T.C.

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELEKTROKİMYASAL HE_4 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Ayla YILMAZ AKTAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ayla YILMAZ AKTAN tarafından hazırlanan **"**ELEKTROKİMYASAL HE_4 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması 24/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği 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 HE_4 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).

Ayla YILMAZ AKTAN

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELEKTROKİMYASAL HE_4 İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Ayla YILMAZ AKTAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Bu araştırmada, bir kanser biyobelirteci olan insan epididimis protein 4'ün (HE_4) 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-HE_4'ün 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 HE_4 immünosensörünün optimum çalışma parametreleri DPV ve EIS metotları ile belirlenmiş ve optimum Anti-HE_4 konsantrasyonu 33,33 µg/mL, optimum Anti-HE_4 inkübasyon süresi 45 dk ve optimum HE_4 inkübasyon süresi 30 dk olarak bulunmuştur. Optimum şartlarda elektrokimyasal HE_4 immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu yapılmıştır. EIS, DPV ve SWV metotları ile belirlenen doğrusal tayin aralıkları 1-100 $pg.mL^{-1}$, tespit limitleri sırasıyla 2,16 $pg.mL^{-1}$, 1,04 $pg.mL^{-1}$ ve 1,16 $pg.mL^{-1}$ olarak belirlenmiştir. HE_4 immünosensörünün tekrarlanabilirliği 50 $ng.mL^{-1}$ HE_4 konsantrasyonu için test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri EIS, DPV ve SWV metotları için sırasıyla %4,09 (n=10), %4,29 (n=10) ve %1,95 (n=10) olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen HE_4 immünosensörünün uygulama kararlığı 60 gün boyunca, depolama kararlığı ise 12 hafta depolama süresince voltametrik metotlarla incelenmiştir. HE_4 immünosensörünün seçiciliği 9 farklı antijen karışımı varlığında HE_4'ün analizinin yapılmasıyla test edilmiş ve antijen karışımının % 3,67'lik bir girişim yaptığı bulunmuştur. Hazırlanan HE_4 immünosensörleri insan kan serumu örneklerine bilinen miktarda ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki HE_4'ün analizi için kullanılmış ve %95'in üstünde geri kazanımlar elde edilmiştir.

2020, 86 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Elektrokimyasal HE_4 immünosensörü, kanser biyobelirteci, indirgenmiş grafen oksit, politiyonin, altın nanopartikül, yüzey baskılı karbon elektrotlar.

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL HE_4 IMMUNOSENSOR

Ayla YILMAZ AKTAN

Cankiri Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Melike BILGI KAMAC

In this study, a new immunosensor was developed for the electrochemical determination of human epididymis protein 4 (HE_4) 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-HE_4 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 HE_4 immunosensor were determined by DPV and EIS methods. The optimum Anti-HE_4 concentration, incubation time of Anti-HE_4 and incubation time of HE_4 were found to be 33.33 μg/mL, 45 min and 30 min, respectively. The analytical characterization of electrochemical HE_4 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 2.16 $pg.mL^{-1}$, 1.04 $pg.mL^{-1}$ and 1.16 $pg.mL^{-1}$, respectively. The repeatability of the HE4 immunosensor was tested for 50 $ng.mL^{-1}$ HE_4 concentration and relative standard deviation (R.S.D.) values were calculated as 4.09% (n = 10), 4.29% (n = 10) and 1.95% (n = 10) for EIS, DPV and SWV methods, respectively. The operation stability of the developed HE_4 immunosensor was examined by voltammetric methods for 60 days, and the storage stability for 12 weeks. The selectivity of the HE_4 immunosensor was tested by performing HE_4 analysis in the presence of 9 different antigen mixes and it was found that the antigen mixture made a 3.67% interference. The prepared HE_4 immunosensors were used for the analysis of different concentrations of HE_4 added to the human blood serum samples in a known amount and over 95% recoveries were obtained.

2020, 86 pages

KEYWORDS: Electrochemical HE_4 immunosensor, cancer biomarker, reduced graphene oxide, poly(thionine), gold nanoparticle, screen printed carbon electrodes.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisansa başladığım günden itibaren benimle sevgiyle ilgilenen, yol gösteren, değerli bilgilerini paylaşan, desteğini esirgemeyen, azim ruhunu ve çalışma şevkini aşılayan sayın danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ'a, değerli bilgilerini paylaşan ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK ile Dr. Öğretim Üyesi Muhammed ALTUN'a özellikle çok teşekkür ederim.

Ayrıca; her konuda desteğini hissettiren, ilgi ve sevgisiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Y. Lisans öğrencisi Soner AKTAN'a,

İlgi ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Y. Lisans öğrencisi Kadir ERDEM'e,

Laboratuvar çalışmalarımda ve tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen arkadaşım Doktora Öğrencisi Merve YILMAZ'a,

Tez aşamasında ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen, sevgisini daima hissettiren arkadaşım Ayşe KAYA'ya,

Her zaman desteğini, ilgi ve sevgisini hissettiren ve meslektaşım olmasından onur duyduğum canım ablam Y. Kimyager Sevcan YILMAZ'a,

Azim ruhunu örnek aldığım, sevgi ve desteğini her daim hissettiğim canım annem Fatma YILMAZ'a

Annemle birlikte, benden inanç ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım babam Bedir YILMAZ'a ve

Sevgi ve inançlarını hissettiğim aile üyelerim ve dostlarıma çok teşekkür ederim.

<<Hayatıma ışık gibi doğan ve bana uğur getiren **kalbim oğlum AREN'e**…>>

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.

Ayla YILMAZ AKTAN

Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
GİRİŞ. 1
1.1. Kanser ve Kanserin Nedenleri 1
1.1.1. Yumurtalık Kanseri 2
1.2.1. Yumurtalık Kanseri Belirtileri Nelerdir? 3
1.2.2. Yumurtalık Kanseri Teşhis Yöntemleri 4
1.3. Kanser Biyobelirteçleri 4
1.3.1. HE_4 Biyobelirteci 5
1.4. Biyosensör 6
1.4.3.2. İmmünosensörler 11
1.5. Voltametri 11
1.5.1. Voltametride Uyarma Sinyalleri 12
1.5.1.1. Dönüşümlü Voltametri (CV) 12
1.5.1.2. DPV (Diferansiyel Puls Voltametrisi) 13
1.5.1.3. SWV (Kare Dalga Voltametrisi) 14
1.5.2. Voltametride Kullanılan Çalışma Elektrotları 15
1.6. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) 16
1.7. Antijen/Antikor Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri 17
1.8. Grafen, Grafen Oksit, İndirgenmiş Grafen Oksit 20
1.9. Politiyonin (PTH) 22
1.10. Hasta Başı Testi (Point of Care Testing) 23
2. KAYNAK TARAMALARI 25
3. MATERYAL ve METOT 31
3.1. Materyal 31

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 31
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Materyaller 31
3.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi 31
3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler 33
3.2. Metot 34
3.2.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi 34
3.2.2. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması 34
3.2.3. SPCE'lerin RGO ile modifikasyonu 35
3.2.4. SPCE/RGO üzerinde PTH'nin hazırlanması 35
3.2.5. SPCE/RGO/PTH'lerin Altın Nanopartikül ile Kaplanması 35
3.2.6. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile HE_4 İmmünösensörünün Hazırlanması 36
3.2.6.1. SPCE/RGO/PTH/AuNP'lerin 3-MPA ve EDC-NHS ile aktivasyonu 36
3.2.6.2. Anti-HE_4'ün SPCE/RGO/PTH/AuNP'ler üzerine immobilizasyonu 37
3.2.6.3. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4'lerin BSA ile modifikasyonu 37
3.2.6.4. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA'ların HE_4 antijeni ile tutuklanması 38
3.2.6.5. Elektrokimyasal ölçümler 38
4. BULGULAR 40
4.1. SPCE'lerin indirgenmiş grafen oksit ile modifikasyonu 40
4.2. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu 40
4.3. HE_4 İmmünosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu 44
4.4. HE_4 İmmunosensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi 50
4.4.1. Anti-HE_4 antikor konsantrasyonunun optimizasyonu 50
4.4.2. Anti-HE_4 inkübasyon süresinin optimizasyonu 52
4.4.3. HE_4 antijen inkübasyon süre optimizasyonu 55
4.5. HE_4 İmmünosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu 58
4.6. Seçicilik Testi 71
4.7. Gerçek Numune Analizi 72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 74
KAYNAKLAR 80
ÖZGEÇMİŞ 86

SİMGELER DİZİNİ

Ab	Antikor (Antibody)
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
AE	Yardımcı elektrot
AFP	Alfa feto protein
AUC	Eğrinin altındaki alan
AuNP	Altın nanopartikül
BSA	Sığır serum albümin
Bi-SPCE	Bizmut film kaplı yüzey baskılı karbon elektrot
CA	Kronoamperometri
CA 125	Kanser antijen 125
CA 15-3	Kanser antijen 15-3
CA19-9	Kanser antijen 19-9
CC	Kronokulometri
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CMIA	Kemilüminesans mikropartikül immünoanalizi
CPE	Karbon pastası elektrodu
CV	Döngüsel voltametri
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EDC	Etil,3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ELISA	Enzime bağlı immünosorban analizi
EOC	Epitelyal over kanseri
Epa	Anodik pik gerilimi
Epk	Katodik pik gerilimi
ESR	Elektron spin rezonans spektrometresi
FTIR	Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometresi
FTO	Flor katkılı kalayoksit elektrot
GCE	Camsı karbon elektrot
GF	Grafen
GO	Grafen oksit
$HAuCl_4$	Kloro aurik asit
HE_4	İnsan epididimis protein-4
Hg-SPCE	Cıva tuzlu yüzey baskılı karbonelektrot
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HSP70	70 kilodaltonluk ısı şoku proteini
ICP-MS	Endüktif olarak eşleştirilmiş plazma kütle spektrometrisi
Ipa	Anodik pik akımı
Ipk	Katodik pik akımı
ITO	İndiyum kalay oksit elektrodu
LSPR	Lokalize yüzey plazmon rezonans
LSV	Doğrusal taramalı voltametri
MAGE1	Melanom ile ilişkili antijen 1
MGCE	Manyetik camsı karbon elektrot

3-MPA	3-Merkaptopropiyonik asit
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NPV	Normal puls voltametri
O_2	Oksijen
OC	Yumurtalık kanseri (Ovarian Cancer)
OC 125	Ovaryum kanseri 125 antikoru
PAK2	Serin / treonin-protein kinaz 2
PGE	Kalem grafit elektrot
POCT	Hastabaşı testi (Point of Care Testing)
PSA	Prostat spesifik antijen
PTH	Politiyonin
RE	Referans elektrot
RGO	İndirgenmiş grafen oksit
RMI	Malignite indeksi
RNA	Ribonükleik asit
ROC	Alıcı çalışma karakteristik eğrisi
ROMA	Yumurtalık malignite riski algoritması
RSD	Bağıl standart sapma
SAM	Tek katmanlı molekülleri (Self-assembly monolayer)
SOX2	SRY (cinsiyet belirleme bölgesi Y) -kutu 2
SPCE	Yüzey baskılı karbon elektrot (Screen printed carbon electrode)
SPE	Yüzey baskılı elektrot
SV	Sıyırma voltametrisi
SWASV	Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi
SWV	Kare dalga voltametri
Th	Tiyonin
TRAP1	Mitokondriyal ısı şoku proteini 75
UV-vis	UV-görünür bölge spektroskopisi
WE	Çalışma elektrodu
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Yumurtalık kanseri..... 2
Şekil 1.2. Yumurtalık kanserinin 5 yıllık süreçteki gelişimi..... 3
Şekil 1.3. Biyosensörün çalışma prensibi. 7
Şekil 1.4. Voltametride uyarma sinyalleri çeşitleri..... 12
Şekil 1.5. 3-MPA (3-Merkaptopropiyonik asit)'nın kimyasal formülü..... 18
Şekil 1.6. EDC ve NHS a.1-etil-3-(3-dimetilamino-propilin kimyasal formülü. b. N-hidroksisüksinimidin kimyasal formülü. 19
Şekil 1.7. Grafenin Yapısı (a.Kimyasal yapı, b.Grafen bileşiğinin kristal yapısı)..... 20
Şekil 1.8. Grafenin Oksitlenmesi (GF:Grafen, GO:Grafen oksit) 21
Şekil 1.9. Grafenin GO ve rGO'ya dönüştürülmesi 22
Şekil 1.10. Tiyoninin kimyasal formülü 23
Şekil 3.1. Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat. 32
Şekil 3.2. Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA..... 32
Şekil 3.3. SPCE: Screen Printed Carbon electrode (Yüzey baskılı karbon elektrotlar) 33
Şekil 3.4. Yüzey baskılı elektrotlar (SPCE) için sensör konnektör çeşitleri A) Kesikli analiz için kablo şeklinde B) Damlamalı analizler için kutu şeklinde. 33
Şekil 3.5. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre..... 34
Şekil 3.6. DropSens mikrostat 400 bipotansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi. 39
Şekil 3.7. Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi. 39
Şekil 4.1. Yalın SPCE (A) ve SPCE/RGO (B) elektrotlarının SEM görüntüleri..... 40
Şekil 4.2(A). 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. 42
Şekil 4.2(B). 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. 42
Şekil 4.2(C). 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. 43
Şekil 4.2(D). Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları (EIS: 0,5–50000 Hz). 43
Şekil 4.3(A). HE_4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,5 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4. 47
Şekil 4.3(B). HE_4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,5V potansiyel

aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4. 47
Şekil 4.3(C). HE_4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,55 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4. 48
Şekil 4.3(D). HE4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4 (EIS: 0,5–50000 Hz). 49
Şekil 4.4(A). Anti-HE_4'ün farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 51
Şekil 4.4(B). Anti-HE_4'ün farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 51
Şekil 4.5(A). Anti-HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 53
Şekil 4.5(B). Anti-HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 54
Şekil 4.6.(A). HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 56
Şekil 4.6.(B). HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 56
Şekil 4.7(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 1 ile 100 pg/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl)..... 58
Şekil 4.7(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 1 ile 100 pg/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). ... 59
Şekil 4.7(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 1 ile 100 pg/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). ... 59
Şekil 4.8(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl)..... 60

Şekil 4.8(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 0,05 ile 2,5 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). .. 60
Şekil 4.8(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 0,1 ile 10 ng/mL aralığında artan HE_4 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 61
Şekil 4.9(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 10 ile 50 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl)..... 62
Şekil 4.9(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 10 ile 50 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). ... 62
Şekil 4.9(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 10 ile 50 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). ... 63
Şekil 4.10(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 50 ile 500 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl)..... 64
Şekil 4.10(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE4 immünosensöründe HE4'ün 50 ile 500 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 64
Şekil 4.10(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 50 ile 500 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 65
Şekil 4.11. HE_4 immünosensörünün 50 ng/mL HE_4 konsantrasyonuna karşı elde edilen yüzde ortalama bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 70
Şekil 4.12. HE_4 immünosensörünün 50 ng/mL HE_4 konsantrasyonuna karşı elde edilen ortalama yüzde bağıl akım değerleri-hafta sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl). 71
Şekil 4.13. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörü ile HE_4 ve antijen karışımına karşı elde edilen % ortalama bağıl akım grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl)..... 72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Elektrokimyasal ölçüm parametreleri……...….38
Çizelge 4.1. SPCE/RGO/PTH/AuNP transduserinin hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç değerleri ile CV, DPV ve SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri……..44
Çizelge 4.2. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA/HE_4 immünosensörünün hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç değerleri ve CV, DPV ile SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri……..49
Çizelge 4.3. Şekil 4.4(A) ve Şekil 4.4(B)'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri……..52
Çizelge 4.4. Şekil 4.5(A) ve Şekil 4.5(B)'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri……..54
Çizelge 4.5. Şekil 4.6(A) ve Şekil 4.6(B)'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon değerleri……...57
Çizelge 4.6. HE_4 immünosensörü için analitiksel karakterizasyon verileri……...66
Çizelge 4.7. HE_4 immünosensörünün tekrarlanabilirlik testi sonuçları…….....67
Çizelge 4.8. Literatürde hazırlanan HE_4 immünosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen HE_4 immünosensörünün performans karşılaştırması……68
Çizelge 4.9. Yapay kan serumu (insan kan serumu) örneklerinde HE_4 analizi……..73

GİRİŞ

1.1. Kanser ve Kanserin Nedenleri

Kanserin kelime anlamı, bir doku ya da organdaki hücrelerin düzensiz bir şekilde bölünüp çoğalmasıyla meydana gelen 'kötü ur'dur. Genel anlamıysa, vücudumuzdaki çeşitli bölgelerde bulunan hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalması sonucu meydana gelen ve 200'den fazla çeşidi bulunan bir tür hastalıktır (Al-Ogaidi et al., 2013). Dünyada, ortalama olarak her yıl 11 milyondan fazla kişiye kanser teşhisi konuluyor ve 7,6 milyon insan kanser yüzünden ölüyor. Bu oranı düşündüğümüz zaman, kanserin ortalama %69 gibi bir oranda tedavi edilemeyip ölüme sebebiyet veren bir hastalık olduğu görülmektedir. Kanser, çevresel veya kalıtsal kaynaklı spesifik genetik ve epigenetik kusurların birikmesi nedeniyle anormal ve kontrolsüz hücre büyümesiyle ortaya çıkar. Düzenlenmemiş hücre büyümesi, zaman içinde bir tümör kitlesinin oluşmasına yol açar. Kanser ilerledikçe, tümör başlangıç bölgesinin etrafına yayılmaya başlar, yani vücudun diğer organ ve sistemlerine metastaz yapar, bu da onu tedavi edilemez kılar (Malhotra et al., 2016).

