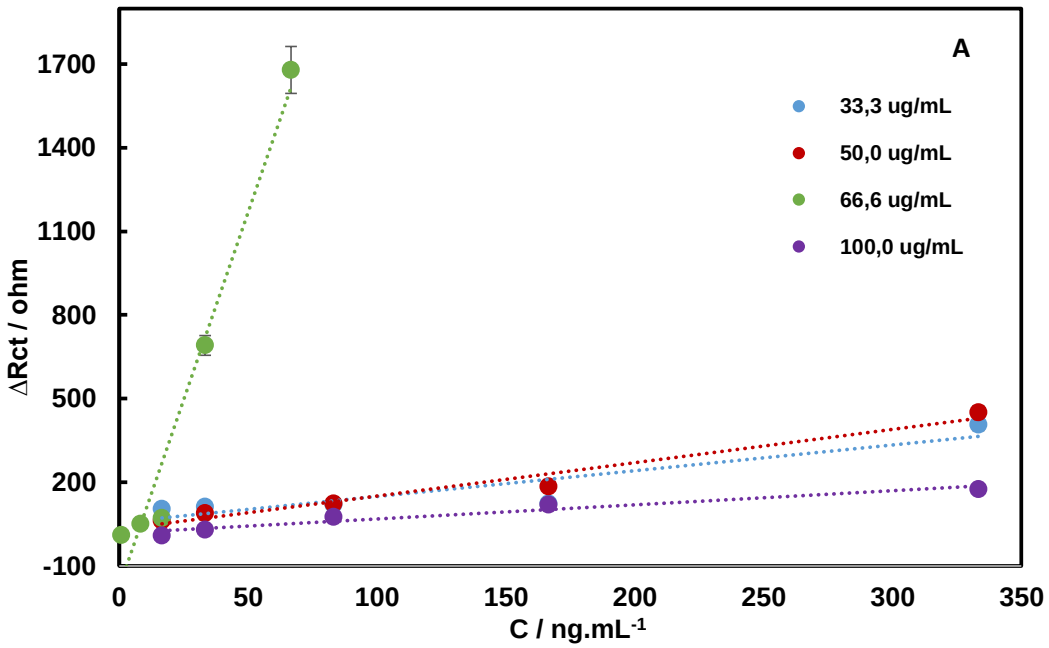
4.4. CA 125 İmmünösensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi

4.4.1. Anti-CA 125 Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu

SPCE'lerin yüzeylerine; 33,33 µg/mL, 50 µg/mL, 66,66 µg/mL ve 100 µg/mL olmak üzere 4 farklı Anti-CA125 konsantrasyonuna sahip CA125 immünosensörü hazırlanmıştır. Bunun için; karakterizasyonu yapılan elektrotların yüzeylerine farklı

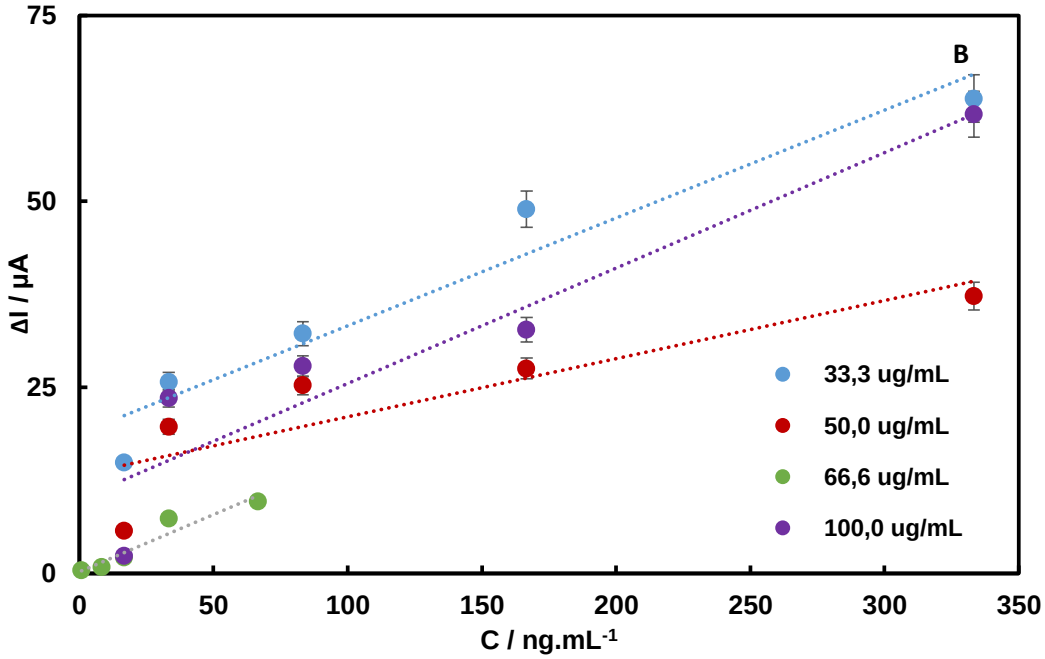
konsantrasyonda hazırlanan anti-CA 125 çözeltisinden damlatılarak 45 dk boyunca sabit nem ortamında oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan CA 125 immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki CA 125'in analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı CA 125 immünosensörleriyle farklı konsantrasyonlardaki CA 125'in analizi için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde EIS ve DPV ölçümleri yapılmıştır.

EIS ölçümlerinden elde edilen direnç farkı (ΔRct) değerlerinin farklı CA125 konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik Şekil 4.4A'da verilmiştir.



Şekil 4.4A. Anti-CA 125'in farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/MPA/Anti-CA 125/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki CA 125 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

DPV ölçümlerinden elde edilen akım farkı (ΔI) değerlerinin farklı CA125 konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik Şekil 4.4B'de verilmiştir.



Şekil 4.4B. Anti-CA 125'in farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/MPA/Anti-CA 125/BSA immunosensörünün farklı konsatrasyonlardaki CA 125 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.4A ve 4.4B'de verilmiş olan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri çizelge 4.3'te verilmiştir:

Çizelge 4.3. Şekil 4.4(A) ve Şekil 4.4(B)'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri.

Metot	**Anti-CA125 konsantrasyonu (µg/mL)**	**Duyarlık (ohm.ng^{-1}.mL) (µA.ng^{-1}.mL)**	**Korelasyon katsayısı (r)**
EIS	33,33	0,9232	0,9173
	50,00	1,1936	0,9839
	66,66	26,889	0,9823
	100,0	0,5115	0,9722
DPV	33,33	0,1448	0,9873
	50,00	0,0781	0,8720
	66,66	0,1530	0,9592
	100,0	0,1552	0,9410

Şekil 4.4(A) ve Şekil 4.4(B)'de verilen her iki grafik incelendiğinde; CA 125 konsantrasyonu ile akım ve direnç değerlerinin artışında en doğrusal olan grafiğin 66,66 µg/mL Anti-CA 125 konsantrasyonuna ait olan grafik olduğu görülmektedir. Ayrıca Çizelge 4.3 incelendiğinde; EIS ile alınan sonuçlarda 66,66 µg/mL konsantrasyonunda duyarlılık en yüksek olduğu görülmektedir. Elektrokimyasal empedans ölçümleri daha hassas sonuç verdiğinden Anti-CA125 için optimum antikor konsantrasyon değeri 66,66 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 66,66 µg/mL antikor konsantrasyonda immünösensörleri hazırlanmıştır.

4.4.2. Anti-CA 125 Antikor İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

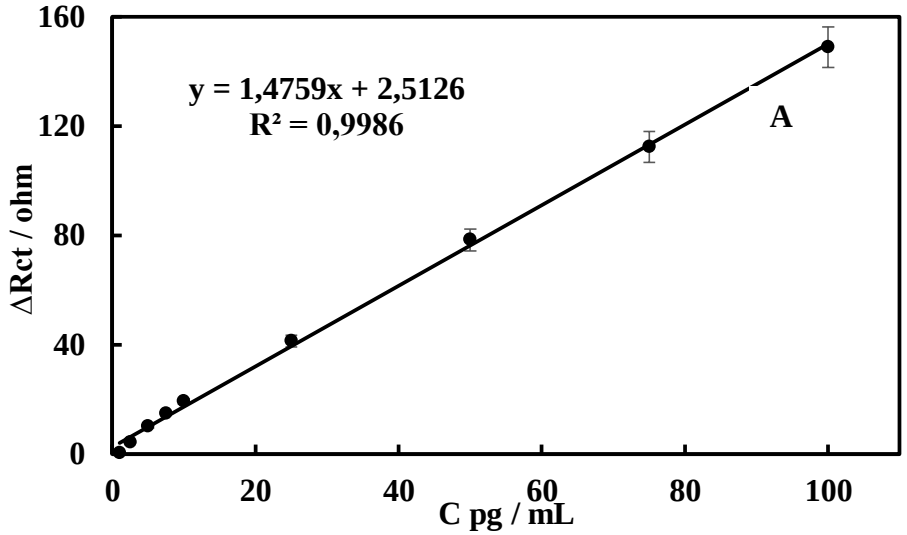
118R030 proje numaralı Tübitak 1001 Projesi kapsamında HE_4 ve CA 125 immünösensörleri hazırlanmıştır. Yapılan deneyler ve alınan ölçümler sonucunda Anti-HE_4 için optimum antikor inkübasyon süresi 45 dakika olarak ölçülmüştür. HE_4 ve CA 125 immünösensörlerinin transduser kısımları (SPCE/RGO/PTH/AuNP) aynı olduğundan ve literatür verilerine dayanarak Anti-CA 125 antijeni için de optimum antikor inkübasyon süresi 45 dakika olarak kabul edilmiştir. (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd., 2017)