Alkol ve sigara kullanma, röntgen ışınına aşırı dozda maruz kalma, tehlikeli saatlerde ve uzun süre güneş altında kalma, maruz kalınan radyasyon, boya maddeleri, benzin, katran, asbest vb. kimyasal maddeler, bazı virüs çeşitleri, kötü beslenme alışkanlığı hava kirliliği gibi sebepler kansere neden olmaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA)'in bütünlüğü, çevresel faktörler sebebiyle sürekli olarak tehdit altında bulunmaktadır. Bazı hücresel olaylar sırasında DNA'nın yapısında değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişiklikler, ekzojen veya endojen faktörlerin etkisi ile, genetik materyalin moleküler bütünlüğünde oluşur ve "DNA hasarı" olarak adlandırılırlar.

Bir hücre, içerisinde meydana gelen DNA hasarına karşı, dört önemli yanıt verir:
a)Apoptoz: Ciddi derecede hasar görmüş hücreler elenir, yani programlı olarak hücre ölümüdür. b)DNA onarımı: Hasarlı olan DNA çıkarılır ve DNA'nın çift zinciri yeniden, doğru olacak bir biçimde, yeniden yapılandırılır. c)DNA hasarının kontrol noktaları aktive edilerek hücre döngüsünün ilerlemesi engellenir, böylelikle; hasarlı

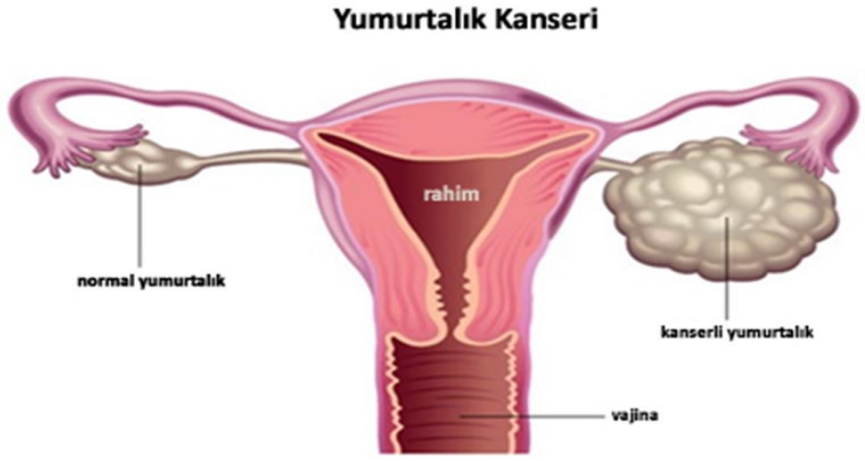
genetik materyalin tamir edilmesine olanak sağlanır ve hasarlı olan kromozomların genetik geçişi önlenir. d)Transkripsiyonel cevap: Hücrenin gen transkripsiyon düzeyleri, hücrenin yararına olacak bir şekilde değişir.

Eğer bu yanıtlardan herhangi bir tanesi işlev görmezse hücre düzeyinde genomik kararsızlık oluşur. Bunun sonucunda ise, organizma düzeyinde, genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma meydana gelir (Sancar ve Kulaksız, 2007).

Bazı önemli kanser türleri şunlardır: beyin tümörleri, akciğer, karaciğer, mide, rahim ağzı, meme**,** prostat, bağırsak, göz**,** böbrek, pankreas, özofagus**,** yumurtalık, nazofarenks, rahim, testis, mesane ve melanom cilt kanseri.

1.1.1. Yumurtalık Kanseri

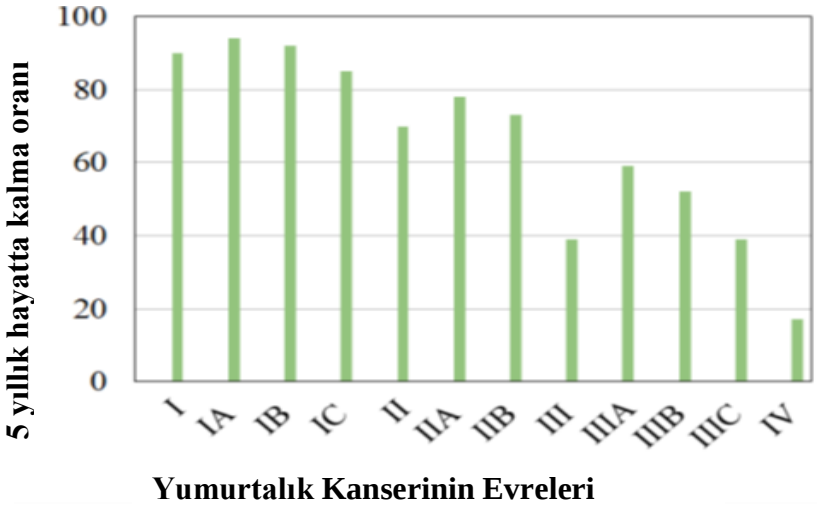
Yumurtalık hücrelerinin, kontrolsüz bir şekilde çoğalarak bir tümör oluşturmasıyla yumurtalık kanseri meydana gelir (Şekil 1.1). Eğer tedavi edilmez ise, tümör hücreleri vücudun çevresindeki dokulara ve diğer yerlere yayılabilir.



Şekil 1.1. Yumurtalık kanseri (http://www.cyterix.com/about-the-ovarian-cancer-and-its-types/).

ABD'de her yıl yaklaşık 20.000 kadına yumurtalık kanseri teşhisi konulmaktadır. Kadınlarda yumurtalık kanseri, kanser ölümlerinin en büyük beşinci nedenidir. Dünya çapında her yıl 225.500 kişi over kanserine yakalanmakta ve hastaların yarısından fazlası ölmektedir (Al-Ogaidi et al., 2013). Genellikle, diğer organlara

yayıldıktan sonra tespit edilebilmektedir. Bu yüzden en fazla yaşam kaybı ile sonuçlanan jinekolojik bir kanser türüdür.



Şekil 1.2. Yumurtalık kanserinin 5 yıllık süreçteki gelişimi. (<InnovativePoint-of-CarePOCMicroBiochipforEarly-Shiqiang.pdf>, 2018)

Yumurtalık kanserinin 5 yıllık süreçteki gelişimi Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Yumurtalık kanserinin erken teşhisinde sağ kalım oranları %90'larda iken, son safhalarında tespit edildiğinde sağ kalım oranı %20'lere kadar düşmektedir.

1.2.1. Yumurtalık Kanseri Belirtileri Nelerdir?

Yumurtalık kanseri, bazen karın boşluğuna yayılabilmekte ve karın boşluğunda su toplanmasına neden olmaktadır. Bu da karında şişlik, ağrı, nefes alıp vermede zorluk gibi şikayetlere neden olmaktadır. Ancak, hastalığın ilk safhalarında semptomlar yoktur. Belirtileri, son aşamalara gelene kadar belirsizdir. Fakat o dönemlerde yumurtalıkların haricinde organlara sıçramıştır. İlerlemiş evrelerde karın ağrısı, şişkinlik, yemek yemede zorluk ve kabızlık gibi yaygın belirtiler vardır. Ancak yumurtalık kanserini tanımlamaya yetecek kadar özgün değildir. Daha sonraki aşamalarda vajinal kanama, kilo artışı veya kilo azalması, mide bulantısı ve kusma gibi belirtiler gözlenmektedir. Geç bir aşamada, sağ kalma oranları çok düşüktür ve bu da OC'yi "Sessiz Katil" yapar (Al-Ogaidi et al., 2013, Malhotra et al., 2016).

1.2.2. Yumurtalık Kanseri Teşhis Yöntemleri

Yumurtalık kanseri varlığını göstermeye başladığı zaman, bilgisayarlı tomografi, transvajinal ultrason veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi yöntemlerle tanı konulur, daha sonra büyüklüğü saptanır. Hastalık evresini doğrulamak için laparoskopi ve biyopsi yapılır. Protein esaslı testler, serum, kan veya idrar örnekleri kullanılarak yapılan kanser tarama ve izleme testleri de birer alternatiftir. Eğer kanser daha erken teşhis edilirse, başarılı bir şekilde tedavi edilmesi daha kolay olabilir. Ayrıca, genellikle karmaşık ve pahalı tedavilere de gerek kalmaz. Erken evre kanser hastaları için hayatta kalma şansı daha yüksektir. Ancak, tüm kanserlerin neredeyse yarısı ileri evrede teşhis edilmektedir.

Yumurtalık kanserinin erken teşhisi mevcut teknolojilerle henüz sağlanamamıştır. Ancak yumurtalık kanseri antijeni olan karsinom antijen 125 (CA 125)'in erken evrelerde teşhisi için çalışmalar devam etmektedir (Al-Ogaidi et al., 2013).

1.3. Kanser Biyobelirteçleri

Biyomarker; kanda, diğer vücut sıvılarında ve dokularda normal ya da anormal bir süreci belirten moleküllere verilen addır. Biyomarkerlar, 'biyobelirteç' olarak da isimlendirilirler. 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.

Kanser biyobelirteçleri; kanserin ilerlemesiyle, kanser dokusunda veya serumda artan bir seviyeye ulaşan ve kanser hücrelerinin saldığı proteinler veya moleküllerdir. Çeşitli kanser biyolojik belirteçlerinin klinik deneyleri sayesinde kanserin erken gelişimi, ilerlemesi veya olası nüksetmesi izlenebilmektedir. Ayrıca hastanın kanser tedavisine verdiği cevap değerlendirilebilmekte ve fiziksel muayeneye de yardımcı olmaktadır (Sun et al., 2015, Wang et al., 2015).

Bazı kanser çeşitlerinin klinik testlerinde kullanılan biyobelirteçler şunlardır: prostat spesifik antijen (PSA) (prostat kanseri için), karsinom antijen 125 (CA 125) (yumurtalık kanseri için), kanser antijen 15-3 (CA 15-3) (meme kanseri için) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) (kolon kanseri için).

Hastalığın erken safhalarında düşük konsantrasyonlu olarak bulunan kanser biyobelirteçlerinin tespit edilebilmesi için hassas algılama tekniklerinin geliştirilmesi, hastalığın tedavisi için son derece önem arz etmektedir (Wang et al., 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, HE_4 biyobelirtecinin de yumurtalık kanseri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

1.3.1. HE_4 Biyobelirteci

İnsan yumurtalık kanseri hücrelerinde HE_4, 13 kD protein olarak üretilir ve 25 kD salgılanan bir glikozillenmiş proteine dönüştürülür. HE_4, normal yumurtalık epiteline kıyasla epitelyal yumurtalık kanserinde aşırı eksprese edilir. Peynir altı suyu-asidik-protein dört-disülfid çekirdek alanı protein 2 olarak da adlandırılan insan epididim proteini 4 (HE_4), başlangıçta epididimde dokuya özgü ekspresyona sahip olduğu açıklanmıştır. Son on yılda yapılan klinik araştırmalar, HE_4'ün kadın üreme yolu, meme dokusu, böbrek, solunum yolu bölgeleri ve nazofarenks dahil olmak üzere sınırlı sayıda başka organda eksprese olduğunu ortaya koymuştur (Moore et al., 2014).

Moore ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; over kanserli 67 ve benign (iyi huylu) over kitleli 166 hastada, bu belirteçlerin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda; Her-2 (ERBB2) belirtecinin dışındaki tüm belirteçlerin ortalama sayısal değerleri, iki grup arasında belirgin olacak şekilde farklı bulunmuştur. HE_4, en yüksek sensitiviteye sahip tek belirteç olarak %72,9 değerinde bulunmuştur ve spesifitesi ise %95 olarak tespit edilmiştir. HE_4, özellikle Evre I hastalarında en iyi sonuç veren tek biyobelirteçtir (Moore et al., 2008).

Normal derecede serum CA 125 düzeyine sahip over kanseri olan hastaların yarısından fazlasında, HE_4 düzeyinin yükseldiği saptanmıştır. Aksine, yüksek derecede CA 125 düzeyine sahip benign over kitlesi olan hastalarda ise, HE_4 düzeyleri normal bulunmuştur. Başka bir bulguda ise, premenopozal grubundaki hastalar incelendiği zaman; HE_4 benign tümörleri, malign tümörlerden ayırabilmiştir. Tüm bu bulgular, HE_4'ün CA 125'e tamamlayıcı olan doğasını açıklar. Menopozal durum gözetilmeksizin, CA 125 ve HE_4' ün kombinasyonu artan bir sensitivite ile sonuçlanmaktadır. CA 125 ile HE_4'ün birleştirilmesiyle, sensitivite %76,4, spesifite ise %95 düzeyine yükselmiştir (https://www.centro.com.tr/wp-content/uploads/2018/12/HE4.pdf, 2020).

CA 125 birçok malignitelerde artsa da en fazla over kanseriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Günümüzde, yumurtalık kanseri olan hastalar için yapılan testlerde, CA 125 over kanserli kadınların %85'inde artmışken, evre I'dekilerin sadece %50'sinde yüksek bulunmaktadır (Türkçapar ve Özden, 2005). Bu nedenle, yumurtalık kanserinin erken teşhisinin sağlanabilmesi için HE_4 biyobelirtecinin analiz edilebilmesi amacıyla, HE_4 biyosensörlerine ihtiyaç vardır.

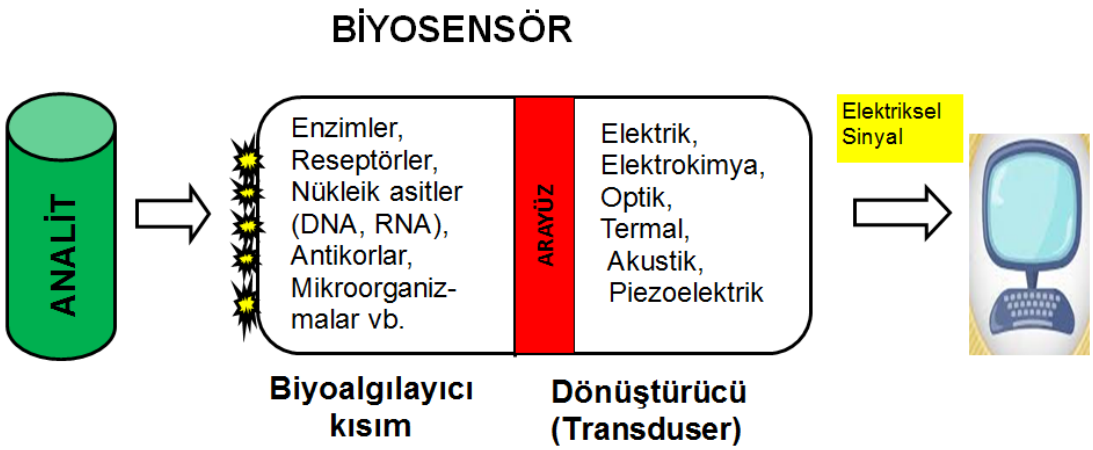
1.4. Biyosensör

Biyosensörler, tanıma sistemi olarak bir biyokimyasal mekanizmayı kullanan kimyasal sensörlerdir. Biyolojik tanıma sistemi, bilgileri (genellikle bir analit konsantrasyonu olan) biyokimyasal alandan, tanımlanmış bir duyarlılığa sahip bir kimyasal veya fiziksel çıkış sinyaline dönüştürür. Tanıma sisteminin temel amacı sensöre, analitin ölçülmesi için yüksek derecede seçicilik sağlamaktır. Sensörün dönüştürücü kısmı, sinyali tanıma sisteminin çıkış alanından çoğunlukla elektrik alanına aktarmaya yarar (Thevenot, 2001).

Biyosensörler iki kısımdan oluşan analitik cihazlardır, aynı zamanda bir kimyasal sensör alt grubudur:

Biyoreseptör (biyoalgılayıcı kısım); enzim, antikor, reseptör, nükleik asitler, mikroorganizmalar vb. hedef molekülün yakalandığı bir biyolojik bağlanma

bölgesidir. Dönüştürücü (kimyasal veya fiziksel); biyoreseptörde gerçekleşen bağlanma sonucu, biyokimyasal veya fizikokimyasal etkileşimler oluşur. Oluşan bu etkileşimlerin, ölçülebilen elektronik sinyallere çevrilmesini sağlayan (elektriksel, elektrokimyasal, piezoelektrik, akustik, optik ve termal) kısımdır (Mello, 2002, Derkuş, 2012).



Şekil 1.3. Biyosensörün çalışma prensibi.

1.4.1. Biyosensörlerin avantajları ve uygulama alanları

Biyosensörler; geleneksel analitik tekniklere göre, gerçek zamanlı ve yerinde izleme, yoğun numune hazırlığına gerek duyulmaksızın daha portatif tayin, daha hızlı ve düşük maliyetli olması gibi birçok avantaja sahiptir. Biyosensörler; basit yapılı, minyatürleştirmeye uygun, üretimi ve kullanımı kolay, düşük maliyetli, biyokimyasal seçiciliği olan, tek kullanımlık, numune hazırlama gerektirmeyen, hasta başı uygulanabilen ve sürekli izleme yapılabilen yapıdaki özellikleri nedeniyle tercih edilmektedirler (Şahin, 2013).

Biyosensörler; tarım, tıp, çevre kirliliği, gıda, savunma, eczacılık gibi birçok endüstriyel alanda, özellikle, durum tespiti, kalite kontrolü ve otomasyonda çok önemli bir rol oynarlar. Proteinler, metabolitler, peptidler ve DNA gibi biyomoleküller yanında bakteriler, virüsler gibi biyoparçacıkları ve birçok çevre kirletici veya gıda kirleticilerini çok seçici ve yüksek duyarlıkta tayin edebilmektedirler. Ayrıca biyoterörizim aktiviteleri ve pandemilerin zamanında tespiti ve önlem alınması bakımından büyük önem taşımaktadır (Şahin, 2013).

Günümüzde insan vücuduna yerleştirilebilen biyosensörler de geliştirilmiştir. Bunlar, biyolojik sıvıların vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analizi yapabilmektedirler (Telefoncu, 2012).

1.4.2. Biyosensörün İdeal Performans Özellikleri

Biyosensörlerin ideal performans özellikleri; seçici, kullanım ömürlerinin uzun, stabilite ve duyarlılıklarının yüksek, basit yapılı, ucuz, küçültülebilir ve sterilize edilebilir olmalarıdır. Ayrıca; tayin sınırları yeterli düzeyde, ölçüm aralıkları geniş ve cevap süreleri kısadır. Bunların yanısıra, tekrarlanabilirdirler, yani art arda yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak aynı sonuçları verirler. Bütün bu iyi özelliklerin yanında teoride biyosensörlerin kalibrasyona pek ihtiyaç duymamaları da beklenir, ancak pratikte bu mümkün olamamıştır. Bu yüzden kullanıldıkları sürece kalibre edilmelidirler (Hall, 1990).

1.4.3. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyoaktif bileşen-analizlenecek madde ilişkisi temel alınarak biyosensörlerin sınıflandırılması iki ana başlık altında olur: Biyokatalitik esaslı olan biyosensörler (mikroorganizmalar ve enzimler kullanılır) ve biyoafinite esaslı olan biyosensörler (antijen-antikor veya ligand-reseptör gibi etkileşimler kullanılır).

Biyoaktif tabakanın iletim ve ölçüm sistemi içeriği temel alınarak biyosensörlerin sınıflandırılması: optik temelli biyosensörler (fotometrik, fluorometrik, biyolüminesans), elektrokimyasal temelli biyosensörler (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), piezoelektrik temelli biyosensörler (kuartz kristal mikrobalans mikrokantileverlar) ve kalorimetri temelli biyosensörler (termistörler) olarak sınıflandırılır.

Biyoaktif tabakalarında kullanılan biyokomponentin çeşidine göre biyosensörlerin sınıflandırılması: Hücre temelli biyosensörler, DNA temelli biyosensörler, enzim temelli biyosensörler ve antikor/antijen temelli biyosensörler (immünobiyosensörler).

1.4.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Literatürde bildirilen biyosensörlerin yarısından fazlasının elektrokimyasal transduserlere dayandığı belirtilmiştir. Literatürde yapılan bazı araştırmalar, elektrokimyasal temelli sensör platformunun literatürde en yaygın ve çoğu durumda en sık belirtilen olduğunu ortaya koymuştur (Tothill, 2001; Bakker, 2002; D'Orazio, 2003). Elektrokimyasal transduserlerin sahip olduğu avantajlar göz önüne alındığında bu şaşırtıcı olmayabilir: düşük maliyet, yüksek hassasiyet, çözelti bulanıklığından bağımsızlık, minyatür/mikrofabrikasyon için uygunluk, düşük potansiyel ihtiyacı ve nispeten basit enstrümantasyon. Bu özellikler, elektrokimyasal transduserlerin portatif el cihazları için oldukça uygun olduğunu göstermektedir. Genel olarak, bir biyolojik tanıma olayı sırasında elektrokimyasal değişiklikleri tespit etmek için kullanılabilecek çeşitli yaklaşımlar vardır ve bunlar şöyle sınıflandırılabilir; amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik (Parkinson ve Pejcic, 2005).

Potansiyometrik Biyosensörler: Potansiyometri, bir çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında oluşan gerilim değerlerinin ölçüldüğü elektrokimyasal bir yöntemdir (Bard ve Faulkner, 2001). Potansiyometrik biyosensörlerin çalışma prensibi analit konsantrasyonuna bağlı olarak referans elektroduna karşı çalışma elektrodundaki gerilim değerinin ölçülmesine dayanmaktadır (Kuralay et al., 2005). Potansiyometrik sensörler pH ve iyon derişimindeki değişimi ölçebilir (Mello ve Kubota, 2002).

Kondüktometrik biyosensörler: Kondüktometri; iletkenlik ölçümüne dayalı olan bir analiz yöntemidir. Kondüktometrik biyosensörlerde enzimatik tepkimelerin yüklü türleri oluşturması veya tüketmesi sonucunda analiz edilmek istenen numunede oluşan değişiklik ölçülür. Kondüktometrik ölçüm yöntemi enzim katalizinde kullanılarak, bileşik derişimi ve enzim aktivitesi tayini yapılabilir, enzimatik bir tepkime izlenebilir (Anık, 2012).

Amperometrik Biyosensörler: En çok rağbet gören biyosensör çeşitlerinden bir tanesidir. Amperometri; belli bir potansiyelde meydana gelen akım değişiminin

ölçülmesi prensibine dayanır. Amperometri esaslı biyosensörler, analit ile biyobileşen arasında gerçekleşen biyoetkileşim sonucunda meydana gelen türlerin yükseltgenmesine ya da indirgenmesine bağlı olarak çalışma elektrodunda oluşan akımın ölçüldüğü biyosensör çeşitleridir (Kuralay et al., 2006). Amperometrik biyosensörler hızlı, potansiyometrik olanlara göre çok daha hassas, kesin ve doğrudur (Mello ve Kubota, 2002). Bu biyosensörler medyatörün doğasına ve tutuklanma yöntemine bağlı olarak birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılabilirler (Castillo et al., 2004).

Birinci nesil biyosensörlerin temeli, substrat ürüne dönüşürken doğal oksijen kosubtratın tüketiminin veya enzimatik tepkime sonucu hidrojen peroksit üretiminin takibine dayanır (Wang, 2008). Birinci nesil biyosensörlerin başlıca dezavantajı, elektrokimyasal tayinin yüksek potansiyel uygulanarak yapılması ve böylelikle analitin seçiciliğinde düşük duyarlığa yol açmasıdır. (Castillo et al, 2004).

Amperometrik biyosensörler ‘’medyatör’’ adı verilen aracı molekülleri ile modifiye edildiğinde ikinci nesil biyosensörler olarak sınıflandırılırlar. Medyatörler, fizyolojik olmayan, indirgenmiş enzim ve elektrot arasında elektronların karşılıklı taşınmasını sağlayan küçük redoks maddelerdir (Azevedo et al, 2005).

Medyatörsüz olarak enzim ile elektrodun doğrudan birleşmesi ile hazırlanan biyosensörlere üçüncü nesil biyosensörler denir (Mello ve Kubota, 2002). Bu sistemlerin temeli, enzimin redoks merkeziyle elektrodun yüzeyi arasındaki doğrudan etkileşime ve substradın ürüne dönüşürken direkt olarak elektron aktarımına dayanır. (Anık, 2012).

Biyosensörler için uygun redoks medyatörlerinin özellikleri şöyle olmalıdır: Elektrokimyasal olarak tersinir olmalı, indirgenmiş ve yükseltgenmiş formları kararlı olmalı, yan tepkimelere girmemeli, redoks potansiyeli enzimatik tepkimelere uyumlu olmalıdır (düşük redoks potansiyeli). Yaygın olarak kullanılan medyatörler ferrosenler, potasyum ferrosiyanür ve osmiyum kompleksleridir (Şahin, 2013).

1.4.3.2. İmmünosensörler

İmmünoaktif maddelerin, biyospesifik algılayıcı element olarak kullanıldığı biyosensör türüdür. Uygun antikor ile antijenin kompleks oluşturması esasına dayanır. Antijen-antikor reaksiyonları son derece seçicidirler. İmmünosensörler, hızlı ve aynı zamanda yüksek duyarlıklı immünolojik yanıt verebildikleri için, hastalık tanısı koyma alanında çok ilgi görmektedirler. İmmünosensör teknolojisi, ilk olarak klasik immünotest yaklaşımıyla; üretimleri ise, antijen ya da antikorların, sensörün yüzeyine immobilize edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Genel olarak, ölçüm prensibine göre sınıflandırılırlar: Optik, Elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), Termometrik, Mikrogravimetrik. İmmünosensörlerin çoğu optik ya da elektrokimyasal esaslıdır (Parkinson ve Pejcic, 2005).

1.5. Voltametri

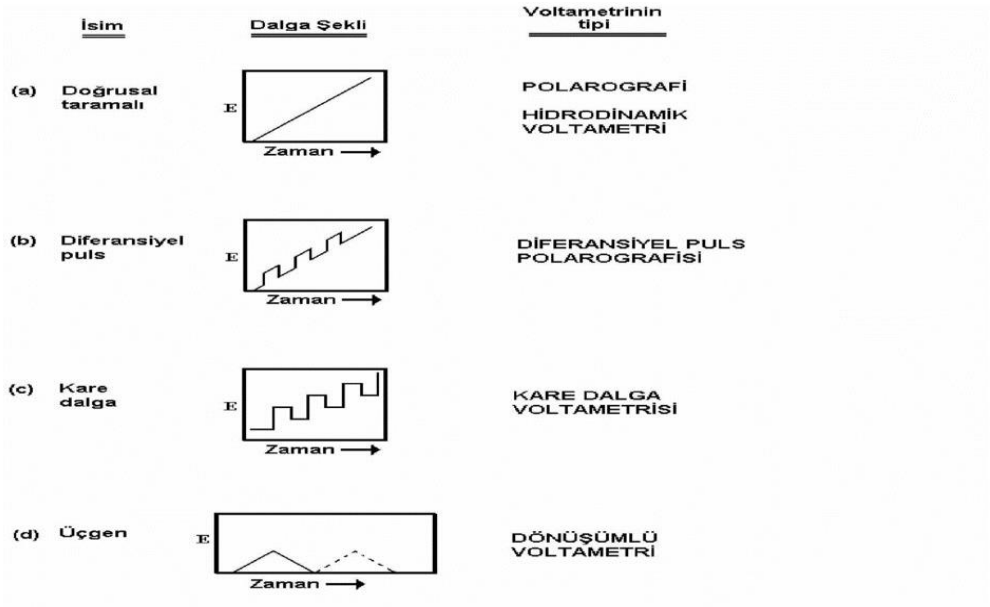
Akım; çalışma elektrodunun (ya da indikatör) polarizasyonu sırasında, uygulanmakta olan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Burdan yola çıkılarak birçok farklı elektroanalitik yöntem sayesinde analit ile ilgili bilgilere ulaşılır. Bu elektroanalitik yöntemlere voltametri denir (Skoog, 2004). Diğer bir şekilde tanımlarsak, voltametri; doygun bir çözelti içinde bulunan bir elektrodun, uygulanan potansiyele karşı verdiği akımı inceleyen elektroanalitik teknikleri kapsar (Gosser, 1994). Voltametride uygulanan potansiyelin sonucunda ölçülen akım değerleri kaydedilir ve potansiyele karşı akım grafiği çizilir. Bu grafikler ‘’voltammogram’’ olarak isimlendirilir.

Biyokimya, fiziko ve anorganik kimyacıların voltametriyi kullandığı pek çok temel çalışma vardır: Elektrot yüzeylerinde oluşan elektron aktarma olaylarının araştırılması, redoks tepkimelerininin ayrıntılı incelenmesi, elektrot yüzeyinde meydana gelen adsorbsiyon olaylarının incelenmesi gibi (Skoog, 2004). Voltametri, biyoloji, tıp, eczacılık ve çevre gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

En önemli voltametrik teknikler şunlardır: Dönüşümlü voltametri (CV), kare dalga voltametri (SWV), kronoamperometri (CA), sıyırma voltametrisi (SV), normal puls voltametri (NPV), kronokulometri (CC), diferansiyel puls voltametri (DPV).

1.5.1. Voltametride Uyarma Sinyalleri

Voltametrik tekniklerde, içinde mikroelektrot bulunan elektrokimyasal hücreye potansiyel uygulanarak uyarma sinyali gönderilir. Bu sinyal sonucunda ise, yanıt olarak bir akım meydana gelir. Genel olarak voltametride kullanılan uyarma sinyalleri şunlardır: Diferansiyel puls, üçgen, doğrusal taramalı, kare dalga (Şekil 4).



Şekil 1.4. Voltametride uyarma sinyalleri çeşitleri (Skoog et al., 1996).

1.5.1.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)

Akımın, elektroda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçümünü esas alan elektrokimyasal bir metottur. Bu metotta, referans elektrot ile çalışma elektrodu arasına bir gerilim uygulanır. Gerilim sonrası elektrotlar arasında açığa çıkan akım değeri kaydedilir. Dönüşümlü voltametri; elektron aktarımı kinetiği, redoks (indirgenme-yükseltgenme) tepkime termodinamiği, difüzyon (taşınma) ya da adsorpsiyon (tutunma) gibi olayların etkisinin hakkında bilgi elde edilmesine imkan vermesi nedeniyle en çok tercih edilen elektroanalitik yöntemdir (Wang, 2006).

Dönüşümlü voltametri, geniş bir potansiyel aralığında akımın potansiyel değişimini ve indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini gözlemlemeye olanak sağlar. Eğer; E_1 ve E_2 olmak üzere 2 potansiyel değeri arasında potansiyel tarama yapılırsa, bu metoda doğrusal taramalı voltametri (LSV); Potansiyel tarama, E_2 potansiyeline ulaşıldıktan sonra, aynı hızda ve ilk tarama yönünün tam tersi yönünde yapılırsa, bu metoda dönüşümlü voltametri (CV) denir. Ters tarama yapılırken ya E_1 potansiyeline ya da farklı bir E_3 potansiyeline dönülür. Dönüşümlü voltametride, akıma karşı potansiyel grafiği çizildiğinde voltammogramlar elde edilir (Wang, 2000). Dönüşümlü voltammogramlar bizi şu konularda aydınlatabilir: İncelenmekte olan sistemin, hangi potansiyel değerlerinde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiği, elektrot tepkimesininin ardından bir çözelti tepkimesinin oluşup oluşmadığı, elektrokimyasal olarak tersinir olup olmadığı, elektrot tepkimesine giren maddeler ya da tepkime sonucu oluşan maddelerin (ürünler) elektrodun yüzeyine tutunup tutunmadığı, meydana gelen ürünlerin kararlılığı (Yıldız ve Genç, 1997).

Dönüşümlü voltammogramlarda en önemli parametreler şunlardır; katodik pik gerilimi (Epk), anodik pik gerilimi (Epa), katodik pik akımı (Ipk) ve anodik pik akımı (Ipa). Tersinir elektrot reaksiyonlarında, Ipa ve Ipk'nın mutlak değerleri yaklaşık olarak eşittir ve zıt işaretlidir. Elektrot reaksiyonunun tersinirliğinin azalmasıyla; katodik ve anodik piklerin birbirinden farklı gerilimlerde olduğu ve daha yayvan bir şekilde gözlemlenir. Tamamen tersinmez olan elektrot reaksiyonlarında ise; ürün, çok hızlı bir biçimde tüketilir ve bundan dolayı geri yöndeki pik tamamen yok olur (Wang, 2000; Erdem, 2000).