4.4.3. CA 125 Antijen İmmobilizasyonunun Süre Optimizasyonu

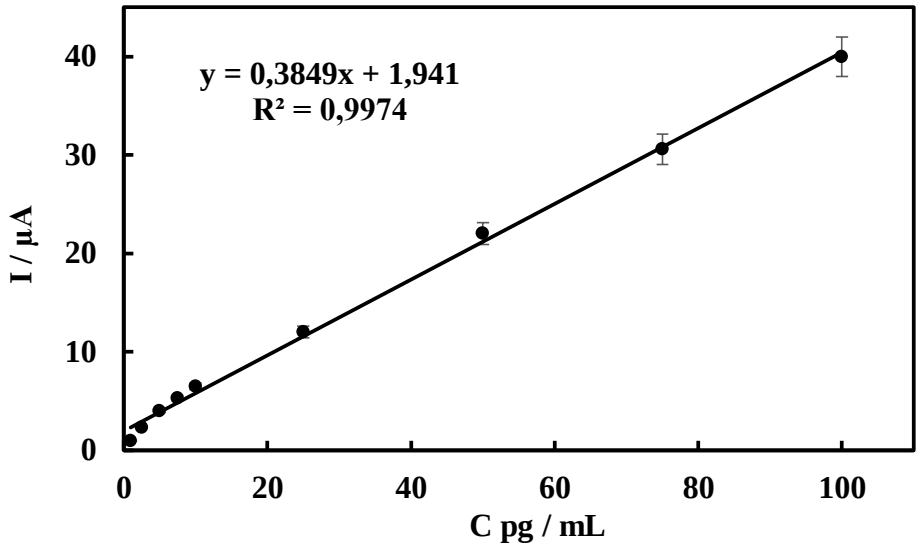
118R030 proje numaralı Tübitak 1001 Projesi kapsamında HE_4 ve CA 125 immünösensörleri hazırlanmıştır. Yapılan deneyler ve alınan ölçümler sonucunda HE_4 Antijeni için optimum immobilizisyon süresi 30 dakika olarak ölçülmüştür. HE_4 ve CA 125 immünösensörlerinin transduser kısımları (SPCE/RGO/PTH/AuNP) aynı olduğundan ve literatür verilerine dayanarak CA 125 antijeni için de optimum antikor immobilizasyon süresi 30 dakika olarak kabul edilmiştir. (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd., 2017)

4.5. Analitiksel Karakterizasyon

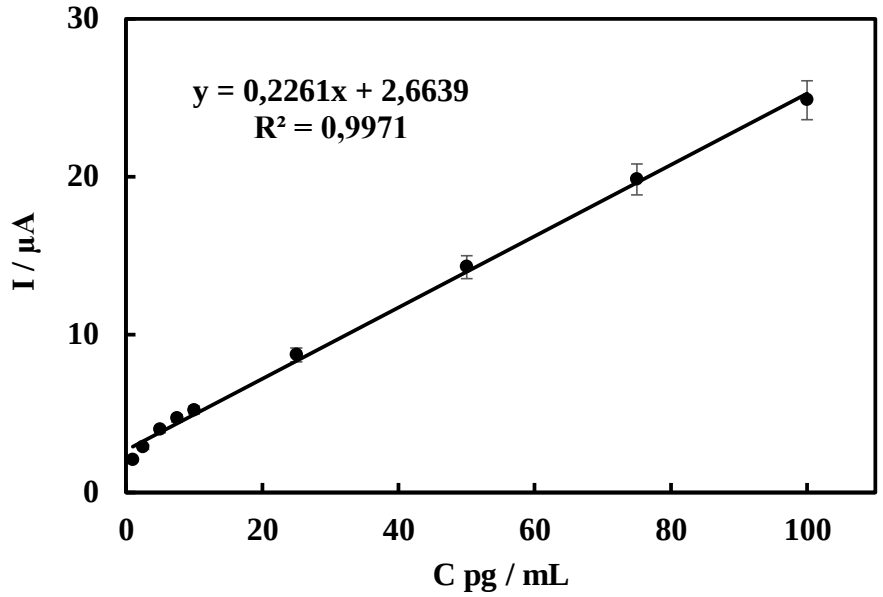
CA125 immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisi bulunan elektrokimyasal hücrede 1-100 pg/mL, 0,01-10 ng/mL, 10-50 ng/mL, 50-500 ng/mL konsatrasyonu lineer aralıklarında EIS, DPV ve SWV metotları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. EIS, DPV ve SWV sonuçlarından elde edilen datalara göre çizilen grafikler Şekil 4.5(A, B, C), Şekil 4.6(A, B, C), Şekil 4.7(A, B, C), Şekil 4.8(A, B, C)'de verilmiştir.



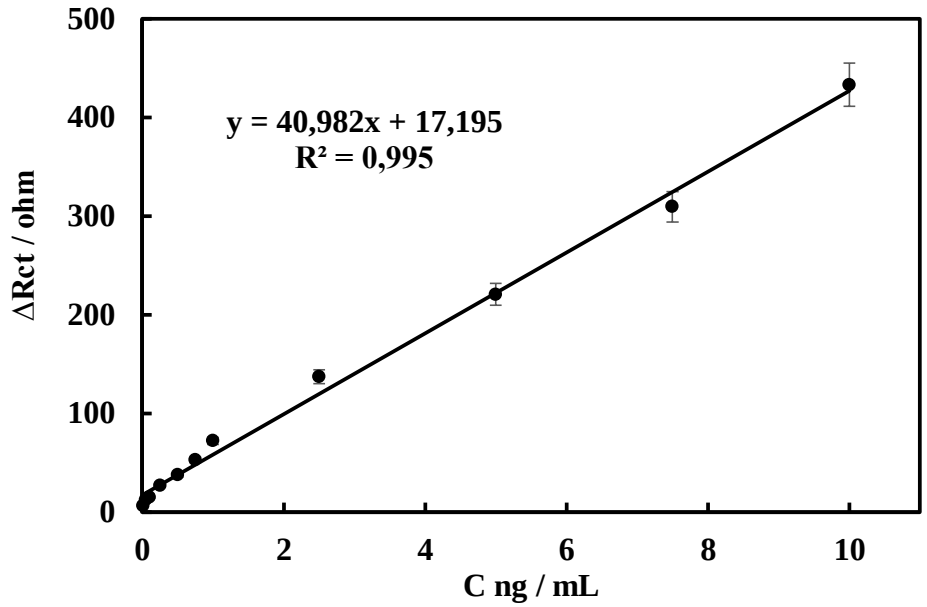
Şekil 4.5A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 1 ile 100 pg/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği



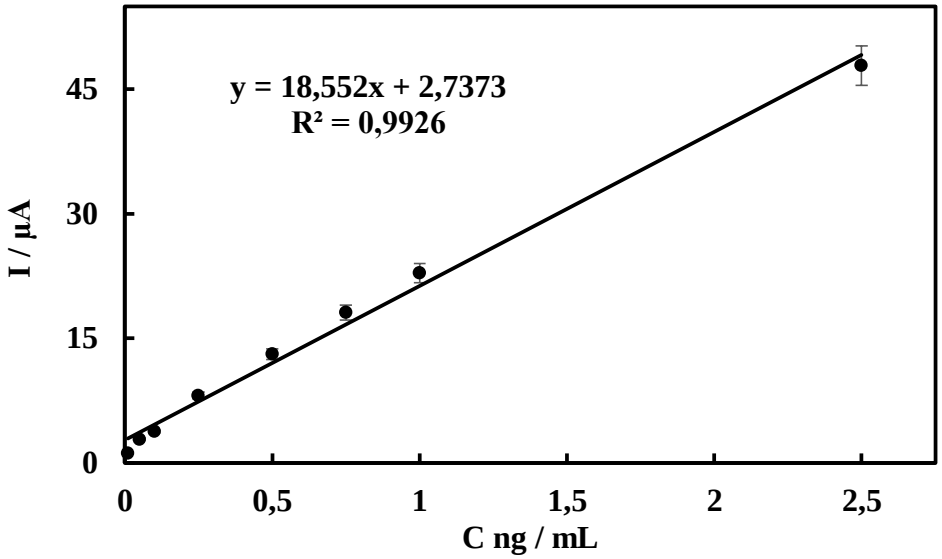
Şekil 4.5B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 1 ile 100 pg/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



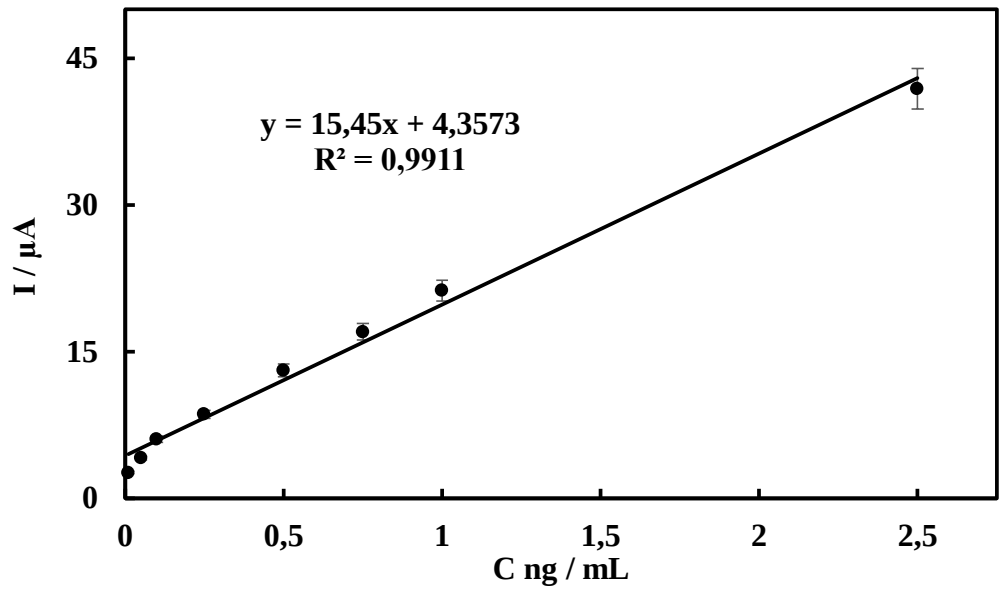
Şekil 4.5C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 1 ile 100 pg/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