1.5.1.2. DPV (Diferansiyel Puls Voltametrisi)

Puls voltametri metotlarında; belirli aralıklarla çalışma elektroduna potansiyel pulsu uygulanır. Bu potansiyel pulsu uygulanmadan öncesinde ve sonrasında akım değeri ölçülür (Scholz, 2010). Şekil 1.4b ve 1.4c'de; iki tür puls tipi voltametri uyarma sinyali vardır: Diferansiyel puls polarografisi ve kare dalga voltametrisi (Skoog et al., 1996). Diferansiyel puls polarografisi (veya voltametrisi), sıklıkla tercih edilen bir puls tekniğidir. Diferansiyel puls voltametrisi, elektroaktif türlerin eser miktarlarının tayin edilebilmesinde kullanılmaktadır. Bu metotta; yavaşça yükselen bir sinyale,

yükseklikleri sabit olan voltaj pulsları eklenir ve oluşan uyarıcı sinyal kullanılır. Akım, iki kere ölçülür: pulstan önce ve pulsun sonuna doğru. Bu akım değerlerinin farkı ise, sinyal olarak kaydedilir. Uygulanan pulsa karşı bu akım farkının grafiği çizilerek voltammogram elde edilir. Tersinmez redoks tepkimelerinde akım değeri daha düşüktür, bu yüzden de duyarlılığı daha zayıf olan yani daha yayvan bir grafik elde edilir. Diferansiyel puls voltametrisinin avantajı, 10^{-7}-10^{-8} M düzeyindeki derişimlerin tayinine olanak sağlamasıdır (Bond, 1980; Pletcher ve Group, 2001).

1.5.1.3. SWV (Kare Dalga Voltametrisi)

Çok hızlı ve duyarlılığı yüksek olan bir metottur. Voltammogramın tamamı bir saniyeden daha kısa bir sürede yapılabilir. Kare dalga voltametrisinin potansiyel-zaman dalga şekli simetrik kare dalgalardan oluşur (Osteryoung, 1985). Kare dalga voltametrisi (SWV), doğrudan derişimlerin değerlendirilmesi konusunda en hassas olan yöntemlerden biridir. En fazla kullanıldığı yerler; eser analizlerdir, özellikle de ağır metal bileşiklerinin analizleri (Sakhraoui ve Maouche, 2016). SWV'nin sık kullanılan bir metot olmasının sebebi, tayin sınırının 10^{-7}–10^{-8} M civarında olmasıdır. Bu teknikte, tersinir sistemlerin duyarlılığı diğer tekniklerdekinden daha yüksektir. Elektrodun yüzeyinde eser miktarda elektroaktif madde biriktirildiği zaman, yüzeye karakterizasyon işlemi yapılacağı zaman ya da yüzeydeki aktif tür nicel olarak tayin edileceği zaman bu yöntem özellikle tercih edilmektedir (Demir, 2016). Özellikle tersinmez reaksiyonların kinetiğini incelemek üzere yapılan çalışmalarda hızlı ve hassas olduğu için çoğunlukla tercih edilen yöntemdir. Bu metotta, çalışma elektroduna simetrik kare dalgalar şeklinde potansiyel uygulanır. Her bir kare dalga döngüsünde, akım iki kere ölçülür: ileri yöndeki puls sonu ve geri yöndeki puls sonu. Bu akım değerleri arasındaki fark, sisteme uygulanan potansiyelin bir fonksiyonudur ve akım-potansiyel grafiği çizildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir (Özmen, 2015).

SWV ile DPV metotları karşılaştırılacak olursa; kare dalga akımlarının, benzer diferansiyel puls cevaplarına göre, tersinir sistemde 4,0 ve tersinmez sistemde ise 3,3 kat daha yüksektir denilebilir (Borman et al., 1982).

1.5.2. Voltametride Kullanılan Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrotları; inert bir metal (altın, platin vb), yarı-iletken (pirolitik grafit, camsı karbon, karbon, indiyum oksit veya kalay oksit vb) veya civa filmiyle kaplanan bir metalden yapılabilir. Bu elektrot çeşitlerinin her biri, çalışma potansiyel aralığı olarak birbirinden farklıdır, bu potansiyel aralığın tespiti ise çok önemlidir. Çalışma potansiyel aralığı, elektrodun türüne, kullanılan destek elektrolit türüne, pH'ye ve çözücüye bağlı olarak değişim gösterir.

Karbon elektotları; geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına imkan sağlar. Düşük maliyetli oldukları için, elektrokimyasal analizlerde çokça kullanılmaktadırlar. Karbonun yüzey aktivitesi yüksektir ve bu durum organik bileşikler tarafından kolay bir şekilde kirletilebilmesine neden olur. Bu ise, karbon elektrotlar için bir dezavantajdır. Karbon yüzeyinde, hidrojen ve karboksil grupları, kinonlar bağ oluşturabilmektedir. Yine fonksiyonel gruplar sayesinde karbon yüzeye birden fazla farklı madde tutturulabilmektedir. Çeşitleri şunlardır: Yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE), karbon pastası elektrodu (CPE), camsı karbon elektrot (GCE), kalem grafit elektrot (PGE). Son yıllarda, çok yaygın bir kullanım alanı bulan karbon elektrotları, tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlardır. Günümüzde DNA teknolojisi, biyosensör teknolojisinin geleceği olarak öngürülmektedir ve karbon elektrotlar, DNA teknolojisine uygulanabilir olmasından dolayı ''geleceğin elektrotları'' olarak nitelendirilmektedirler (Erdem, 2010).

SPCE; üç elektrotlu bir konfigürasyondan yani referans elektrot (RE), çalışma elektrodu (WE) ve yardımcı elektrottan (AE) oluşan minyatür bir sistemdir. Çeşitli uygulamalar için farklı konfigürasyonlarda tasarlanmıştır. SPCE'nin avantajları, tek kullanımlık olması, basitliği, kullanım kolaylığı, elektrot parlatma gerektirmemesi, kimyasal modifikasyona uygun olması ve düşük maliyetidir (Reanpang et al., 2018).

SPCE'ler, yerinde biyomedikal tanı ve endüstriyel uygulamalar için "tek aşamalı" ticari biyosensörlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir grafit tozu matrisi ve bir organik bağlayıcıdan oluşan SPCE'ler düşük maliyetlidir, kompakt boyuttadır ve kolayca hazırlanabilir. Geleneksel elektrotlarla karşılaştırıldığında,

SPCE'ler geniş bir yüzey alanı oluşturan pürüzlü ve gözenekli yapıları nedeniyle daha yüksek iletkenlik ve düşük zemin akım sergiler. Ayrıca, SPCE'ler basit portatif cihazların seri üretim süreci ile kolayca uyarlanabilir (Wang et al., 2009).

1.6. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Dirençler, indüktörler veya kapasitörlerin birleşiminden oluşan bir devreden akım geçtiğinde oluşan toplam dirence ‘’impedans’’ denir. Çözelti-elektrot arayüzeyinde elektrokimyasal dönüşümler oluşur ve bunlar impedans spektrumuna karşılık gelen bir elektronik eşdeğer devrenin bileşenleriyle modellendirilebilir (Yuan et al., 2006). İmpedans spektroskopisi ise, elektrokimyasal metot ve sistemlerin araştırılmasında kullanılan oldukça etkili bir metottur. Elektrokimyasal impedans spektroskopisinin, diğer elektrokimyasal tekniklerden farkı; hacim araştırmaları ve aynı zamanda mikrosaniyelere kadar uzanan zaman sabitlerini içeren ara yüzey işlemleri yapılabilmesidir.

Bu tekniğin en büyük avantajlarını şöyle sıralayabiliriz: Sisteme gönderilen sinyal düşük genlikli bir potansiyeldir ve bu yüzden sistemin denge durumu bozulmaz. Böylece, elektrokimyasal sistemlerin denge durumundayken incelenmesine imkan verir. Çoğu voltametrik teknikte ise, sistemdeki denge durumu bozulmaktadır. Bunun sebebi ise, elektrokimyasal sistemlerde, cevabı ölçülmek üzere gönderilen sinyalin genliğinin yüksek olmasıdır. Ayrıca, EIS son derece hassas bir tekniktir, bu yüzden yeterince küçük pertürbasyonlar (değişimler) yapıldığı sürece, cevap yaklaşık olarak doğrusal olmaktadır. Bir diğer avantajı da, modifiye edilmiş yüzeyde bulunan moleküllerin zarar görmeden karakterize edilebilmesine imkan vermesidir. CV tekniğinde ise, geniş bir potansiyel aralık kullanıldığı için yüzey hasar görebilir (Bard ve Faulkner, 2001).

EIS’nin kullanım alanları; sensörler, piller, korozyon çalışmaları, film yüzeylerin karakterizasyonu, biyolojik sistemlerin incelenmesi, yarı iletken elektrotlardır.

1.7. Antijen/Antikor Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Analiz edilmesi amaçlanan bir örnek için uygun birer biyokomponent ve transduser seçilir. Daha sonra, biyokomponent olarak seçtiğimiz öğe, transduserin yüzeyine immobilize edilir. İmmobilizasyonda kullanılabilen temel yöntemler şunlardır: Tutuklama, kovalent bağlama, çapraz bağlama, adsorpsiyon yani kovalent olmayan bağlama.

Adsorbsiyon; immobilizasyonun en basit yöntemlerinden bir tanesidir. Adsorpsiyon, basitliği ve maliyet etkinliği nedeniyle biyosensör üretiminde yaygın olarak kullanılır. İncelenen adsorpsiyon tekniği öncelikle proteini immobilize etmek için spesifik olmayan elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlere dayanır. Kovalent olmayan etkileşimler (çoklu tuz köprüleri, hidrojen bağları, Van der Walls kuvvetleri, elektron geçiş kompleksleri) ile biyokomponentin transduser yüzeyine tutundurulması esasına dayanır. Adsorban olarak adsorbsiyonda en çok şunlar kullanılır; silikajel, selüloz, cam, kollajen, polimerik aromatik reçineler, kil, hidroksiapatit (Yeşiller, 2014).

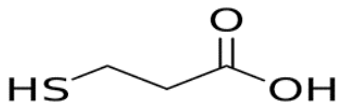
Tutuklama; biyomoleküller dediğimiz yüksek molekül kütleli maddeler, mikro kapsüllerde, doğal ya da sentetik jel matrikslerde, misellerde, yarı geçirgen membranlarda tutuklanırlar ve böylece etkili bir immobilizasyon gerçekleşir. Jel matrikste tutuklama işlemi için en çok kullanılan malzemeler şunlardır: jelatin tabakaları, akrilamit polimerleri, kalsiyum aljinat jelleri, nişasta, silikon lastiği, polivinil alkol ve polivinil klorürdür (Yeşiller, 2014).

Çapraz bağlama**;** bir ya da daha fazla fonksiyonel grup içeren küçük moleküllü kimyasal reaktiflerin kullanımıyla, adsorban ve biyokomponent arasında çözünmeyen kompleksler oluşturulması esasına dayanır. Çapraz bağlamada en fazla kullanılan ajan, gluteraldehittir. Diğer kullanılan ajanlar ise şöyledir: 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, hekzametilen diizosiyanat, bisdiazobenzidin- 2,2- disülfonikasit (Yeşiller, 2014).

Kovalent bağlama; bu tür bir bağlamanın sağlanması için, bağlanma yüzeyi ve/veya biyomolekülde hidroksil (-OH), amin (- NH_2), karboksil (-COOH), karbonil (-C=O),

tiyol (-SH) gibi reaktif gruplar bulunmalıdır. Böyle reaktif gruplar olmadığı zamanlarda, türlü etkileşimlerle (SAM, kendiliğinden oluşan tek tabakalar) reaktif gruplar oluşturulabilmektedir. Biyomolekül, ya aktive edilen bir transduserin yüzeyine bağlanır ya da uygun bir materyal ile kovalent olarak bağlanır ve immobilize olmuş biyokomponent içeren bir tabakayla transduserin yüzeyinde film oluşturur. Kovalent bağlama ile biyokomponentlerin immobilize edilmesi; iyon şiddeti, sıcaklık, pH gibi değişkenlere karşı direnç gösterir ve aynı zamanda biyosensörün ömrünü uzatır. Fakat bir yandan da, biyoaktif tabakada, belli bir miktarda aktivite kaybı yaşanmasına neden olabilir (Yeşiller, 2014).

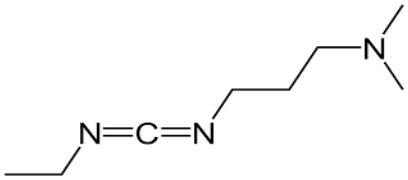
Biyomoleküller ve elektrot arasındaki elektron transferini desteklemek için düzlemsel altın elektrot üzerine modifiye edilir. Altın nano parçacık dizileri üzerine modifiye edilmiş 3-Merkaptopropiyonik asit (MPA) tekli katmanları ve düzlemsel altın elektrodu katalitik aktivite gösterir (Zhang et al., 2007).

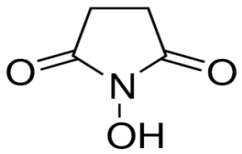


Şekil 1.5. 3-MPA (3-Merkaptopropiyonik asit)'nın kimyasal formülü (https://tr.qwe.wiki/wiki/3-Mercaptopropionic_acid, 2020).

MPA, sahip olduğu –SH grubu sayesinde altın ile kuvvetli Au-S bağı yaparak diğer uçlardaki fonsiyonel gruplara çeşitli uygulamalar için imkan sağlamaktadır (Kesik vd, 2013). Şekil 1.5'de MPA'nın kimyasal formülü verilmiştir.

N-hidroksisüksinimid/1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid (EDC/NHS) çözeltisi karışımı, biyomoleküllerin taşıyıcı sistemlerine immobilizasyonu için kullanılan bir reaktiftir. EDC molekülünün her iki ucunda bulunan amin grupları sayesinde NHS ilavesi ile karboksil grubu içeren bir polimer ile bir biyomolekülü birbirine bağlayabilmektedir (Derkuş, 2012). EDC ve NHS'nin kimyasal formülleri Şekil 6'daki gibidir.





Şekil 1.6. EDC ve NHS a.1-etil-3-(3-dimetilamino-propilin kimyasal formülü. b. N-hidroksisüksinimidin kimyasal formülü.
a.https://en.wikipedia.org/wiki/1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, 2020),
b.https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/130672?lang=en&region=TR, 2020).

Kovalent bağlanma reaksiyonları türleri arasında, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid/N-hidroksisülfosüksinimid (EDC/NHS) aracılı reaksiyon en çekici yaklaşımlardan biridir. EDC/NHS; yüksek dönüşüm verimliliği, hafif reaksiyon durumu ve biyoaktivite üzerinde az etkisi olan mükemmel biyouyumluluk nedeniyle biyomoleküllerin farklı substratlara konjugasyonunda yaygın olarak uygulanmaktadır (Ning et al., 2013).

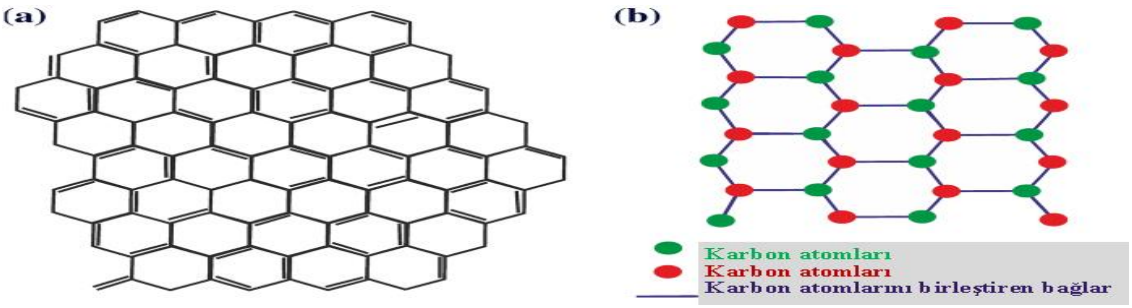
Biyolojik aktivitelerini koruyan biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun bir mikro ortam sağlamak ve immobilize edilmiş proteinler ile elektrot yüzeyleri arasında elektron transferini kolaylaştırmak için altın nanopartiküllerinin (AuNP) benzersiz özellikleri, bu nanomateryalin, gelişmiş analitik ile elektrokimyasal biyosensörlerin inşası için yoğun bir şekilde kullanılmasına yol açmıştır. AuNP'ler kullanılarak tasarlanan biyosensing cihazlarının avantajlı operasyonel özellikleri, nano-yapılandırılmamış biyosensörlere göre vurgulanır ve bazı açıklayıcı örnekler yorumlanır. Elektrokimyasal immünosensörlerde; AuNP'lerin afinite reaksiyonunun elektrot transdüksiyonunun arttırılmasında ve ayrıca kararlı bir modda imüno-reaktiflerin immobilizasyonunun verimliliğinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir.