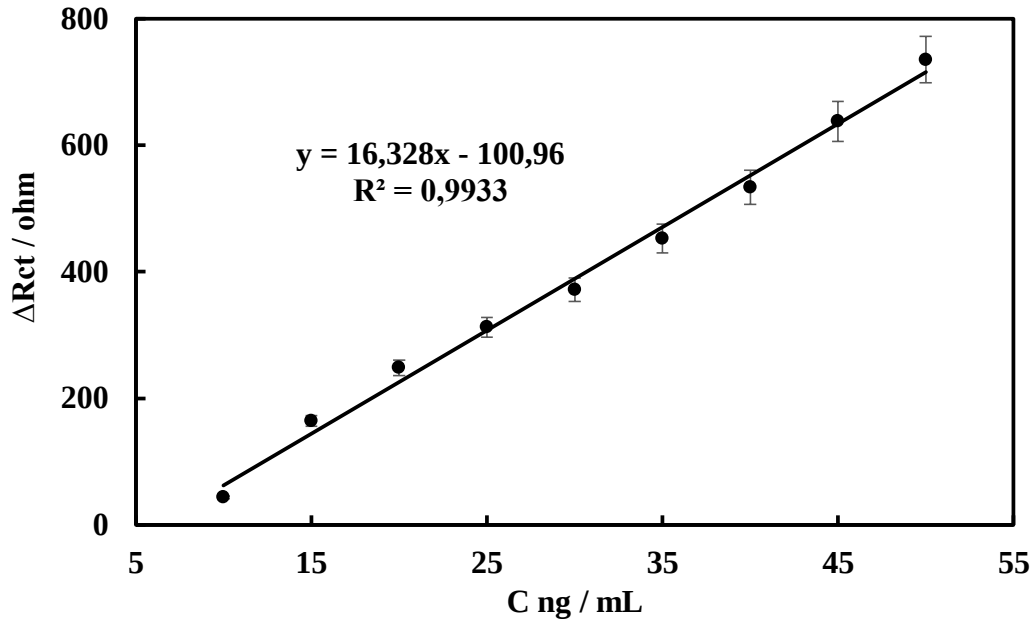
Şekil 4.6A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği



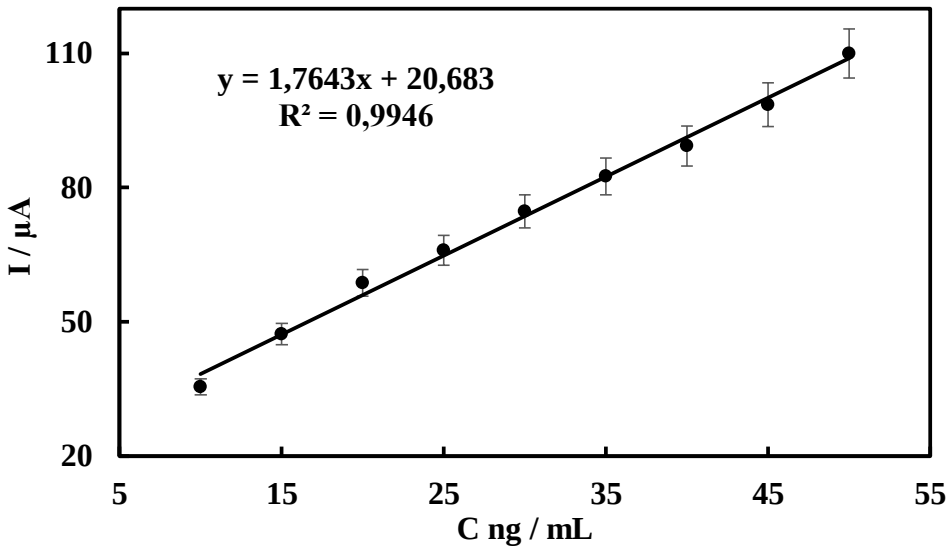
Şekil 4.6B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 0,01 ile 2,5 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



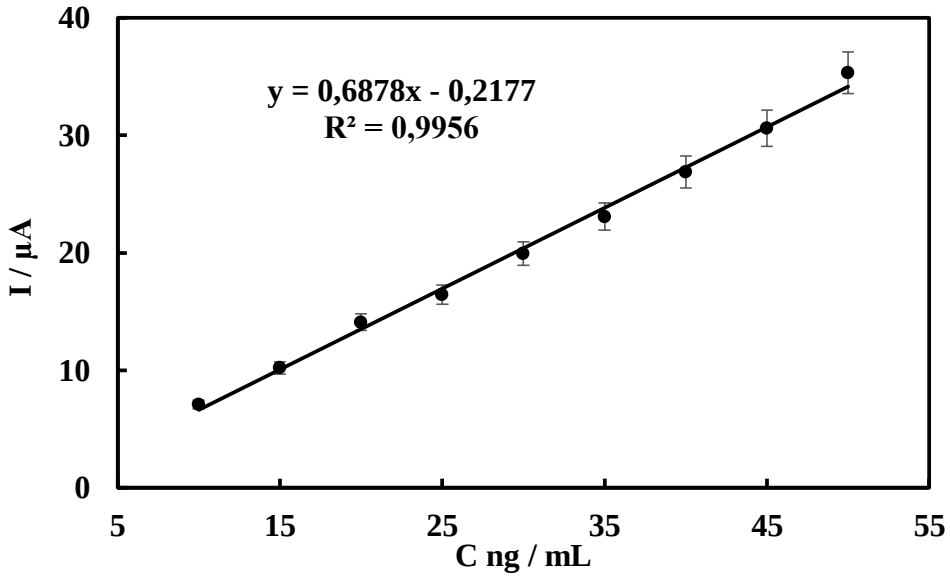
Şekil 4.6C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 0,01 ile 2,5 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



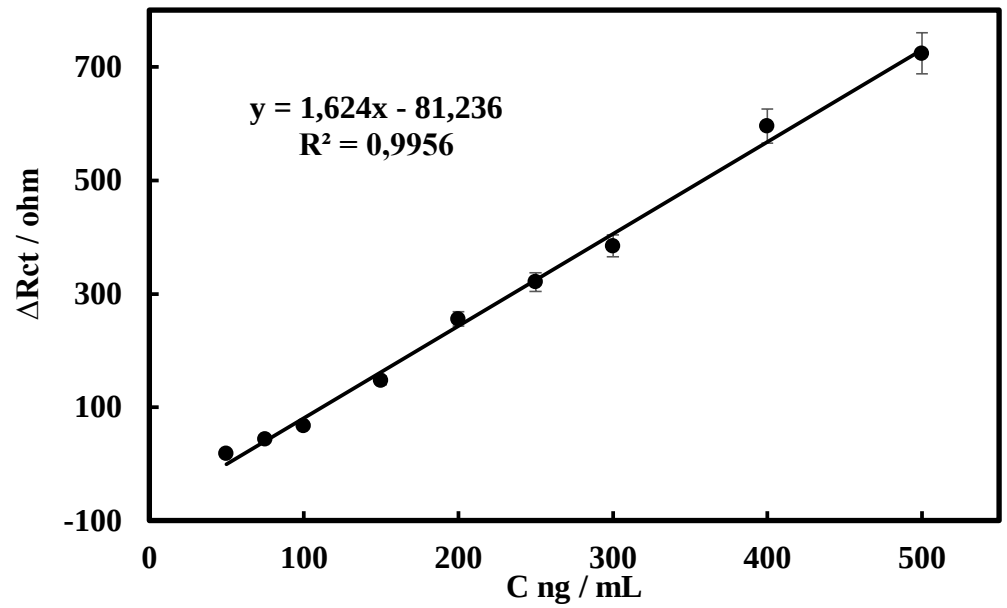
Şekil 4.7A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 10 ile 50 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği



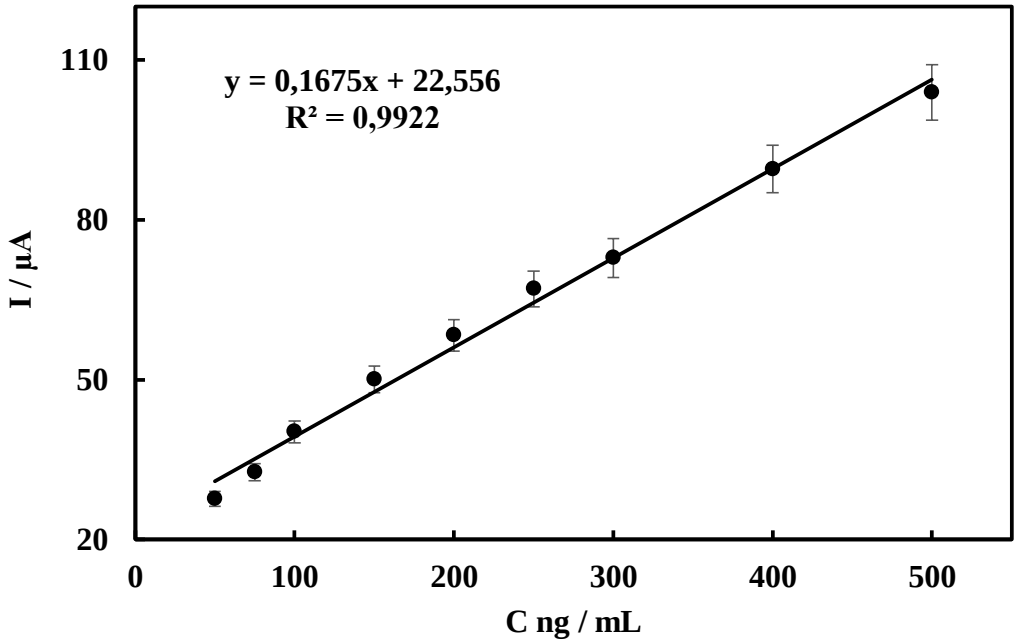
Şekil 4.7B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 10 ile 50 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



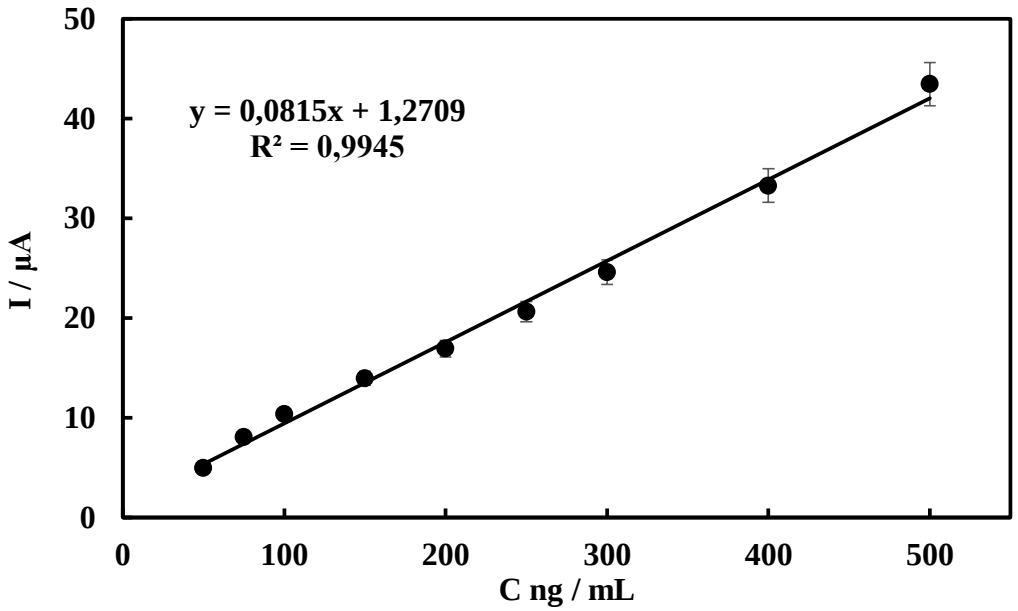
Şekil 4.7C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 10 ile 50 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



Şekil 4.8A. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 50 ile 500 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı EIS'den elde edilen ΔRct değerleri grafiği



Şekil 4.8B. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 50 ile 500 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği



Şekil 4.8C. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile 50 ile 500 ng/mL aralığında artan CA 125 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akımı değerleri grafiği

Şekil 4.5(A, B, C)'de CA125'in 1-100 pg/mL konsantrasyon aralığında, Şekil 4.6(A, B, C)'de CA125'in 0,01-2,5 ng/mL konsantrasyon aralığında, Şekil 4.7(A, B, C)'de CA125'in 10-50 ng/mL konsantrasyon aralığında, Şekil 4.8(A, B, C)'de CA125'in 50-500 ng/mL konsantrasyon aralığında artan CA 125 konsantrasyonuna karşı EIS'de ölçülen direnç değerleri, DPV ve SWV'de elde edilen pik akımı değerleri grafikleri verilmiştir. Grafikler incelediğinde CA 125 derişiminin artması ile direnç ve akım değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. CA125 immünösensörü için analitiksel karakterizasyon parametreleri

Metot	CA125 tayin aralığı	Duyarlık	Tespit limiti	Tayin sınırı	Korelasyon katsayısı (r)
EIS	1 – 100 pg/mL	1480 ohm.mL.ng^{-1}	0,0012 ng/mL	0,004 ng/mL	0,9993
	0,01 – 10 ng/mL	40,98 ohm.mL.ng^{-1}	0,21 ng/mL	0,69 ng/mL	0,9975
	10 – 50 ng/mL	16,33 ohm.mL.ng^{-1}	1,82 ng/mL	6,07 ng/mL	0,9966
	50 – 500 ng/mL	1,62 ohm.mL.ng^{-1}	12,04 ng/mL	40,13 ng/mL	0,9978
DPV	1 – 100 pg/mL	380 µA.mL.ng^{-1}	0,0016 ng/mL	0,005 ng/mL	0,9987
	0,01 – 2,5 ng/mL	18,55 µA.mL.ng^{-1}	0,069 ng/mL	0,200 ng/mL	0,9963
	10 – 50 ng/mL	1,76 µA.mL.ng^{-1}	1,64 ng/mL	5,47 ng/mL	0,9986
	50 – 500 ng/mL	0,17 µA.mL.ng^{-1}	16,09 ng/mL	53,65 ng/mL	0,9961
SWV	1 – 100 pg/mL	230 µA.mL.ng^{-1}	0,0017 ng/mL	0,006 ng/mL	0,9985
	0,01 – 2,5 ng/mL	15,45 µA.mL.ng^{-1}	0,066 ng/mL	0,22 ng/mL	0,9977
	10 – 50 ng/mL	0,69 µA.mL.ng^{-1}	1,47 ng/mL	4,91 ng/mL	0,9978
	50 – 500 ng/mL	0,082 µA.mL.ng^{-1}	13,53 ng/mL	45,11 ng/mL	0,9972

Çizelge 4.4'de verilen parametreler incelendiğinde; her bir metot ile 4 farklı konsantrasyon aralığında çalışıldığı görülmektedir. Her aralık için yüksek duyarlık, düşük tespit limiti ve düşük tayin sınırı değerleri gözlenmiştir. Ayrıca çalışılan her aralıkta elde edilen korelasyon katsayısı değerleri 1'e çok yakındır. Bu da, çalışılan aralıklarda EIS'de direnç, DPV ve SWV'de akımın konsantrasyona bağlı artışının oldukça doğrusal olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara bakıldığında, CA125 ilavesiyle zamanla EIS için dirençte, DPV ve SWV için akımda bir artış olduğu anlaşılmaktadır. Geliştirdiğimiz SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile yapılacak CA 125 analizlerinde, CA 125'in geniş bir konsantrasyon aralığında taranabileceği anlaşılmıştır.

EIS metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 1 – 100 pg/mL'de tespit limiti 0,0012 ng/mL, tayin sınırı 0,004 ng/mL, duyarlık 1480 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9933, tayin aralığı 0,01 – 10 ng/mL'de tespit limiti 0,21 ng/mL, tayin sınırı 0,69 ng/mL, duyarlık 40,98 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9975, tayin aralığı 10-50 ng/mL'de tespit limiti 1,82 ng/mL, tayin sınırı 6,07 ng/mL, duyarlık 16,33 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9966, tayin aralığı 50-500 ng/mL'de tespit limiti 12,04 ng/mL, tayin sınırı 40,13 ng/mL, duyarlık 1,62 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9978 olarak tespit edilmiştir.

DPV metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 1-100 pg/mL'de tespit limiti 0,0016 ng/mL, tayin sınırı 0,005 ng/mL, duyarlık 380 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9987, tayin aralığı 0,01-2,5 ng/mL'de tespit limiti 0,0690 ng/mL, tayin sınırı 0,200 ng/mL, duyarlık 18,55 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9963, tayin aralığı 10-50 ng/mL'de tespit limiti 1,64 ng/mL, tayin sınırı 5,47 ng/mL, duyarlık 1,76 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9986, tayin aralığı 50-500 ng/mL'de tespit limiti 16,09 ng/mL, tayin sınırı 53,65 ng/mL, duyarlık 0,17 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9961olarak tespit edilmiştir.

SWV metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 1-100 pg/mL'de tespit limiti 0,0017 ng/mL, tayin sınırı 0,006 ng/mL, duyarlık 230 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9985, tayin aralığı 0,01 – 2,5 ng/mL'de tespit limiti 0,066 ng/mL, tayin sınırı 0,22 ng/mL, duyarlık 15,45 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9977, tayin aralığı 10-50 ng/mL'de tespit limiti 1,47 ng/mL, tayin sınırı 4,91 ng/mL, duyarlık 0,69 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9978, tayin aralığı 50-500 ng/mL'de tespit limiti 13,53 ng/mL, tayin sınırı 45,11 ng/mL, duyarlık 0,082 µA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9972 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. CA125 immünösensörü için tekrarlanabilirlik testi (RSD) sonuçları

Metot	**RSD**
EIS	% 3,34 (n=10), 50 ng/mL
DPV	% 2,03 (n=10), 50 ng/mL
SWV	% 1,48 (n=10), 50 ng/mL

CA 125 immünösensörünün tekrarlanabilirliği 50 ng/mL antijen konsantrasyonunda test edilmiş ve her bir yöntem için (EIS, DPV, SWV) bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.5'de verilmiştir. Tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değeri, 10 tekrara kadar CA125'in tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.6. Literatürde hazırlanan CA 125 immünosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen CA 125 immünosensörünün performans karşılaştırması.