AuNP'lerin biyoaktivitelerini koruyan biyomoleküllerin stabil bir immobilizasyonunu sağlama yeteneği, biyosensörlerin hazırlanması için büyük bir avantajdır. Ayrıca AuNP'ler, redoks proteinleri ve dökme elektrot malzemeleri arasında doğrudan elektron transferine izin verir, böylece elektrokimyasal algılamanın elektron transfer aracılarına gerek kalmadan gerçekleştirilmesine izin

verir. Yüksek yüzey/hacim oranı, yüksek yüzey enerjisi, protein-metal partikül mesafesini azaltma yeteneği ve protez grupları ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron ileten yollar olarak işlev görürler. AuNP'lerin bu özellikleri, redoks proteinleri ve elektrot yüzeyleri arasında elektron transferini kolaylaştıran nedenlerdir. AuNP'ler ayrıca birçok önemli biyokimyasal reaksiyonda yer alan hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijen (O_2) veya indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) gibi moleküllerin redoks işlemlerinin elektrokatalizinde yararlı arayüzler oluşturduğunu göstermiştir (Pingarron, 2008).

1.8. Grafen, Grafen Oksit, İndirgenmiş Grafen Oksit

Geleceğin "mucize materyali" olarak adlandırılan grafen, bal peteğine benzer hegzagonal örgüye sahip bir atom kalınlığında karbon atomlarından oluşan çok ince, çok dayanıklı ve çok sert bir materyaldir. Grafeni bu kadar özel yapan ve araştırmalarda çok ilgi görmesini sağlayan, sahip olduğu eşsiz özellikleridir. Karbon nanotüplerin ve fullerenlerin aksine altı halkalı karbon atomları düzlemsel bir yapıda bağlanmışlardır. Ayrıca grafen 2630 m^2/g gibi son derece yüksek bir yüzey alanına sahiptir (Stankovıch, 2006). Grafenin yapısı Şekil 7'de gösterilmiştir.

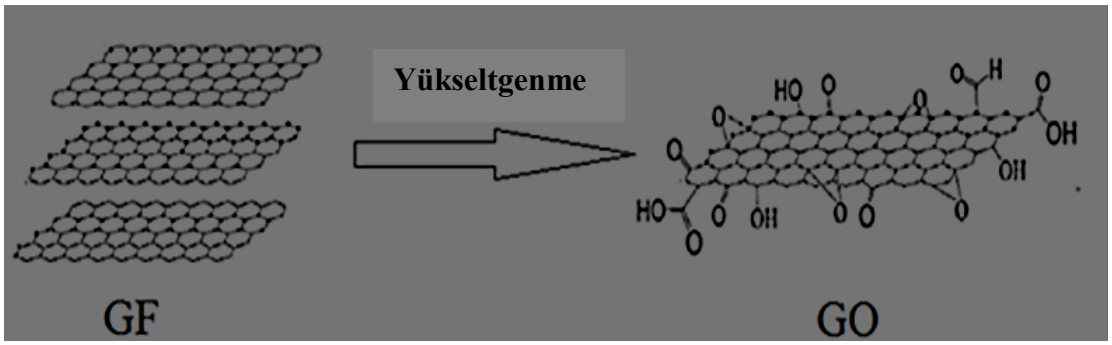


Şekil 1.7. Grafenin Yapısı (**a.**Kimyasal yapı, **b.**Grafen bileşiğinin kristal yapısı) (Priyadarsini et al., 2018).

Grafen, elektrokimyasal açıdan şu özelliklere sahiptir; grafen levhanın kenar yüzeyi, 0,01 cm/s elektron transfer hız sabitine (ke) sahip olmasına rağmen, ana yüzey elektrokimyasal olarak inerttir. Kimyasal kararlılığı ve özellikle elektrokataliz çalışmaları için metalik ve metal oksidi parçacıklarını tutma kabiliyeti özellikleriyle elektrokimya çalışmaları için bulunmaz fırsatlar sunmaktadır. Grafen sahip olduğu hızlı elektron taşınımı, biyouyumluluk gibi eşsiz özellikleri sayesinde elektrokimyasal, impedimetrik, floresans biyosensörler ve immunosensörler gibi tüm

biyosensörlerde uygulanabilirliğini sağlamaktadır. Grafenin elektrokimyasal davranışı ile grafen temelli elektrokimyasal sensör çalışmalarının son birkaç yılda bir hayli artması, grafenin elektrokimyasal analizlerde önemli bir elektrot malzemesi olacağını göstermektedir (Özcan, 2015).

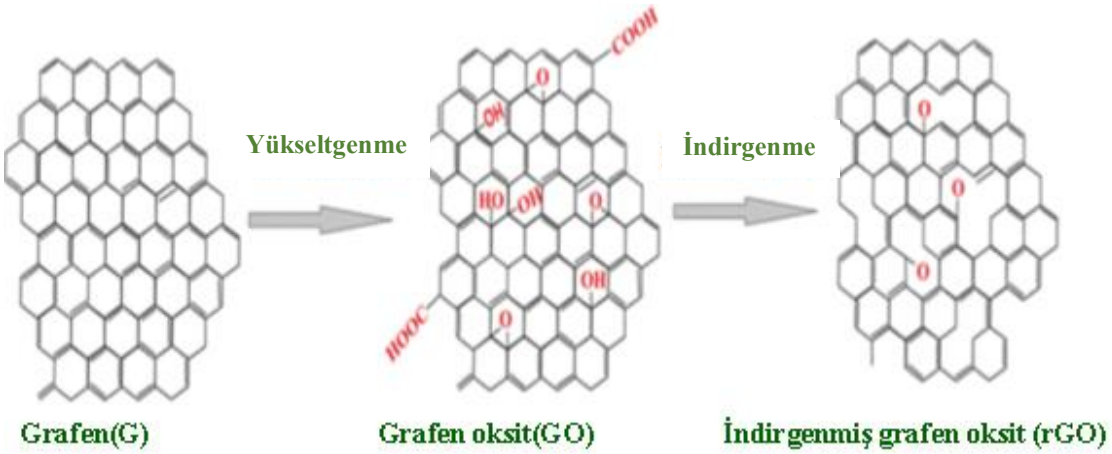
Grafen oksit; grafit tabakalarının oksitlenerek birbirinden ayrılmış tek katmanlı halidir. Grafen oksit C:O oranı 3 den düşük ve tipik olarak 2 ye yakın olacak şekilde fonksiyonel gruplar içerir (Bianco et al.. 2013). Grafenin yüksek miktarlarda üretimi için ön plana çıkan yöntemlerden biri grafitten kimyasal prosesler ile üretilen grafen oksitin çeşitli metodlar kullanılarak indirgenmesidir (Eda vd. 2008). Bu yöntemin iki temel avantajı ön plana çıkmaktadır, bunlar ucuz grafit hammadesi kullanılarak verimli üretimin sağlanması ve üretilen grafitin hidrofilik olması nedeniyle stabil çözeltiler hazırlanabilmesi olarak özetlenebilir (Pei et al., 2012). Grafen ve grafen oksite ait temsili görüntüler Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 1.8. Grafenin Oksitlenmesi (GF:Grafen, GO:Grafen oksit) (Mindivan, 2018).

İndirgenmiş grafen oksit; grafen oksitin indirgenmesi, oksijen içeren fonksiyonel grupların dekompozisyonuyla, grafen oksitin yalnızca karbon içeren formuna dönüştürülmesidir. Grafen ve grafen oksit gerçek mono tabakalardır. Bu temel benzerliklere rağmen, birbirlerinden çok farklıdır. Grafen, yalnızca sp^2-hibritlenmiş karbon atomları içerirken; grafen oksit, bir dizi oksijen fonksiyonel grubu içeren ve önemli miktarda sp^3 hibritlenmesi yapan karbon atomları içerir. Ayrıca; grafen ile grafen oksit, kullanımlarıyla oluşturulacak malzemelerin özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Örnek verilecek olursa, grafen 200.000 cm^{2}'den fazla olan taşıyıcı hareket yetenekleriyle olağanüstü derecede yüksek iletkenlik sergilerken, GO bir yalıtkandır (Dreyer et al., 2014). İndirgenmiş grafen oksitin çalışmamızda kullanımı,

yüksek iletkenliğinden ve grafenin diğer tüm özelliklerinden yararlanma amacı taşımıştır. RGO, elektrot yüzeyine adsorbsiyon ile bağlanmıştır. Grafenin indirgenmiş grafen oksite dönüşümü kimyasal formülasyonları ile Şekil 9'da verilmiştir.



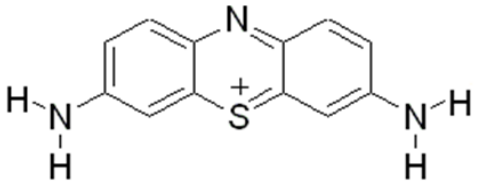
Şekil 1.9. Grafenin GO ve rGO'ya dönüştürülmesi (Priyadarsini et al., 2018).

1.9. Politiyonin (PTH)

Boya içeren bir çözeltinin sabit veya dönüşümlü potansiyel oksidasyonu ile elektropolimerizasyon, boya modifiye elektrotların oluşumu için kullanılan olağan yöntemlerden biridir. Çeşitli fenazin, fenoksazin ve fenotiazin türevleri enzim reaksiyonlarında elektron donörleri/alıcıları olarak çalışabilir. Aynı zamanda, kararlı redoks-aktif katmanlar üretmek için elektrot yüzeyleri üzerinde elektropolimerize edilebilirler. Tiyoninin elektropolimerizasyonu, tiyonin katyon radikalini oluşturmak için kullanılır (Yang, 1999).

Elektrokimyasal etiket içermeyen immünosensörlerin tasarımında ve imalatında sinyal üretimi ve amplifikasyonu çok önemli bir adımdır. Bu amaçla prusya mavisi, toluidin mavisi gibi elektrokimyasal redoks mediatörleri içeren nanomalzemeler benimsenmiş ve bunlar, etiketsiz elektrokimyasal biyosensörler için elektroaktif arayüzler üretmek için kullanılmıştır. Son zamanlarda, uygun durumlarda –NH- köprüleri ile birbirine bağlanan tiyoninin (TH) aromatik halkalarından politiyonin (PTH) hazırlanması oldukça ilgi çekmektedir. Bir tür elektrot malzemesi olarak PTH,

biyoanalitik uygulamalar için büyük bir potansiyele sahip hızlı yük transfer kapasitesi sergiler (Chen, 2015). Tiyoninin kimyasal formülü Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 1.10. Tiyoninin kimyasal formülü (https://en.wikipedia.org/wiki/Thionine, 2020).

1.10. Hasta Başı Testi (Point of Care Testing)

Hasta, yatak başı veya ekstra laboratuvar testi olarak da adlandırılan bakım noktası testi yeni değildir. Son yıllarda, gelişmiş laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duymadan çok çeşitli testlerin hızlı ve basit bir şekilde yapılmasını sağlayan analitik sistemler geliştirilmiştir. Hasta başı testlerinin temel amacı, uygun tedavinin uygulanabilmesi için hızlı bir sonuç üretmektir, bu da klinik veya ekonomik sonuçların iyileşmesini sağlar.Hasta başı testleri; erken teşhis, daha hızlı karar verme, tedaviye daha erken başlama, tedavinin daha hızlı optimizasyonu, daha az klinik ziyareti, hastanede kalış süresinde azalma, hastaneden erken taburcu olma, daha az gereksiz hastaneye yatış, daha iyi optimize edilmiş ilaç tedavisi, daha az uygunsuz ilaç kullanımı, kan vermede azalma, personel ve ekipman kullanımında azalma, yaşam kalitesinde artış, hasta memnuniyeti gibi önemli avantajlar sağlar (Price, 2001).

Hastalık patogenezi, bir Point of Care (POC) testinin ne kadar önemli olduğunu gösterir. Şüphe duyulan sıtma durumunda (özellikle bebeklerde), test sonuçlarında 24 saatlik bir gecikme bir ölüme neden olabilir. Bunun önlenmesi için bir POC testi gereklidir. HIV tanısı için (hamile kadınların HIV testi hariç), hızlı bir test sonucu daha az acildir, bu nedenle merkezi tesis testi klinik olarak uygun bir seçenektir (Yager, 2008).

Hasta başı testler, özel veya kalıcı bir alan gerektirmeden, hastanın bulunduğu yerde hekim, hemşire, tıbbi laboratuvar teknikeri ya da tıbbi laboratuvar teknisyeni

tarafından gerçekleştirilir. Bu testler, elde taşınabilir veya hasta başına geçici olarak getirilebilir özelliğe sahip olan kit, aygıt ya da cihazlarda yapılır. POC uygulamaları; sağlık merkezlerinde, kliniklerde, acil servislerde ve özellikle de ameliyathanelerde zaman kazandıracak bir işleve sahiptir. Ayrıca POC aygıt ve kitleri küçük ve taşınabilir oldukları için, gerektiği takdirde evde, iş yerinde, seyahatte bile hastanın yanında rahatlıkla bulundurulabilir. Böylece herhangi bir şekilde acil bir durum geliştiğinde (örneğin kan şekerinin veya tansiyonun yükselmesi/düşmesi gibi), bu aygıt ve kitler sayesinde hasta hakkındaki bilgiye en kısa sürede ulaşılabilir. Bu da hastaya müdahale edilmesi konusunda epey zaman kazandırır.

Umulur ki; insanlar, günümüzde devam etmekte olan bilimsel araştırmalar sayesinde geliştirilecek POC uygulama kitlerini kullanarak hasta değillerken bile, belirli aralıklarla hastalık risklerini de kontrol edebileceklerdir. Özellikle kanser gibi hastalıkların tedavi edilebilir bir aşamada tespit edilebileceği, uygulanacak tedavi ile ölüm riskinin ortadan kalkabileceği ve hastanın iyileşebileceği öngörülmektedir. Bu açıdan POC uygulamalarnın gelişimi son derece önemlidir.

2. KAYNAK TARAMALARI

2011 yılında, İtalya'da Giuseppina Ruggeri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HE_4 ile epitelyal yumurtalık kanseri ilişkisinin anlaşılabilmesi için, iki immünoanaliz ve bir kombinasyon algoritması karşılaştırılmış ve klinik olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, HE_4 için iki ticari immünoanalizin karşılaştırılması ve HE_4, CA 125 ve epitelyal over kanseri (EOC) için kombine Yumurtalık malignite riski algoritmasının (ROMA, Risk for Ovarian Malignancy Algorithm) tanısal doğruluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HE_4 ve CA 125, 259 kadından (73 sağlıklı, 90 iyi huylu yumurtalık veya adneksiyal hastalığı olan, 96 EOC'li) elde edilen serum üzerinde ölçülmüştür. ARCHITECT kemilüminesans mikropartikül immunoanaliz (CMIA, Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) HE_4 testi Fujirebio EIA HE_4 ile karşılaştırılmış ve kombine ROMA algoritması (HE_4+CA 125) ile EOC riski her iki HE_4 testi ile değerlendirilmiştir. CMIA HE_4 testi iyi bir doğrusallık (rN0,9998) ve hassasiyet (interassay ve toplam CV % b4) göstermiştir. Çalışmada, EIA ile HE_4 ortalama %0,4 sapma ile yüksek doğrusallık göstermiştir (r=0,994). Alıcı çalışma karakteristikleri eğrisi (ROC eğrisi, receiver-operating characteristics curve) analizi ile, %90, %95 ve %99'luk sabit bir özgüllükteki EOC'ye duyarlılık, CMIA HE_4 ile %89,6, %84,4 ve %79,2, EIA HE_4 ile %84,4, %83,3 ve %79,2, CMIA CA 125'e göre %76,0 ve %59,4. CMIA veya EIA HE_4 ile belirlenen ROMA algoritmasının doğruluğu menopozda çok benzer (AUC:eğrinin altındaki alanları %87,1'e karşı %87,6; p=n.s.) ve daha yüksek olduğu görülmüştür. İki HE_4 testi CMIA için daha yüksek bir hassasiyetle iyi bir korelasyon ve benzer klinik değer göstermiştir. HE_4, benign malign over lezyonlarından ayırt edilmesinde klinik ve görüntüleme kriterlerine ek olarak kullanımını destekleyen CA 125'ten daha spesifik ve doğru olduğu görülmüştür. ROMA algoritması, EOC riski yüksek olan kadınları ayırt etmek için iyi bir doğruluk göstermiştir (Ruggeri et al., 2011).