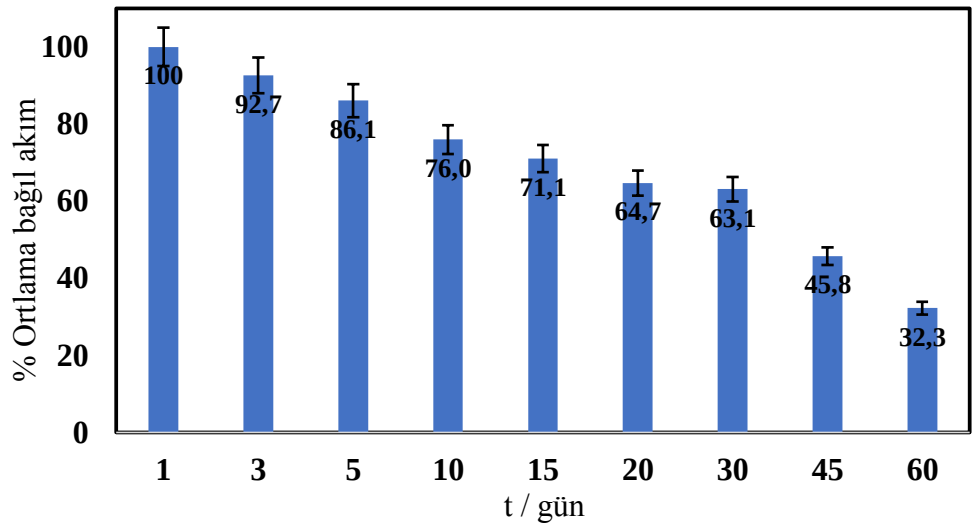
İmmünösensör	Tespit aralığı (U/ml)	Tespit limiti (U/ml)	Metot	Stabilite	Duyarlık	Referans
SPGE/AuNPs/MUDA/MCH/ Ab/rIgG/CA125	0-100	6.7	CV-EIS	-	35 U/mL	Ravalli 2013
SPCE/poly(3-HPA)/anti-CA125	5-80	1.45	DPV	30 gün	-	A.Cristina 2019
MIPGNEE/CA125	0.5-400	0.5	DPV-EIS	-	-	Viswanathan 2012
N-CDs- CA125 aptamer- CA125	0.1-16	0.035	UV- TEM	2 hafta	-	Liu 2019
HRP-Anti CA125	0-30	1.73	CV	7 gün	-	Lina 2006
PGE/N.membrane/ CNT/GA/ CA125/CA125 Antibody/HRP	2–75	1.8	CV	-	3 U/mL	Wang 2011
MWCNT NafionTris(2,2 bipyridyl) cobalt(III)	1.0 - 30 30 - 150	0.36	CV	-	-	Chen 2009
Prussian blue NPs, Colloidal AuNPs	2.0 - 40 40 - 100	0.71	DPV	-	-	Chen 2008
Anti-CA125/Au–Thi-CPE	10-30	1.8	DPV	17 gün	25 U/mL	Tang 2006
GE/MPA/AuNP-SiO_2/QDs/Anti CA125	0-0.1	0.0016	Impedimetric	1-3 hafta	Yüksek	Ahar 2014
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	1-100 pg/mL	1,17 pg/mL	EIS	60 gün	1,48 ohm.mL/pg	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	0,01-10 ng/mL	0,21 ng/mL	EIS	60 gün	40,98 ohm.mL/ng	Bu çalışma

SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	10-50 ng/mL	1,82 ng/mL	EIS	60 gün	16,33 ohm.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	50-500 ng/mL	12,04 ng/mL	EIS	60 gün	1,62 ohm.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	1-100 pg/mL	1,61 pg/mL	DPV	60 gün	0,38 µA.mL/pg	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	0,01-2,5 ng/mL	0,069 ng/mL	DPV	60 gün	18,55 µA.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	10-50 ng/mL	1,64 ng/mL	DPV	60 gün	1,76 µA.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	50-500 ng/mL	16,09 ng/mL	DPV	60 gün	0,17 µA.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	1-100 pg/mL	1,68 pg/mL	SWV	60 gün	0,23 µA.mL/pg	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	0,01-10 ng/mL	0,066 ng/mL	SWV	60 gün	15,45 µA.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	10-50 ng/mL	1,47 ng/mL	SWV	60 gün	0,69 µA.mL/ng	Bu çalışma
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	50-500 ng/mL	13,53 ng/mL	SWV	60 gün	0,082 µA.mL/ng	Bu çalışma

GE : Altın elektrot
HRP :Horsaradish Peroksidaz
DMOAP : Dimetiloktadesil [3- (trimetoksisilil) propil] amonyum klorür
NPs : Nanopartikül
AuNP : Altın nanopartikül
CNT : Karbon nanotüp
PGE : Pirolitik Grafen Elektrot
MWCNT : Çok duvarlı karbon nanotüp
QDs : Kuantum noktaları
MUDA : 11-merkaptoundekanoik asit
MIPGNEE : Moleküler baskılanmış altın nano-elektrot topluluğu
RGO İndirgenmiş grafen oksit
PTH : Politiyonin
SPCE : Yüzey baskılı karbon elektrot
BSA : Sığır Serum Albumin
CA125 : Kanser antijen 125

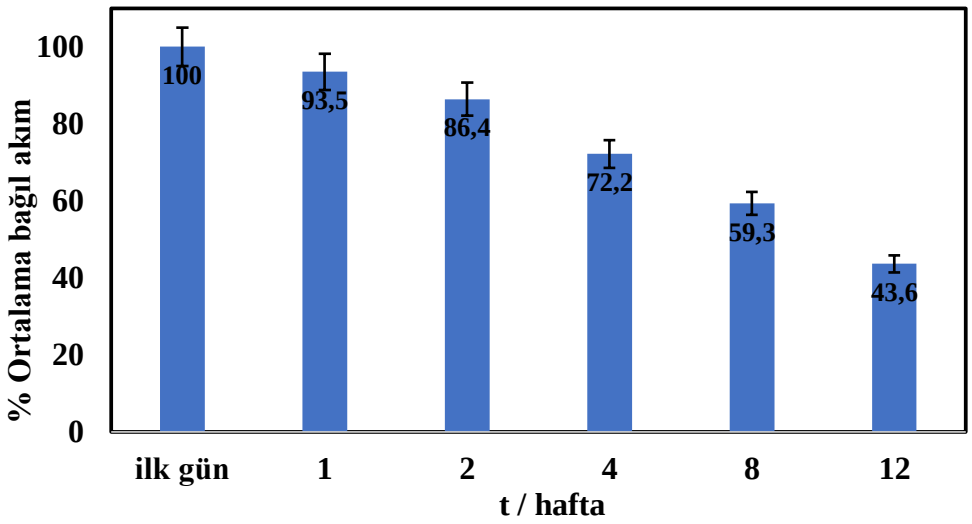
Çizelge 4.6 incelendiğinde; geliştirilen CA 125 immünösensörünün yüksek duyarlığa sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca geliştirilen CA 125 immünosensörü ile CA 125'in, diğer biyosensörlere göre çok daha geniş bir konsantrasyon aralığında taranabildiği göze çarpmaktadır. Diğer çalışmalarda stabilite olarak genelde daha kısa süreler söz konusuyken, bu çalışmada CA 125 immünosensörünün stabilitesi 60 gün olarak belirlenmiştir. CA 125 analizini elektrokimyasal olarak yapan ve bu parametrelere sahip olarak geliştirilen immünosensörün avantaj sağladığını söyleyebiliriz.

CA 125 immünösensörünün uygulama kararlılığı, 50 ng/mL konsantrasyonundaki CA 125 antijeninin 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında pik akımlarının ölçülmesi ile test edilmiştir. 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde 4'er tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Elektrotlar her ölçümden sonra +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. % Ortalama bağıl akım değerleri-gün grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. CA 125 immünösensörünün % ortalama bağıl akım değerleri 3. günün sonunda % 7,3, 5. günün sonunda % 13,9, 10. günün sonunda % 24,0, 15. günün sonunda % 28,9, 20. günün sonunda % 35,3, 30. günün sonunda %36,9, 45. günün sonunda % 54,2 ve 60. günün sonunda ise % 67,7 oranında azalmıştır. CA 125 immünösensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 60. güne kadar yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir immünösensör için, uygulama kararlılığının iyi olduğu ve immünösensör formülasyonunda bulunan RGO, PTH ve AuNP'nin immünösensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir (Lai et al., 2019).



Şekil 4.9. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/BSA immünosensörünün 50 ng/mL CA125 derişimine karşı elde edilen ortalama % bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği

CA 125 immünösensörünün depolama kararlığını belirlemek için elektrotlar BSA basamağına kadar aynı şekilde hazırlandı ve -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. 1., 2., 4., 8. ve 12. haftalarda BSA ve 50 ng/mL CA125'in 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 4'er tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen % ortalama bağıl akım değerleri-hafta sayısı grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125 immünösensörünün 12. haftaya kadar CA 125'e karşı yanıt verdiği görülmüştür. % Ortalama bağıl akım verileri incelendiğinde CA 125'in ilk gün analizine kıyasla immünösensörün ortalama bağıl akımı 1. haftanın sonunda % 6,5, 2. haftanın sonunda % 13,6, 4. haftanın sonunda % 27,8 ve 8. haftanın sonunda % 40,7 oranında azalmıştır. CA 125 immünösensörünün 12. Haftaya kadar CA 125'e karşı yanıt verdiği görülmüştür.

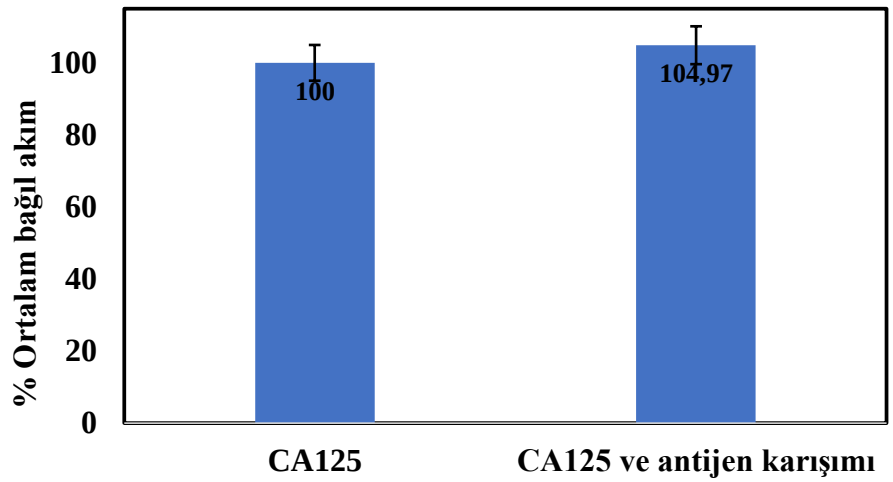


Şekil 4.10. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125 immünosensörünün 50 ng/mL CA125 derişimine karşı elde edilen ortalama % bağıl akım değerleri-hafta sayısı grafiği

4.6. Seçicilik Testi

Seçicilik testi için CA 125 immünosensörünün CA 125'in elektrokimyasal tayininde kullanılmasında, girişim yapabilecek olan HE_4 (İnsan Epididim Proteini 4), AFP (alfa feto protein), MAGE1 (Melanom ile ilişkili antijen 1), Haptoglobin, HSP70 (70 kilodaltonluk ısı şoku proteini), PAK2 (Serin / treonin-protein kinaz 2), SOX2 (SRY (cinsiyet belirleme bölgesi Y) -kutu 2), Leptin, TRAP1 (mitokondriyal ısı şoku proteini 75 kDa) varlığındaki davranışı incelenmiştir. Seçicilik testi için elektrotlar, optimum şartlarda BSA basamağına kadar hazırlanmıştır. Bu antijenlerden 20 ng/mL konsantrasyonlarında alınarak 10 farklı antijen karışımı 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Seçicilik testi analizinde 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde 6'şar tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümlerden elde edilen datalara karşı % bağıl akımlar hesaplandı ve % bağıl akımların ortalaması alınarak Şekil 4.11'deki grafik çizilmiştir. Grafik incelendiğinde, antijen karışımının çok az girişim yaptığı görülmektedir. Bir analitin elektrokimyasal olarak tayini için seçilen yöntem, analitin seçici olarak analiz yapılması için oldukça önemlidir. Çalışmamızda CA 125'in analizini voltametrik yöntemle yapılmasının en önemli sebebi voltametrik yöntemin seçiciliğinin yüksek olmasıdır. Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz CA 125 immünosensörünün CA

125'in elektrokimyasal tayininde girişim yapan türlerin etkisini azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.11. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile CA 125 ve antijen karışımına karşı elde edilen % ortalama bağıl akım grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

4.7. Gerçek Numune Analizi

Geliştirdiğimiz SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA/CA 125 immünösensörü gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Sigma firmasından satın alınan H6914 kodlu insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine 50 pg/mL, 2,0 ng/mL, 25 ng/mL konsantrasyonlarında CA 125 ilave edilerek CA 125 içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. Gerçek numune analizinde 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 2'şer tekrarlı EIS, 3'er tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlerin ortalaması Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Yapay insan kan serum örneklerinde CA 125 analizi

Metot	Eklenen CA125	Hesaplanan CA125	% Geri kazanım	%Hata
EIS	50 pg/mL	47,92 pg/mL	95,26	4,74
	2,0 ng/mL	2,11 ng/mL	105,5	5,5
	25 ng/mL	25,16 ng/mL	100,64	0,64
DPV	50 pg/mL	48,89 pg/mL	97,78	2,22
	2,0 ng/mL	2,063 ng/mL	103,15	3,15
	25 ng/mL	24,74 ng/mL	98,96	1,04
SWV	50 pg/mL	47,67 pg/mL	95,34	4,66
	2,0 ng/mL	2,058 ng/mL	102,9	2,9
	25 ng/mL	24,30 ng/mL	97,22	2,78

Çizelge 4.7'deki değerler incelendiğinde; yapay kan serumu örneklerinde CA 125 analizinin üç farklı yöntemle (EIS, DPV, SWV) ve her bir yöntemde üç farklı CA 125 derişiminde (50 pg/mL, 2,0 ng/mL, 25 ng/mL) yapıldığı görülmektedir. Analiz sonuçları incelendiğinde düşük hata oranlarıyla CA 125'in geri kazanımının yüksek olduğu yani yapılan analizlerin başarılı olduğu görülmektedir. Hata %5'in altındadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

SPCE'lerin yüzeyleri CV ile temizlendikten sonra yüzeye RGO modifiye edilmiş ve SEM ile karakterize edilmiştir. RGO'nun katmanlı, rasgele dağılmış birbirine benzer ince katmanlar halinde buruşuk yüzeyli ve dağınık halde üst üste binmiş yapısı gözlenmiştir. Bu gözlemde elde edilen görüntüler literatürle uyum göstermektedir (A. Shalaby et al. 2015, Tiyek vd. 2016). Elde edilen sonuçlar, RGO'nun SPCE elektrodunun yüzeyine başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermiştir.

CV uygulanarak tiyoninin SPCE/RGO üzerinde elektropolimerizasyonu sağlanmış yani PTH (politiyonin) elde edilmiştir. Döngüsel voltametri, -0,5 V ile + 1,0 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 20 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Yang vd., 1999). SPCE/RGO PTH'lerin WE yüzeyine, 0,1 M KCl'li 50 mM pH 7 fosfat tamponu içinde hazırlanan 0,004 M $HAuCl_4$ çözeltisinden 50 µL damlatılmıştır. Daha sonra -1,3 V ile -0,2 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 10 döngü CV uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Yang vd., 1999). SPCE/RGO/PTH/AuNP'lerin WE yüzeyi 50 mM 3-MPA çözeltisiyle modifiye edilmiştir. 3-MPA ile modifiye edilmiş SPCE'ler karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 gece bekletildikten sonra yüzeyine 0,6 mM EDC - 0,1 mM NHS çözeltisinden damlatılmıştır. Bu basamaktan sonra SPCE üzerinde Anti CA 125 antikorunun tutuklanması sağlanmıştır. Daha sonra BSA ile modifiye edilen SPCE'lerde yüzeyde CA125 antijeninin tutuklanması sağlanmıştır.

118R030 proje numaralı Tübitak 1001 projesi kapsamında HE_4 ve CA 125 immünösensörleri hazırlanmış yapılan deneyler sonucunda literatür verilerine de dayanarak Anti-CA 125 için optimum antikor inkübasyon süresi 45 dakika olarak, CA 125 Antijeni için optimum antikor immobilizasyon süresi 30 dakika olarak kabul edilmiştir. (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd., 2017)

CA 125 immünsensörünün analitiksel karakterizasyonları yapılmış, karakterizasyon parametreleri EIS, DPV ve SWV metotlarıyla yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. CA 125 immünosensörünün tayini; EIS, DPV ve SWV yöntemleri ile her bir metot için

belirlenen 4 farklı lineer aralıkta gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her aralıkta yüksek duyarlık, düşük tespit limiti ve düşük tayin sınırı değerleri gözlenmiştir.

EIS metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 1 – 100 pg/mL'de tespit limiti 0,0012 ng/mL, tayin sınırı 0,004 ng/mL, duyarlık 1480 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9933, tayin aralığı 0,01 – 10 ng/mL'de tespit limiti 0,21 ng/mL, tayin sınırı 0,69 ng/mL, duyarlık 40,98 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9975, tayin aralığı 10-50 ng/mL'de tespit limiti 1,82 ng/mL, tayin sınırı 6,07 ng/mL, duyarlık 16,33 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9966, tayin aralığı 50-500 ng/mL'de tespit limiti 12,04 ng/mL, tayin sınırı 40,13 ng/mL, duyarlık 1,62 ohm.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9978 olarak tespit edilmiştir.

DPV metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 1-100 pg/mL'de tespit limiti 0,0016 ng/mL, tayin sınırı 0,005 ng/mL, duyarlık 380 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9987, tayin aralığı 0,01-2,5 ng/mL'de tespit limiti 0,0690 ng/mL, tayin sınırı 0,200 ng/mL, duyarlık 18,55 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9963, tayin aralığı 10-50 ng/mL'de tespit limiti 1,64 ng/mL, tayin sınırı 5,47 ng/mL, duyarlık 1,76 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9986, tayin aralığı 50-500 ng/mL'de tespit limiti 16,09 ng/mL, tayin sınırı 53,65 ng/mL, duyarlık 0,17 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9961 olarak tespit edilmiştir.

SWV metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 1-100 pg/mL'de tespit limiti 0,0017 ng/mL, tayin sınırı 0,006 ng/mL, duyarlık 230 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9985, tayin aralığı 0,01 – 2,5 ng/mL'de tespit limiti 0,066 ng/mL, tayin sınırı 0,22 ng/mL, duyarlık 15,45 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9977, tayin aralığı 10-50 ng/mL'de tespit limiti 1,47 ng/mL, tayin sınırı 4,91 ng/mL, duyarlık 0,69 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9978, tayin aralığı 50-500 ng/mL'de tespit limiti 13,53 ng/mL, tayin sınırı 45,11 ng/mL, duyarlık 0,082 μA.mL/ng, korelasyon katsayısı 0,9972 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca çalışılan her aralık için elde edilen korelasyon katsayısı değerleri 1'e çok yakındır. Bu da, çalışılan aralıklarda akım ve direncin konsantrasyona bağlı artışının oldukça doğrusal bir şekilde orantılı olduğunu göstermektedir. Tüm bu sonuçlar göz

önünde bulundurulduğunda geliştirilen SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA immünosensörü ile yapılacak CA 125 analizlerinde, CA 125'in geniş bir konsantrasyon aralığında taranabileceği anlaşılmıştır.

CA 125 immünosensörünün tekrarlanabilirliği de test edilmiş ve her bir yöntem (EIS, DPV, SWV) ile elde edilen veriler kullanılarak bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri hesaplanmıştır. EIS için % 3,34, DPV için % 2,03, SWV için % 1,48. Tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değerleri, 10 tekrara kadar CA 125'in tayininin iyi olduğunu göstermiştir.

Literatürde hazırlanan CA 125 immünosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen CA 125 immünosensörünün performans karşılaştırması incelendiğinde; geliştirilen CA 125 immünösensörünün yüksek duyarlığa sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca geliştirilen CA 125 immünosensörü ile CA 125'in, diğer biyosensörlere göre çok daha geniş bir konsantrasyon aralığında taranabildiği göze çarpmaktadır. Diğer çalışmalarda stabilite olarak genelde daha kısa süreler söz konusuyken, bu çalışmada CA 125 immünosensörünün stabilitesi 60 gün olarak belirlenmiştir. CA 125 analizini elektrokimyasal olarak yapan ve bu parametrelere sahip olarak geliştirilen immünosensörün birçok yönden avantaj sağladığını ve biyosensörler arasında çok değerli bir yere sahip olduğunu söyleyebiliriz.