2012'de, Çin'de Jialing Yuan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada lokalize yüzey plazmon rezonansına (LSPR, localized surface plasmon resonance) dayanan etiketsiz bir biyosensör kullanılarak yumurtalık kanseri olan hastalarda serum insan epididim salgılama proteini 4'ün saptanması amaçlanmıştır. Bunun için, gümüş nanopartiküller, bir nanosfer litografi yöntemi kullanılarak üretilmiştir. HE_4'ü

belirgin şekilde tanıyabilen bir prob olarak anti-HE_4 antikoru, bir amin birleştirme yöntemi kullanılarak nanoçip yüzeyine monte edilmiştir. Saptama, HE_4-anti-HE_4 antikor reaksiyonundan önce ve sonra LSPR spektrumunun maksimum sönme maksimumundaki kaymaya dayanmaktaydı. Bu nanobiyosensörler, insan serum örneklerindeki HE_4'ü saptamak ve bunları enzime bağlı bir immünosorbent analizi kullanarak karşılaştırmak için uygulanmıştır. HE_4'ün saptanmasına ilişkin testler, LSPR tabanlı biyosensörün hızlı bir algılama hızı, iyi özgüllük, etkili tekrarlanabilirlik ve uzun süreli stabilite gösterdiğini göstermiştir. LSPR için lineer aralık, 4 pM'lik bir tespit limiti ile 10 pM ve 10.000 pM arasında olmuştur. İnsan serumunda LSPR ile enzime bağlı immünosorban test sonuçları arasında mükemmel bir korelasyon gözlenmiştir. Bu çalışma, yumurtalık kanserinde LSPR biyosensörünün ilk klinik tanı uygulamasıdır. Hızlı, düşük maliyetli, etiketsiz ve taşınabilir bir tarama aracı olan LSPR biyosensörü, yumurtalık kanserinin klinik serolojik tanısı için çok etkili bir alternatif olabilir (Yuan et al., 2012).

2015 yılında, Çek Cumhuriyeti'nde Michaela Čadková ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hassas HE_4 tümör markörü tespiti için alkali fosfataz etiketli antikor temelli elektrokimyasal biyosensör üretimi amaçlanmıştır. Yumurtalık karsinomu için bir tümör markeri olan HE_4'ün serum seviyesinin kantitatif belirlenmesi, hastalığın erken evrelerinde diğer biyobelirteçlerin algılanması sınırlı olduğunda esas olarak tespit edilme olasılığı nedeniyle öne çıkmıştır. Anti-HE_4 IgG'nin bir etiketi olarak kullanılan alkalin fosfataz ile substratın enzimatik dönüşümünden sonra oluşan elektroaktif ürünün hassas elektrokimyasal tespiti ile birlikte, immünomagnetik yakalanması eşlik etmesini içeren hızlı HE_4 tespiti için basit bir ELISA tabanlı yaklaşım sunulmuştur. Önerilen immünosensör, zaman içinde stabilite ve 6,8 fM HE_4'te mükemmel tespit limiti nedeniyle ve 23 fM miktar tayini limiti, bu biyomarkerin erken tespiti için gereksinimleri karşılamaktadır. Yumurtalık kanseri biyomarkeri HE_4'ü saptamak için 6,8 fM HE_4 saptama sınırına ulaşan manyetik boncuk temelli bir immünosensör geliştirilmiştir. Bu, yaygın olarak kullanılan enzim immünoanaliz ve kemilüminesan mikropartikül immünoanaliz yöntemleri ile belirlenen seviyelerden düşüktür. İmmünosensör yapımında önemli bir adım olarak, antikorun HE_4'ü yakalama kabiliyetini kısıtlamadan spesifik antikor immobilizasyonu optimize edilmiştir (Čadková et al., 2015).

2018 yılında, Çin'de Fawen Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yumurtalık tümörleri olan 458 hastada dört serum tümör markerinin klinik analizi yapılmış ve yumurtalık tümörlerinde HE_4, CA 125, CA19-9 ve CEA'nın kombine kullanımının tanısal değeri araştırılmıştır. Bu çalışmada, yumurtalık tümörleri için HE_4, CA 125, kanser antijeni 19-9 (CA19-9) ve CEA'nın tanısal değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Katılımcılar, 386 sağlıklı kadın (kontrol grubu), 262 benign over tümörü olan (benign grup) hasta ve 196 malign pelvik tümörü (malign grup) olan üç gruba ayrılmıştır. HE_4, CA 125, CA19-9 ve CEA serum seviyeleri, elektrokemilüminesan immünoanaliz ile analiz edilmiştir. Malign over tümörleri olan hastaların HE_4, CA 125, CA19-9 ve CEA serum düzeylerinin, kontrol grubu ve benign gruptan anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0,01$). HE_4'ün malign over tümörlerinde yüksek bir özgüllüğe (%96,56) sahip olduğu görülmüştür. HE_4, CA 125, CA19-9 ve CEA tümör belirteçlerinin duyarlılığı sırasıyla %63,78, %62,75, %35,71 ve %38,78 olarak saptanmıştır. İki veya daha fazla tümör markerinin birleşik kullanımının (paralel test), tek bir tümör marköründen daha yüksek tanı duyarlılığına sahip olduğu ancak daha düşük özgüllük gösterdiği tespit edilmiştir. HE_4 ve CA 125'in kombine verimliliği sırasıyla %80,10 ve %69,08 duyarlılık ve özgüllük ile en yüksek seviyede tespit edilmiştir. HE_4 ve CA 125, Yumurtalık Malignite Algoritması Riski ile birleştiğinde yumurtalık malignitelerinin etkili bir şekilde taranması ve teşhisi sağlanmıştır. Üç veya dört tümör markeri kullanıldığında tanısal duyarlılık %88,52'ye yükselmiş, ancak anlamlı bir değer göstermemiştir. Bu çalışma baz alınarak; üç veya dört tümör markerinin kombinasyonunun, CA 125 ve HE_4'ün kombinasyonuyla karşılaştırıldığında tanısal etkinliği geliştirmediği söylenebilir (Chen et al., 2018).

2018 yılında, Kore'de Boyeon Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, CA 125, HE_4 tanısal performansı ve yumurtalık kanseri için Yumurtalık malignite riski algoritması araştırılmıştır. Bu çalışmada, Korelilerde yumurtalık kanseri için CA 125, HE_4 ve ROMA'nın tanısal performansı değerlendirilmiş ve optimal kesimler ayarlanmıştır. Benign jinekolojik hastalığı olan 762 hastada ve over kanseri olan 70 hastada serum HE_4 ve CA 125 ve ROMA skoru belirlenmiştir. Alıcının çalışma karakteristik eğrileri, eğrinin altındaki alanları (AUC) hesaplamak için oluşturulmuştur. Maksimum Youden indeksi gösteren CA 125, HE_4 ve ROMA

belirlenmiş, sırasıyla, optimum kesimler olarak, hassasiyet ve özgüllük, bu kesikler uygulanarak değerlendirilmiştir. İyi huylu hastalıklarda, CA 125 rahim miyomu, adenomyozis, endometriyal patoloji veya endometriozisli hastalarda anlamlı olarak artmıştır, ancak HE_4 sadece adenomyozlu hastalarda artmıştır. Yumurtalık kanseri tanısı için premenopozal grupta CA 125, HE_4 ve yaş kombinasyonu en yüksek 0,89 AUC değerini göstermiş ve ROMA postmenopozal hastalarda 0,935 AUC ile en iyi tanı performansını göstermiştir. CA 125 ve HE_4 için optimal kesme değerleri uygulandığında, menopoz öncesi kadınlarda CA 125, HE_4 ve ROMA'nın duyarlılıkları 0,714'te aynıydı, özgüllükler sırasıyla 0,841, 0,974 ve 0,972 bulunmuştur. Postmenopozal grupta, bu belirteçlerin duyarlılıkları 0,857, 0,804 ve 0,929 ve özgüllükler sırasıyla 0,836, 0,887 ve 0,800 bulunmuştur. Bu çalışma baz alınarak; tüm belirteçler iyi tanısal performans gösterse de, patolojik benign hastalık tiplerine ve yumurtalık kanserine bağlı olarak değiştiği söylenebilir. Ayrıca yumurtalık kanserinin doğru teşhisi için CA 125, HE_4 ve ROMA'nın tamamlayıcı olarak kullanılması öngörülebilir (Kim et al., 2018).

2019 yılında, Çin'de Jinyong Hua ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yumurtalık kanseri için biyobelirteçlerin tanısal performansı araştırılmıştır. CA 125'in ilk olarak 1980'lerin başlarında değerlendirildiği, ancak yumurtalık kanserinin erken evrelerinde düşük hassasiyete sahip olduğu tespit edilmiştir. Yanaranop ve ark. tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada HE_4'ün özgüllüğü %86 olarak ve HE_4'ün AUC'si (area under the curve values: eğri altındaki alan değeri) 0,893 değerinde yani CA 125inkinden (0,865) daha yüksek olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Hua et al., 2019).

2019 yılında, İran'da Zinatossadat Bouzari ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Yumurtalık Kanserinde Tanı Testleri olarak CA 125, HE_4, Malignite indeksi (RMI) ve ROMA değerleri incelenmiştir. Bu çalışmada, yumurtalık kitlesinde RMI, HE_4, CA 125 ve ROMA riskini içeren tümör belirteçlerinin tanısal değerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Yumurtalık kitleleri olan 100 hasta, tümör markörleri ROMA, HE_4, RMI ve CA 125 açısından değerlendirilmiştir. Her bir parametrenin duyarlılığı ve özgüllüğü, her yöntem için AUC'ye göre alıcı çalışma karakteristik eğrileri (receiver operating characteristic: ROC) kullanılarak

hesaplanmıştır. Ortalama değerlendirmede ortanca CA 125, HE_4, RMI ve ROMA serum düzeyleri malign ve benign kitleler arasında anlamlı bir fark göstermiştir. AUC'ler, tüm hastalarda iyi huyluya karşı malign kitleler için 0,83 (CA 125), 0,88 (HE_4), 0,85 (RMI) ve 0,92 (ROMA) olarak saptanmıştır. ROC eğrileri, ikili bir karşılaştırma yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış ve 4 yöntem arasında fark bulunmamıştır. Bu çalışma baz alınarak; CA 125, HE_4, RMI ve ROMA'nın AUC belirteçlerine dayanan sonuçların, ROMA'nın doğruluk eğiliminin tüm hastalarda ve menopoz öncesi ve sonrası her bir grupta CA 125, HE_4 ve RMI'dan daha yüksek olduğu söylenebilir (Bouzari et al., 2019).

2019 yılında, Mısır'da Alshymaa A. Ahmed ve Ahmed M. Abdou, Over karsinomu hastalarında CA 125 ve HE_4'ün tanısal doğruluğu ve karıştırıcıların serum düzeyleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu prospektif çalışma Zagazig Üniversitesi Hastanesinde yapılmıştır. Bu çalışmada, malign over over kitlelerinin öngörülmesinde serum CA 125 ve HE_4'ün tanısal doğruluğunu değerlendirmek ve daha sonra kişisel kriterlerin ve tıbbi hastalıkların bu doğruluk üzerindeki etkisini analiz etmek amaçlanmıştır. Katılım için uygunluk kriterleri şöyle belirlenmiştir; semptomlar, bulgular ve görüntüleme tekniklerine dayalı olarak yumurtalık kitlesi tanısı konmuş, ≥18 yaşından itibaren ardışık kadınlar. Tüm hastalardan kişisel ve tıbbi öykü alınarak preoperatif serum CA 125 ve HE_4 (sırasıyla kesim 35 IU/mL ve 150 pmol/L), ardından lezyonların postoperatif histopatolojik incelemesi referans standart olarak yapılmıştır. Çalışmaya alınan 140 hastanın 62'sinin over malignitesi olduğu, 78'inin benign lezyonları olduğu doğrulanmıştır. Serum CA 125≥35 IU/mL %91,9 duyarlılıkta over malignitesi, %53,8 özgüllük ve %70,7 doğrulukta olmuştur. Eşik değerinin 67,5 IU/mL'ye yükseltilmesi hassasiyeti %83,9 azaltmış, özgüllüğü %80,7 arttırmış ve %82,1 doğruluk göstermiştir. HE_4 ve CA 125 kombinasyonu %75,8 duyarlılık, %93,5 özgüllük ve %85,7 doğruluk göstermiştir. Hem diabetes mellitus hem de hipertansiyondan muzdarip olan kadınlar CA 125 konsantrasyonunda hassasiyetleri %54,5 olmuştur. Bu çalışma baz alınarak; CA 125'in kanser over öngörüsündeki performansının, eşik değeri arttırılarak veya CA 125'in HE_4 ile birleştirilmesiyle iyileştirilebileceği öngürülmüştür. Diyabetes mellitus ve hipertansiyonun CA 125'in performansını etkilediği, HE_4'ün ise bu faktörlerden

bağımsız olduğu görülmüştür. Bu sebeple, kanser over tahmin protokollerinde HE_4'ün girişinin ilave bir değeri olabileceği söylenebilir (Ahmed and Abdou, 2019).

Yumurtalık kanserinin erken evrede tespit edilmesinin henüz sağlanamadığı, belirgin olmayan semptomları nedeniyle erken evrede tespitinin mümkün olmadığı bilinmektedir. Bu sebeple tümör biyobelirteçlerinin kandaki seviyelerinin izlenmesinin yumurtalık kanserini erken tespit etmede daha etkili bir yöntem olduğu, bunun için de yıllardır süregelen CA 125 analizlerinin tam olarak yeterli olmadığı görülmüştür. Yapılan kaynak araştırmaları incelemesi sonucunda edinilen bilgiler ışığında; CA 125 analizlerine alternatif bir yöntem gerektiği, bu alternatif yönteme ise HE_4 biyobelirtecinin katkısı ile ulaşılabileceği tespit edilmiştir. Bu tezde, yumurtalık kanserinin erken safhada tespiti için; hasta başı teste olanak sağlayacak şekilde, RGO, PTH, AuNP, MPA, EDC/NHS, anti-HE_4 ve BSA ile modifiye edilmiş, düşük maliyetli ve tek kullanımlık bir elektrokimyasal HE_4 immünosensörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece, geliştirilmiş olan HE_4 immünösensörünün, yumurtalık kanserinin erken safhada tespit edilebilmesine imkan vereceği öngörülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Anti-HE_4 antikoru ve HE_4 antijeni Novus Biologicals USA firmasından satın alınmıştır. EDC (etil,3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid), NHS (N-Hidroksisüksinimid), $K_3Fe(CN)_6$ (potasyum hekzosiyanoferrat), $K_4Fe(CN)_6$ (potasyum hekzosiyanoferrit), RGO (indirgenmiş grafen oksit), tiyonin asetat tuzu, altın tuzu ($HAuCl_4.3H_2O$), BSA (Sığır serum albumin), H6914 kodlu yapay insan serumu Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Etanol (EtOH) Carlo Erba firmasından; KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat), K_2HPO_4 (dipotasyum hidrojen fosfat), KCl (potasyum klorür), DMF (dimetil formamid), HCl hidroklorik asit (%37'lik), NaOH (sodyum hidroksit), 3-MPA (3-merkaptopropiyonik asit) Merck firmasından tedarik edilmiştir. 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.

3.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi

Deneylerde elektrokimyasal ölçümler şu cihazlarla yapılmıştır;

Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat: Voltametri, kronoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal metotların çalışılabildiği bir cihazdır. Bilgisayar kontrollü olan Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazının sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Dropsens; CV (Dönüşümlü voltametri), DPV (Diferansiyel puls voltametrisi), SWV (Kare dalga voltametrisi) ölçümleri için kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat (http://www.dropsens.com/en/potentiostats_pag.html#stat400, 2019).

Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA: Dönüşümlü voltametri, kronoamperometri, kronopotansiyometri ve kare dalga voltametrisi, elektrokimyasal empedans spektroskopisi gibi temel fiziksel ve elektroanalitik tekniklerin çalışılabildiği bir cihazdır.

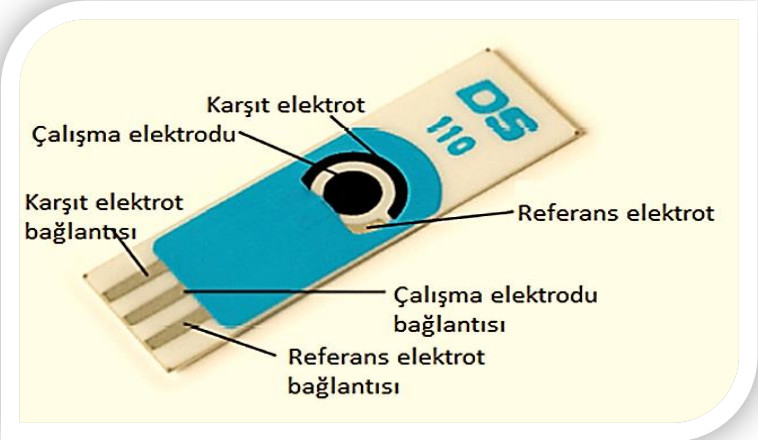


Şekil 3.2. Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA (https://www.gamry.com/potentiostats/interface-1010e-potentiostat/ , 2020).

Bilgisayar kontrollü olan bu cihazın sinyalleri Gamry Instrument 1010 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Gamry; CV, EIS ölçümleri için kullanılmıştır (Şekil 3.2).

3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler

Deneylerimizde yüzey baskılı karbon elektrotlar kullanılmıştır. Bu elektrotların tedariği, DropSens firmasından sağlanmıştır. Yüzey baskılı karbon elektrotların; çalışma elektrodu 4 mm çapında olup karbondan, yardımcı elektrodu karbondan, referans elektrodu ise pseudo Ag/AgCl (0,1 M KCl)'den yapılmıştır. Yüzey baskılı elektrotların yapısı Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. SPCE: Screen Printed Carbon electrode (Yüzey baskılı karbon elektrotlar) (http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html, 2020).

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



Şekil 3.4. Yüzey baskılı elektrotlar (SPCE) için sensör konnektör çeşitleri A) Kesikli analiz için kablo şeklinde (http://www.dropsens.com/en/accesories_pag.html, 2020), B) Damlamalı analizler için kutu şeklinde (http://www.dropsens.com/en/faqs_dropsens.html, 2020).

Deneylerde kesikli analiz sırasında, elektrotlar için, metil metakrilat malzemesinden imal edilmiş olan elektrokimyasal hücreler kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre (http://www.dropsens.com/en/faqs_dropsens.html, 2020).

3.2. Metot

3.2.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi

SPCE elektrotlarının yüzeylerinin temizlenip aktive edilebilmesi için; elektrotlara, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızında 3 döngü dönüşümlü voltametri (CV) uygulanarak temizleme yapılmıştır.

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 fosfat tamponu çözeltileri, destek elektrolit olarak kullanılmıştır. PTH 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. RGO ile modifiye edilen SPCE'ler, SPCE/RGO ile sembolize edilmiştir.

3.2.4. SPCE/RGO üzerinde PTH'nin hazırlanması

1 mM tiyonin çözeltisi, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Döngüsel voltametri uygulanarak tiyoninin SPCE/RGO üzerinde elektropolimerizasyonu sağlanmıştır. Döngüsel voltametri, -0,5 V ile +1 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 20 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Yang et al., 1999). Polimerizasyon sonrasında, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu (0,1 M KCl) kullanılarak -1 V ile +1V potansiyel aralığında döngüsel voltametri uygulanmıştır. Sonrasında ise yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. PTH ile modifiye edilen SPCE/RGO'lar SPCE/RGO/PTH şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.5. SPCE/RGO/PTH'lerin Altın Nanopartikül ile Kaplanması

SPCE/RGO/PTH'lerin WE yüzeyine, 50 mM pH 7 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içinde hazırlanan 0,004 M $HAuCl_4.3H_2O$ çözeltisinden 50 µL damlatılmıştır. Ardından döngüsel voltametri, -1,3 V ile -0,2 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 10 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Karaboğa ve Sezgintürk, 2019). Daha sonra elektrotların yüzeyine yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. AuNP ile modifiye edilen SPCE'ler SPCE/RGO/PTH/AuNP şeklinde kısaltılmıştır.

AuNP'lerin biyoaktivitelerini koruyan biyomoleküllerin stabil bir immobilizasyonunu sağlama yeteneği, biyosensörlerin hazırlanması için büyük bir

avantajdır. Ayrıca AuNP'ler, redoks proteinleri ve dökme elektrot malzemeleri arasında doğrudan elektron transferine izin verir, böylece elektrokimyasal algılamanın elektron transfer aracılarına gerek kalmadan gerçekleştirilmesine izin verir. Yüksek yüzey/hacim oranı, yüksek yüzey enerjisi, protein-metal partikül mesafesini azaltma yeteneği ve protez grupları ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron ileten yollar olarak işlev görürler. AuNP'lerin bu özellikleri, redoks proteinleri ve elektrot yüzeyleri arasında elektron transferini kolaylaştıran nedenlerdir. AuNP'ler ayrıca birçok önemli biyokimyasal reaksiyonda yer alan H_2O_2, O_2 veya NADH gibi moleküllerin redoks işlemlerinin elektrokatalizinde yararlı arayüzler oluşturduğunu göstermiştir (Pingarron, 2008). Çalışmamızda, AuNP'ler PTH ile birlikte immünosensörün arayüzünü oluşturmuştur. Ayrıca; AuNP'nin kullanılmasının asıl ve en önemli amacı; 3-MPA ile AuNP'nin Au-S kovalent bağı yapmasıdır.

3.2.6. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile HE_4 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 Layer By Layer yöntemi ile 3 µL (3 defada 1'er µL) damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar, karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir. 3-MPA, yüzey baskılı karbon elektrotlara altın kaplandıktan sonra bunu sabitlemek üzere, tutucu bir ajan görevinde kullanılmıştır. Çalışmamızda; 3-MPA, sahip olduğu –SH grubu sayesinde altın ile kuvvetli Au-S bağı yaparak diğer ucundaki karboksil grubuna çeşitli uygulamalar için imkan sağlamıştır. Hazırlanan elektrotlara yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. Modifiyeli SPCE'lerin WE yüzeyine 50 mM pH 7 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içerisinde hazırlanmış 0,6 mM EDC/0,1 mM NHS çözeltisinden 2 µL damlatılmıştır. Hazırlanan elektrotlar 1 saat süresince oda sıcaklığında sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra elektrotların yüzeyi, ultra saf su ile temizlenmiş ve sonrasında kurutulmuştur. Çalışmamızda kovalent bağlayıcı olarak, N-hidroksisüksinimid/1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid (EDC/NHS) çözeltisi kullanılmıştır.

N-hidroksisüksinimid/1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid (EDC/NHS) çözeltisi karışımı, biyomoleküllerin taşıyıcı sistemlerine immobilizasyonu için kullanılan bir reaktiftir. EDC molekülünün her iki ucunda bulunan amin grupları sayesinde NHS ilavesi ile karboksil grubu içeren bir polimer ile bir biyomolekülü birbirine bağlayabilmektedir (Derkuş, 2012). Kovalent bağlanma reaksiyonları türleri arasında, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid/N-hidroksisülfosüksinimid (EDC/NHS) aracılı reaksiyon en çekici yaklaşımlardan biridir. EDC/NHS; yüksek dönüşüm verimliliği ve biyoaktivite üzerinde az etkisi olan mükemmel biyouyumluluk nedeniyle biyomoleküllerin farklı substratlara konjugasyonunda yaygın olarak uygulanmaktadır (Ning et al., 2013).

Çalışmamızda; 3-MPA'daki –COOH grubu EDC-NHS'deki NH_2 grubu ile bağ yaparak elektrot yüzeyine bağlanmıştır.

3.2.6.2. Anti-HE_4'ün SPCE/RGO/PTH/AuNP'ler üzerine immobilizasyonu

Her bir elektrodun WE yüzeyine 50 mM pH 7 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) hazırlanmış olan 33,33 µg/mL anti-HE_4 çözeltisinden 3 µL damlatılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında sabit nem ortamında 45 dk bekletilmiştir. Elektrotların yüzeyine, yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. Anti-HE_4 ile tutuklanan SPCE'ler, SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.6.3. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4'lerin BSA ile modifikasyonu

Modifiyeli SPCE'lerin WE yüzeyine pH 7 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) hazırlanmış olan %1'lik BSA çözeltisinden 3 µL damlatılmış ve 30 dk oda sıcaklığında sabit nem ortamında bekletilmiştir. Ardından elektrotlara yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. BSA ile modifiye edilen SPCE'ler, SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.6.4. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA'ların HE_4 antijeni ile tutuklanması

SPCE'lerin WE yüzeyine 50 mM pH 7 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) hazırlanmış olan HE_4 çözeltisinden 3 µL damlatılmış ve elektrotlar oda sıcaklığında sabit nem ortamında 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra elektrotların yüzeyine yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. HE_4 ile tutuklanan SPCE'ler, SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA/HE_4 şeklinde kısaltılmıştır.

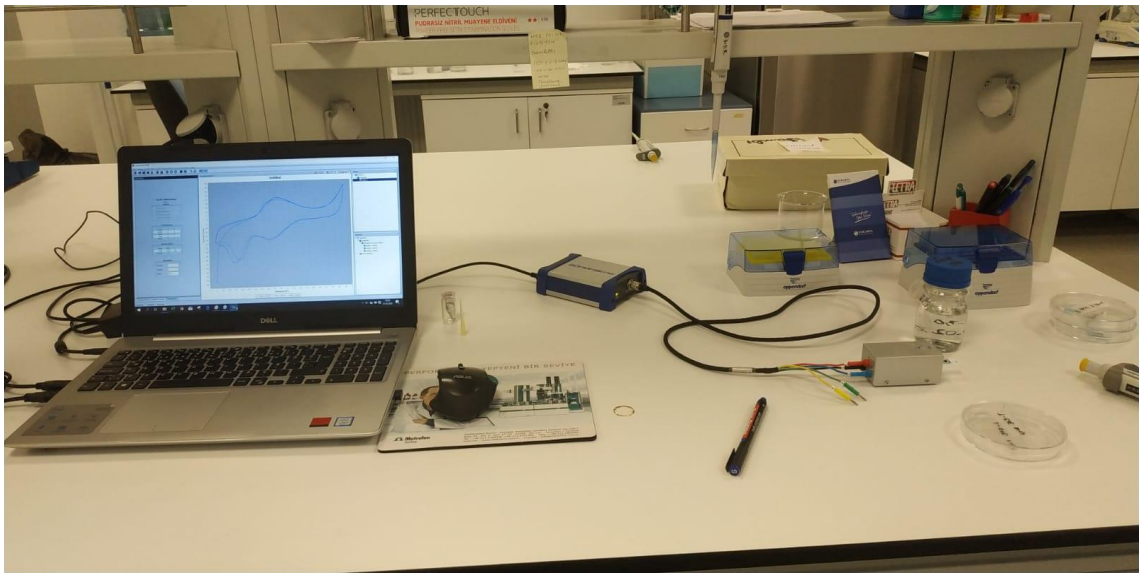
3.2.6.5. Elektrokimyasal ölçümler

Elekrokimyasal ölçümler, elektrot yüzeyine 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinden SPCE'lerin elektrot yüzeyine 100 µL damlatılarak gerçekleştirilmiştir. CV, DPV ve SWV ölçümleri, DropSens µstat 400 bipotansiyostat/galvanostat ile yapılmıştır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ölçümleri ise; Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler için elektrotlar, elektrokimyasal hücre içerisinde bulunan 13 mL 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl) çözeltisine daldırılarak ölçülmüştür. Elektrokimyasal ölçüm parametreleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

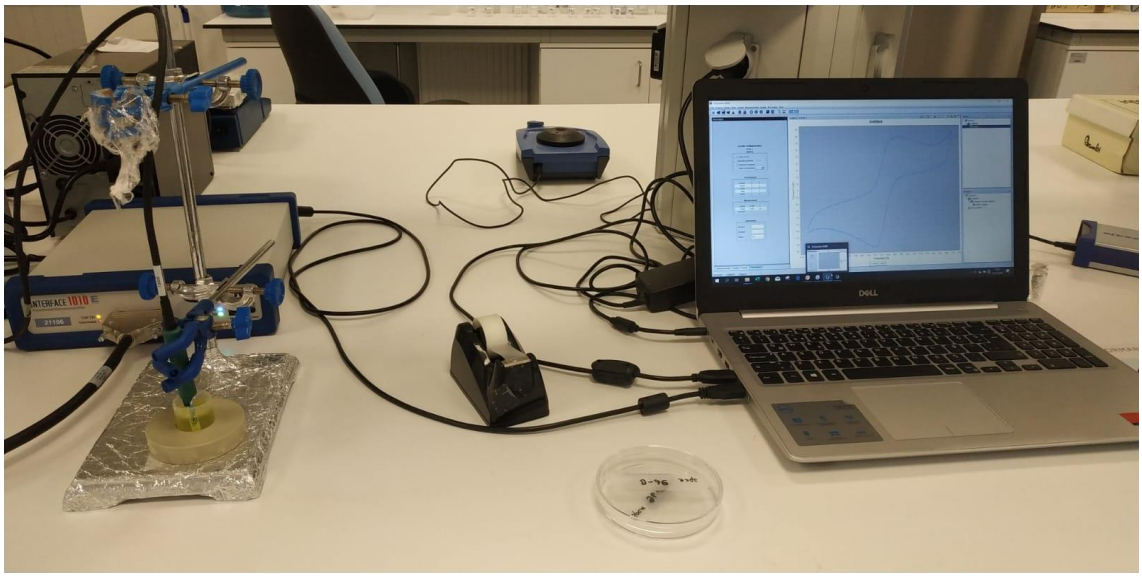
Çizelge 3.1. Elektrokimyasal ölçüm parametreleri.

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

DropSens mikrostat 400 bipotansiyostat/galvanostat ve Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile yapılan ölçümlerin sistemi Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.6. DropSens mikrostat 400 bipotansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi.

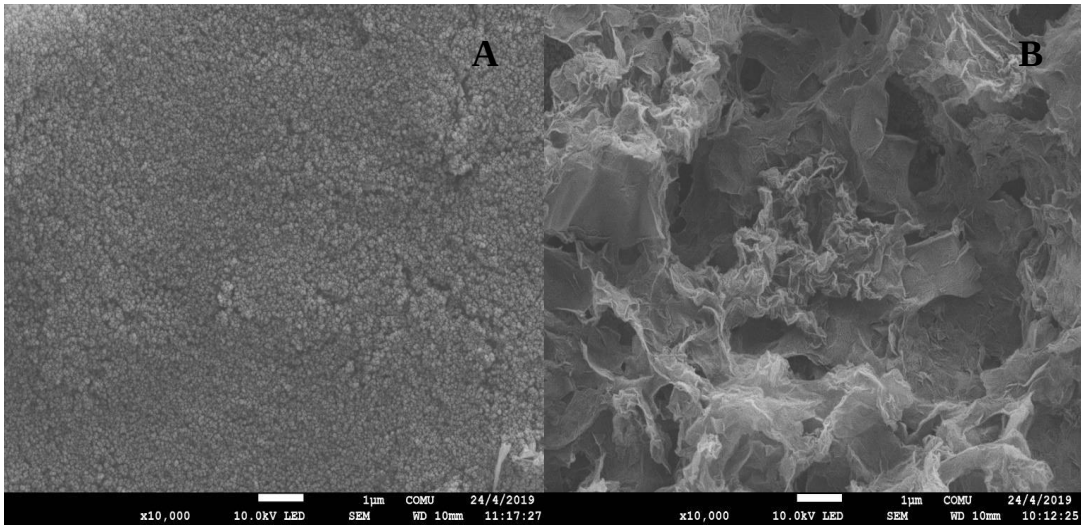


Şekil 3.7. Gamry Interface 1010E potansiyostat/galvanostat ile elektrokimyasal ölçüm sistemi.

4. BULGULAR

4.1. SPCE'lerin indirgenmiş grafen oksit ile modifikasyonu

SPCE'ler üzerine RGO'nun modifikasyonu fiziksel adsorbsiyon ile yapılmıştır. Yalın SPCE ve hazırlanan SPCE/RGO elektrotlarının SEM görüntüleri alınmış ve sırasıyla Şekil 4.1 (A) ve (B)'de verilmiştir.



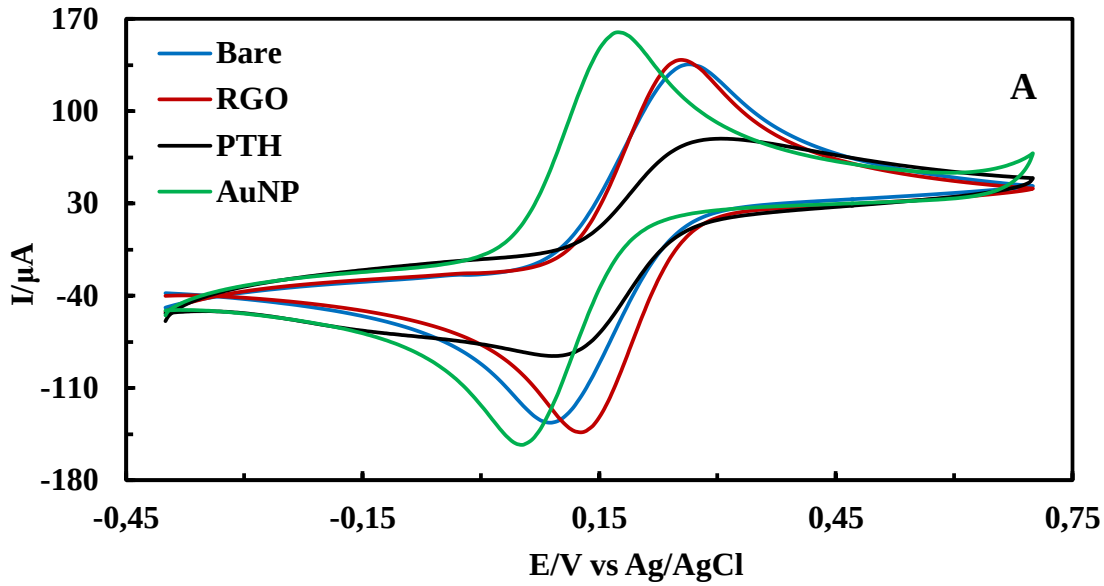
Şekil 4.1. Yalın SPCE (A) ve SPCE/RGO (B) elektrotlarının SEM görüntüleri.