CA 125 immünösensörünün uygulama kararlılığı, 50 ng/mL konsantrasyonundaki CA 125 antijeninin 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında pik akımlarının ölçülmesi ile test edilmiştir. 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde 4'er tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Elektrotlar her ölçümden sonra +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. % Ortalama bağıl akım değerleri-gün grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. CA 125 immünösensörünün % ortalama bağıl akım değerleri 3. günün sonunda % 7,3, 5. günün sonunda % 13,9, 10. günün sonunda % 24,0, 15. günün sonunda % 28,9, 20. günün sonunda % 35,3, 30. günün sonunda %36,9, 45. günün sonunda % 54,2 ve 60. günün sonunda ise % 67,7 oranında azalmıştır. CA 125 immünösensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 60. güne kadar yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir immünösensör için, uygulama kararlılığının iyi olduğu ve immünösensör

formülasyonunda bulunan RGO, PTH ve AuNP'nin immünösensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir (Lai et al., 2019).

CA 125 immünösensörünün depolama kararlığını belirlemek için elektrotlar BSA basamağına kadar aynı şekilde hazırlandı ve -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. 1., 2., 4., 8. ve 12. haftalarda BSA ve 50 ng/mL CA125'in 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 4'er tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen % ortalama bağıl akım değerleri-hafta sayısı grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125 immünösensörünün 12. haftaya kadar CA 125'e karşı yanıt verdiği görülmüştür. % Ortalama bağıl akım verileri incelendiğinde CA 125'in ilk gün analizine kıyasla immünösensörün ortalama bağıl akımı 1. haftanın sonunda % 6,5, 2. haftanın sonunda % 13,6, 4. haftanın sonunda % 27,8 ve 8. haftanın sonunda % 40,7 oranında azalmıştır. CA 125 immünösensörünün 12. haftanın sonunda CA 125'e karşı yanıt verdiği görülmüştür.

Seçicilik testi için CA 125 immünosensörünün CA 125'in elektrokimyasal tayininde kullanılmasında, girişim yapabilecek olan HE4 (İnsan Epididim Proteini 4), AFP (alfa feto protein), MAGE1 (Melanom ile ilişkili antijen 1), Haptoglobin, HSP70 (70 kilodaltonluk ısı şoku proteini), PAK2 (Serin / treonin-protein kinaz 2), SOX2 (SRY (cinsiyet belirleme bölgesi Y) -kutu 2), Leptin, TRAP1 (mitokondriyal ısı şoku proteini 75 kDa) varlığındaki davranışı incelenmiştir. Seçicilik testi için elektrotlar, optimum şartlarda BSA basamağına kadar hazırlanmıştır. Bu antijenlerden 20 ng/mL konsantrasyonlarında alınarak 10 farklı antijen karışımı 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Seçicilik testi analizinde (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl içinde) çözeltisinde 6'şar tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümlerden elde edilen datalara karşı % bağıl akımlar hesaplandı ve % bağıl akımların ortalaması alınarak Şekil 4.11'deki grafik çizilmiştir. Grafik incelendiğinde, antijen karışımının çok az girişim yaptığı görülmektedir. Bir analitin elektrokimyasal olarak tayini için seçilen yöntem, analitin seçici olarak analiz yapılması için oldukça önemlidir. Çalışmamızda CA 125'in analizini voltametrik yöntemle yapılmasının en önemli sebebi voltametrik yöntemin seçiciliğinin yüksek olmasıdır. Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz CA 125 immünosensörünün CA

125'in elektrokimyasal tayininde girişim yapan türlerin etkisini azalttığını göstermektedir.

Geliştirdiğimiz SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA 125/BSA/CA 125 immünösensörü gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Merck firmasından satın alınan insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine 50 pg/mL, 2,0 ng/mL, 25 ng/mL konsantrasyonlarında CA 125 ilave edilerek CA 125 içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. Gerçek numune analizinde 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 2'şer tekrarlı EIS, 3'er tekrarlı DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde düşük hata oranlarıyla CA 125'in geri kazanımının yüksek olduğu yani yapılan analizlerin başarılı olduğu görülmektedir. Hata %5'in altındadır.

Bu tez çalışması sonunda hazırlanan SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti CA125/BSA/CA 125 immünösensörünün göstermiş olduğu yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, uygulama kararlılığı ve gerçek numune analizleri sonuçları, bu immünösensörün yumurtalık kanserinin erken tespitinde biyosensör olarak kullanılması için bir yenilik olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abasıyanık M. F., E. Şakalar, M. Şenel, 2011. Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan biyosensörler, Fatih Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Biyoloji Bölümü, Kimya Bölümü

Ahammad A. J. S., Li Xiao-bo, Rahman Md. Mahbubur, Noh. K. M., Lee J. J., 2013. Characteristics of a Poly(thionine) Modified Glassy Carbon Electrode and the Detection of Dopamine and Uric acid. Int. J. Electrochem. Sci., 8 (2013) 7806 - 7815

Al-Ogaidi, I., et al.,2013. Dual detection of cancer biomarker CA125 using absorbance and electrochemical methods. Analyst. 138(19): p. 5647-53

Andreescu, S. and Sadik, O.A. 2004. Trends and Challenges in Biochemical Sensors for Clinical and Enviroment Monitoring., Pure Appl. Chem., Vol.76(4); pp. 861-878.

Aydın, E. B., & Sezgintürk, M. K., 2017. A sensitive and disposable electrochemical immunosensor for detection of SOX2, a biomarker of cancer. Talanta, 172, 162–170.

Aydın, E. B., Aydın, M., & Sezgintürk, M. K., 2017. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNFα in human saliva and serum samples. Biosensors and Bioelectronics, 97, 169–176.

Bard, A. J. and Faulkner, L. R. 2000. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Wiley.

Bard, A.J., Faulkner, L.R. 2001. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. John Wiley and Sons. Inc. New York, 833 p.

Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. The Journal of clinical investigation 1981;68:1331-7.

Bast RC, Jr., Klug TL, St John E et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. The New England journal of medicine 1983;309:883-7.

Bilgi, M., Ayrancı, E. 2016. "Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase" Sensors and Actuators B: Chemical, 237, 849-855.

Bouanane, H., 2009. Tumor Marker CA125: biochemical and molecular properties. Literature Review in Bulletin du cancer 96(5):597-601.

Brett C.M.A., R.G. Compton, A.C. Fisher, M.H. Latham, A.M. Oliveira Brett Wall-jet electrode linear sweep voltammetry J. Phys. Chem., 1992, 96, 8363-8367.

Büyükkaya, F., 2011. Ferrosenli Fosfazen Bileşiklerinin Elektrokimyasal Davranışları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Canney PA, Moore M, Wilkinson PM, James RD. Ovarian cancer antigen CA 125: a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. British journal of cancer 1984;50:765-9.

Chen F., Liu Y., Chen C., Gong H., Cai C., Chen X., 2017. Respective and

simultaneous detection tumor markers CA 125 andSTIP1 using aptamer-based fluorescent and RLS sensors. Sensors and Actuators B 245 (2017) 470–476

Clark Jr, L. 1956. Monitor and control of blood and tıssue oxygen tensıons. Transactions - American Society for Artifical Internal Organs, 2: 41-42.

Clark, L. C. And Lyons, C., 1962. Electrode systems for continous monitoring in cardiovascular surgery, Ann. N. Y. Acad. Sci., 102,29.

Cornell, B.A., Braac-Maksvytis, V.L., King, L., Osman, P.D., Raguse, B., Wieczorek, L., Pace, R.J. 1997. A biosensor that uses ion-channel switches. Nature, 387: 574-580.

Çolak, Ö. 2014. Sakkoroz Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Çubukçu, M., 2008. Nanokompozitler ve Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları. Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 89s, Muğla.

Diaconu, I., C. Cristea, V. Harceaga, G. Marrazza, I. Berindan-Neagoe, and R. Sandulescu. 2013. 'Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer', Clin Chim Acta, 425: 128-38.

Eggins, B.R., 2002. Chemical Sensors And Biosensors, John Wiley & Sons INC., TP159.C46 E44 2002, 273p. West Sussex.

Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA (September 1999). "Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum". Endocrinology. 140 (9): 4221–7.

Gasparotto, G., et al.,2017, Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 76: p. 1240-1247.

Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B.D. 2002. Application of conducting polymers to biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 17, 345-359.

Grosan, C., Biris, A., Coros, M., Pogacean, F., Pruneanu, S. 2015. Electrochemical and spectroscopic studies of ssDNA damage induced by hydrogen peroxide using graphene based nanomaterials. Talanta, 138: 209–217.

Gürler, B., 2011. Bazı Tetrasiklinlerin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltametrik Tayinleri İçin Moleküler Baskılanmış Polimer Modifiye Elektrotların Hazırlanması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 116s, Isparta.

Hall Eah, 1990. Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; 3-30. Indirect comparisons

Hanife Dursun Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Tümör Belirteçleri ve Klinik Kullanımları

Henry, N. L., Hayes D.F., 2012. Cancer biomarkers,Molecular Oncology, Volume 6, Issue 2, 140-146

Hsiao, M.C., Liao, S.H., Lin, Y.F., Wang, C.A., Pu, N.W., Tsai H.M., and Ma, C.C.M., 2011. Preparation and Characterization of Polypropylene-Grafted-Termally Reduced Graphite Oxide with an Improved Compatibility with Polypropylene-Based Nanocomposite, Nanoscala, 3, 1516-1522.

Karaboğa Sonuç M. N., Sezgintürk M. K., 2019. Cerebrospinal fluid levels of alpha-synuclein measured using a poly-glutamic acid-modified gold nanoparticle-doped disposable neurobiosensor system. Analyst 144:

611-621.
Kılınç, M.E., 1996. Enzime Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Mediyatör Kullanarak Tasarımı. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 60s, İzmir.
Kreader CA, March 1996. "Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein". Applied and Environmental Microbiology. 62 (3): 1102–6. PMC 167874.
Kroger, S., and B. Danielsson. 1997. Chapter 13: Calorimetric biosensors. Handbook of Biosensors and Electronic Noses—Medicine, Food, and the Environment, 279-298. E. Kress-Rogers, ed. Boca Raton, FL: CRC Press
Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2008. Electrochemical biosensing of DNA immobilized poly (vinylferrocenium) modified electrode. Electroanalysis, 20: 2563-2570.
Kuralay, F., Campuzano, S., Haake, D., Wang, J. 2011. Highly sensitive disposable nucleic acid biosensors for direct bioelectronic detection in raw biological samples. Talanta, 85: 1330-1337.
Lai, G., Yin, C., Tan, X., Zhang, H., & Yu, A. (2014). Amplified inhibition of the electrochemical signal of graphene–thionine nanocomposites using silica nanoprobes for ultrasensitive electrochemical immunoassays. Anal. Methods, 6(7), 2080–2085. doi:10.1039/c4ay00020j.
Lai, Y., Huang, H., Xia, Z., Li, S., Deng, Y., & Liu, X., 2019. A sandwich-type electrochemical immunosensor using polythionine/AuNPs nanocomposites as label for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen. Materials Express, 9(5), 444-450.
Lapidot, Y., et al. 1967. J. Lipid Res. 8: 142-145. PMID: 14564721
Lu, W.-K., Basak, S. and Elsenbaumer, R.L. 1998. Corrosion inhibition of metals by conductive polymers. Handbook of conducting polymers, Skotheim, T.A., Elsenbaumer, R.L. and Reynolds, J.R. (Eds). Marcel Dekker Inc., 2.nd edition, pp. 885-889, New York.
Martin, E.J. 2001. Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating, Master's Thesis, http://scholar.lib.vt.edu/theses/ available/etd-02172001 014116/ unrestricted/ JEMartinETD.pdf
Marvin J.W., Wiefred S.P. 1969. "Example of the $[H_5O_2]$+ ion. Neutron diffraction study of tetrachloroauric acid tetrahydrate". Journal of the American Chemical Society. 91 (3): 776–777.
Mitchell, D; Renda, A; Douds, C; Babitzke, P; Assmann, S; Bevilacqua, P., 2019. "In vivo RNA structural probing of uracil and guanine base-pairing by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)". RNA. 25 (1): 147-157.
Monk, P.M.S. 2001. Fundamentals of electroanalytical chemistry, Wiley, 342 p., NewYork.
Moon, I. K., Lee, J., Ruoff, R. S., Lee, H. 2010. Reduced graphene oxide by chemical graphitization. Nature Communıcatıons, 73: 664.
Moore RG, McMeekin DS, Brown AK et al, 2009. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA 125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. Gynecologic oncology 2009;112:40-6.
Novoselov K. S, Geim A. K, Morozov S. V, Jiang D, Zhang Y, Dubonos S. V, Grigorieva I.V, Firsov A. A, 2004. Electric field effect in atomically

thin carbon films. Science 306 (5696), 666-669.
Ouellet, Michel, 2006. "How Blocking Works in Immunocytochemical Analysis with Serum or BSA". MadSci Network: Biochemistry. MadSci Network.
Perçin, S., 2008. Bazı Sülfonamitlerin Elektrokimyasal ve Kromatografik Davranışlarının İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 171s, Isparta.
Rao C.N.R, Sood A.K, Subrahmanyam K.S, Govindaraj A, 2009. Graphene: The new two-dimensional nanomaterial. Angew. Chem., Int. Ed., 48: 7752-7777.
Richard S. Pottorf, Peter Szeto, 2001. "1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride". e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.
Rosenthal AN, Menon U, Jacobs IJ, 2006. Screening for ovarian cancer. Clinical obstetrics and gynecology 2006;49:433-47.
Selma Tunç Yüksek Lisans Tezi, DNA Hasarı Tayini İçin Grafene Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Hazırlanması, 2017
Shalaby, A., Nihtianova, D., Markov, P., Staneva, A. D., Iordanova, R. S.and Dimitriev, Y. B. 2015. Structural analysis of reduced graphene oxide by transmission electron microscopy. Bulgarian Chemical Communications, 47(1), 291-295.
Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., 1999. Analitik Kimya Temelleri 1, Bilim Yayıncılık,Ankara
Skoog D.A, Holler F.J, Crouch S.R, 2007. Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition. Thomson Brooks/Cole Publishing, 1039p, Belmont.
Stankovich S, Dikin D.A, Dommett G.H.B, Kohlhaas K.M, Zimney E.J, Stach E.A (2006). Graphene-based composite materials. Nature, 442: 282–286.
Sun S-H., Lee M-J., Lee Y-H., Lee W., Song X. and Chen C-Y., 2014. Immunoassays for the cancer biomarker CA125 based on a large-birefringence nematic liquidcrystal mixture, Optical Society of America
Sahin M., 2013, Etanol-Metanol Karışımının Tayini İçin Yüzey Baskılı Elektrotların Modifiye Edilmesiyle Amperometrik Alkol Biyosensörünün Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 191s., Antalya.
Sahin M., Ayrancı, E. 2015. "Electrooxidation of NADH on Modified Screen-Printed Electrodes: Effects of Conducting Polymer and Nanomaterials", Electrochimica Acta, 166, 261–270.
Tang D., Yuan R., Chai Y., 2006. Electrochemical immuno-bioanalysis for carcinoma antigen 125 based on thionine and gold nanoparticles-modified carbon paste interface, Analytica Chimica Acta 564 (2006) 158–165
Telefoncu, A. 1999. Biyosensörlere genel bakış. Biyokimya Lisans Üstü Yaz okulu, 1-9.
Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. Biosensors and Bioelectronics, 16, 121-131.
Tischeri, W. and Wedekind, F., 1999. Immobilized Enzymes: Methods and Applications, Topics in Current Chemistry,Vol. 200; pp. 96-123.
Tiyek, İ., Dönmez, U., Yıldırım, B., Alma, M. H., Ersoy, M. S. ve Karataş, Ş., 2016. Kimyasal yöntem ile indirgenmiş grafen oksit sentezi ve

karakterizasyonu. Sakarya University Journal of Science, 20(2), 349-357.
Urban, G. 2000. Biosensors Microsystems, Sensors Update, Vol.8(1); pp.189-214.
Vaidyanathan S., Eduardo E.W., Prashant V.K., 2004. "Catalysis with TiO2/Gold Nanocomposites. Effect of Metal Particle Size on the Fermi Level Equilibration". Journal of the American Chemical Society. 126: 4943–4950.
Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. Biosystems Engineering, Vol.84(1); pp.1-12.
Vidal, J.C., Garcia, E. and Castillo, J.R. 1999a. In situ preparation of a cholesterol biosensor: entrapment of cholesterol oxidase in an overoxidized polypyrrole film electrodeposited in a flow system Determination of total cholesterol in serum. Analytical Chimica Acta, 385, 213-222.
Vidal, J.C., Garcia, E. and Castillo, J.R. 1999b. In situ preparation of overoxidized PPy/oPPD bilayer biosensor for the determination of glucose and cholesterol in serum. Sensors and Actuators B, 57, 219-226.
Vidal, J.C, Garcia-Ruiz, E. and Castillo, J.R. 2003. Recent Advances in Electropolymerized Conducting Polymers in Amperometric Biosensors Microchim. Acta 143, 93–111.
Viswanathana S., Ranib C., Ribeiroa S., Delerue-Matosa C., 2012. Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of ovarian cancer marker, Biosensors and Bioelectronics 33 (2012) 179– 183.
Wang, J. 2000. Analytical Electrochemistry. 2nd edition. John Wiley and Sons. Inc. New York.
Wang, J. 2005. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. Electroanalysıs, 17: 7-14.
Wang, J. 2006a. Analytical Electrochemistry, Wiley.
Wang, PY; Sexton, AN; Culligan, WJ; Simon, MD, 2019. "Carbodiimide reagents for the chemical probing of RNA structure in cells". RNA. 25 (1): 135–146.
Wu, J., et al., 2007. A disposable two-throughput electrochemical immunosensor chip for simultaneous multianalyte determination of tumor markers. Biosens Bioelectron.
Yanbin L., 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA:
Yang P, Wang L, Wu Q, Chen Z, Lin X, 2014. A method for determination of glucose by an amperometric bienzyme biosensor based on silver nanocubes modified Au electrode. Sensor Actuat B-Chem., 194: 71-78.
Yang R., Ruan C., Dai W., Deng j., Kong J., 1999. Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H2O2 biosensor based on poly(thionine). Elsiver Volume 44, Issue 10, January 1999, Pages 1585-1596
Yüce, M., 2011. Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Biyoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, 113s, Ankara.
Zeybek, B. 2010 Bazı İletken Polimerlerin Elektrokimyasal Sentezi ve Uygulamaları.

Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
Zhou, X., Huang X., Qi, X., Wu, S., Xue C., Boey, F., Yan, Q., Chen P., Zhang H. 2009. In situ synthesis of metal nanoparticles on single-layer graphene oxide and reduced graphene oxide surfaces. The Journal of Physıcal Chemistry, 113: 10842-10846.
Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M. Ganesh, K., Cai, W., Ferreira, P., Pirkle, A., Wall, R. 2011. Carbon-based supercapacitors produced by activation of graphene. Science, 332: 1537-1541.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Soner AKTAN
Doğum yeri	: Akdeniz-MERSİN
Doğum tarihi	: 15.01.1983
Medeni hali	: Evli
Yabancı Dili	: İngilizce
E-posta	: snraktan@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve yıl)

Lise	: Mersin 19 Mayıs Süper Lisesi	1997-2001
Lisans	: Antalya Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölüm	2001-2007
Yüksek Lisans	: Konya Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Endüstri Mühendisliği Bölümü Tezsiz Y.L.	2016-2017
Yüksek Lisans	: Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü Tezli Y.L.	2017-

Uluslararası Kongreler :

M. Bilgi Kamaç, M.Altun, S.Aktan, M. Yılmaz, M.K. Sezgintürk. Preparation and electrochemical characterization of label-free CA125 biosensor on screen-printed electrode modified with nanoparticles and conducting polymers, EUROANALYSIS, İstanbul 1-5 September 2019 (Poster Sunumu).