Şekil 4.1.(B)'de SPCE elektroduna modifiye edilen RGO'nun katmanlı, rastgele 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.

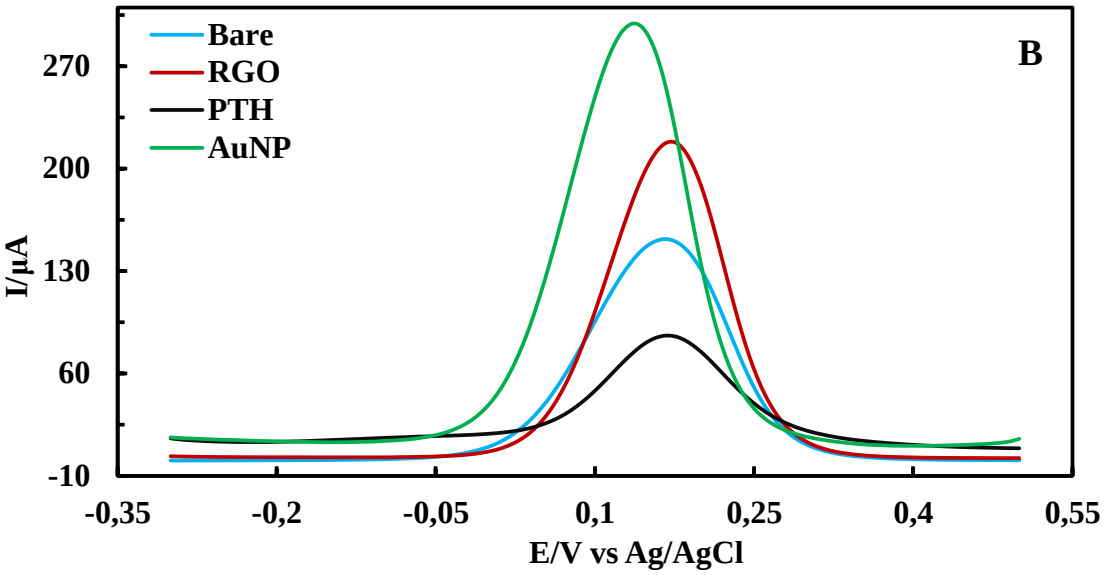
4.2. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu

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 4.2.(A, B, C ve D)'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,

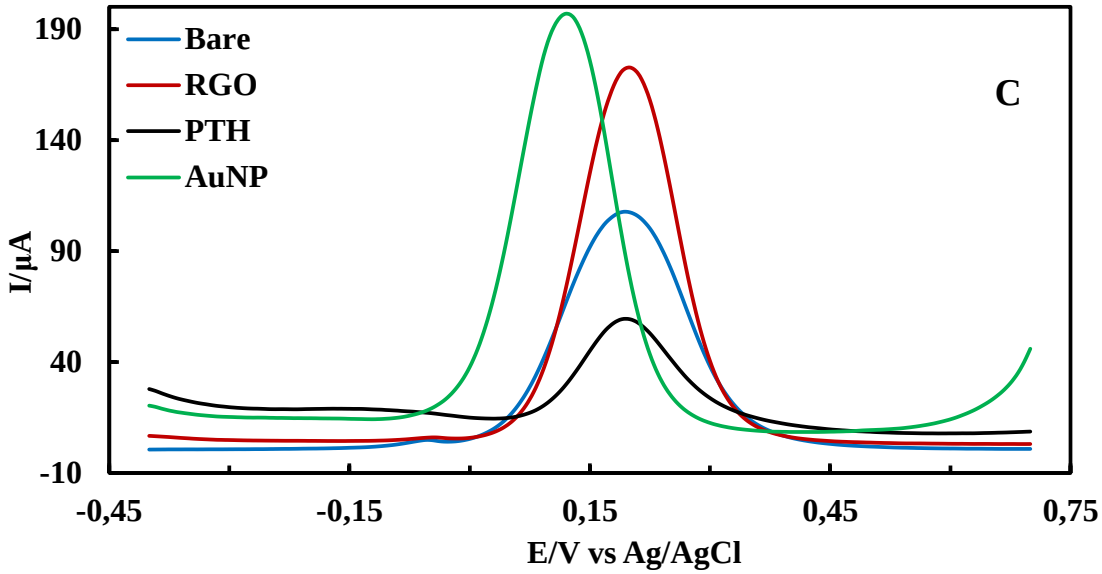
diferansiyel puls voltamogramları ve kare dalga voltamogramları ve elektrokimyasal empedans spektrumları spektrumları verilmiştir. CV sonuçlarına göre, SPCE'lerin yüzeyinde RGO'ların modifiye edildiği görülmektedir. Elektrot formülasyonunda RGO'nun yer alması ile anodik ve katodik pik akımlarının arttığı ve pik potansiyelleri arasındaki farkın daraldığı anlaşılmaktadır. RGO, elektronik iletkenliği ve elektrokimyasal reaksiyonun tersinirliğini artırmıştır. Tiyoninin polimerleşmesi, pikte azalma şeklinde gözlenmiştir. SPCE/RGO/PTH formülasyonuna AuNP'nin eklenmesi, anodik ve katodik pik akımlarında çok belirgin bir artış sağlamıştır. RGO, elektroaktif yüzey alanını ve elektronik iletkenliği artırmak amaçlı kullanılmış, elektroda modifiye edildiğinde yüksek iletkenliği sebebiyle pik artışı sağlamıştır. PTH etiketsiz elektrokimyasal biyosensörlere elektroaktif arayüzler üretmek amacıyla kullanılmıştır. Tiyoninin elektropolimerizasyonu ile, kararlı bir film tabakası oluşturulmuştur ve bu film tabakası biyosensörün arayüzünü oluşturmuştur (Lai et al., 2018). PTH, biyoanalitik uygulamalar için hızlı yük transfer kapasitesine sahip büyük bir potansiyel sergiler. Bu yüzden formülasyona PTH'nin eklenmesi pikte azalmaya neden olmuştur. AuNP, biyolojik aktivitelerini koruyan biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun bir mikro ortam sağlamak ve proteinler ile elektrot yüzeyleri arasında elektron transferini kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır. AuNP, kararlı bir modda immüno-reaktiflerin immobilizasyonunun verimliliğinde büyük rol oynar. AuNP, PTH ile bir film tabakası oluşturur ki, bu da biyosensöre bir arayüz görevi görür. Oluşan bu kararlı yapı sebebiyle AuNP'nin elektrot formülasyonunda yer alması, pik akımlarında daha çok artışa neden olmuştur. RGO, PTH ve AuNP'nin elektrot formülasyonunda birlikte yer alması sinerjik bir etki göstermiştir. Bu ise, elektrodun elektroaktif yüzey alanını, dolayısıyla da elektronik iletkenliği ve elektrodun tersinirliğini artırmıştır. SWV ve DPV sonuçlarında da benzer bir durum gözlenmiştir. EIS sonuçlarına bakıldığında ise, elektrodun sırasıyla RGO, PTH ve AuNP ile modifiye edilmesiyle elektronik iletkenliğin arttığı ve buna paralel olarak direncin azaldığı görülmüştür. Benzer sonuçlar SWV ve DPV ile elde edilen voltamogramlarda da görülmüştür. Şekil 4.2.(A, B, C)'de görüldüğü üzere; PTH SPCE/RGO'lar üzerine, AuNP de SPCE/RGO/PTH üzerine başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir (Lai et al., 2014).



Şekil 4.2(A). 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.

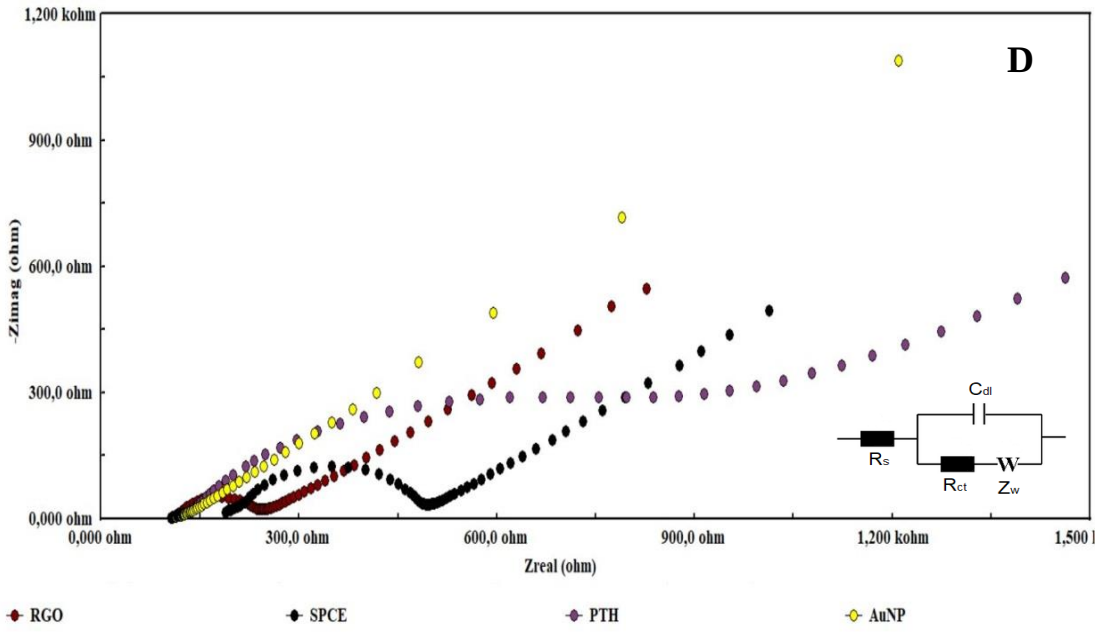


Şekil 4.2(B). Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,3 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları.



Şekil 4.2(C). 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 4.2(D)'de Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 0,5 ile 50000 Hz frekans aralığındaki elektrokimyasal empedans spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.2(D). Bare SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PTH ve SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları (EIS: 0,5–50000 Hz).

Şekil 4.2 (A, B, C ve D)'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 ile 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

Çizelgede verilmiş olan değerler incelendiğinde şu yorumlar yapılabilir: SPCE elektrodunun yüzeyi RGO ile kaplandığında, dirençte azalma olmuş ve anodik pik akımı artmıştır, bu da RGO'nun yüzeye kaplandığını ve iletkenliği artırıcı bir etki gösterdiğini ifade etmektedir. SPCE/RGO elektrodunun yüzeyine TH'in depozite edilmesi sonucu; iletkenlik azaldığından dirençte belirgin bir artış olmuş ve anodik pik akımı azalmıştır. Bu da elektropolimerizasyonun gerçekleştiğini gösterir. SPCE/RGO/PTH elektrodunun AuNP ile modifiye edilmesiyle dirençte yüksek bir miktarda azalma olmuş ve anodik pik akımı yüksek miktarda artmıştır, bu da elektrodun yüzeyine altının kaplandığını ve RGO, PTH ve AuNP'nin sinerjik bir etki ile elektrodun iletkenliğini yüksek oranda artırdığını gösterir (Lai et al., 2014).

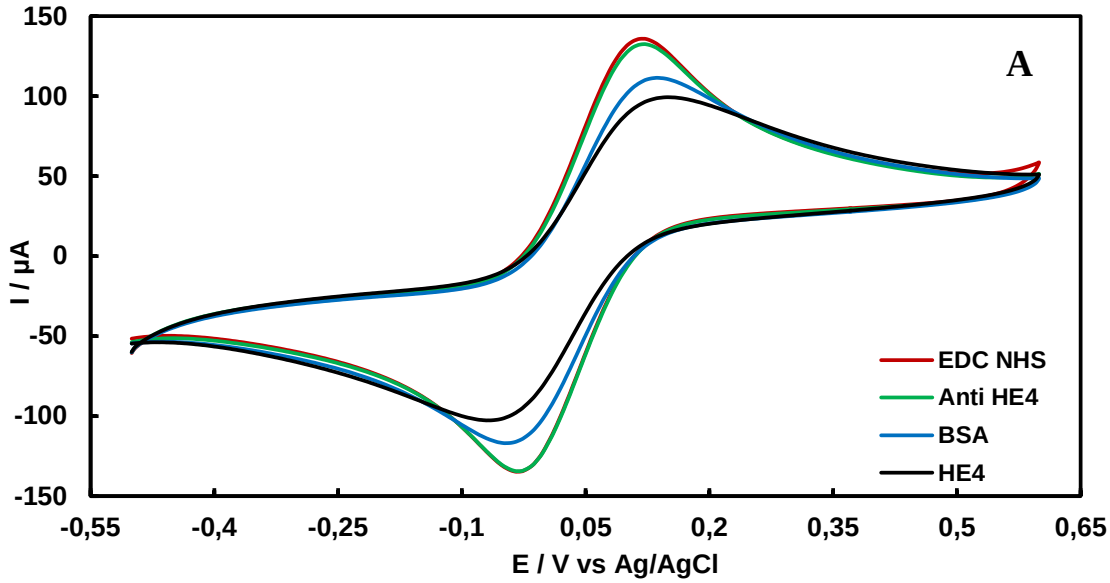
4.3. HE_4 İmmünosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

HE_4 immünosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları, optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan HE_4 immünosensörleri ile yapılmıştır. HE_4 immünsensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonları, Bölüm 4.4'de verilmiştir. Hazırlanan SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA/HE_4

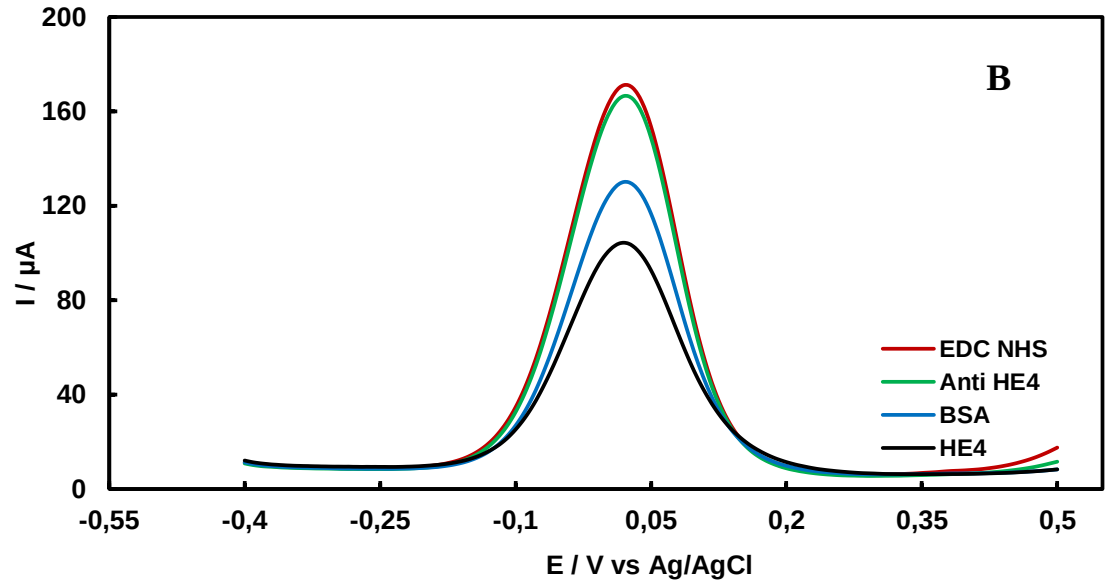
immünosensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için 50 ng/mL HE_4 konsantrasyonunda 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde EIS, CV, DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. HE_4 immünosensörlerinin hazırlanma basamaklarına ait döngüsel voltamogramları, diferansiyel puls voltamogramları, kare dalga voltamogramları ve elektrokimyasal empedans spektrumları sırasıyla Şekil 4.3.(A, B, C, D)'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 pik akımında azalma gözlenmiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodu üzerinde 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı molekülleri (Self-assembly monolayer, SAM) oluşturulmuştur. 3-MPA'da yer alan -SH fonksiyonel grubu ile AuNP arasında Au-S kovalent bağ oluşumu gerçekleşmiştir ve bu yüzden anodik pik akımı azalmıştır. Anodik pik akımındaki bu azalışın nedeni, 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı moleküllerinin bloke edici etkisidir. Bloke edici etki nedeniyle, elektrot yüzeyinde yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve çözeltideki 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$'nin elektronlarının elektrot yüzeyine difüzyonu azalmıştır. Elektronların elektrot yüzeyine difüzyonundaki azalış nedeniyle de pik akımları azalmıştır. Bir sonraki aşamada, 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı moleküllerinin terminal -COOH grupları, EDC-NHS tarafından aktive edilmiş ve ortalama anodik pik akımı değeri artmıştır. Bu artışın nedeni, EDC-NHS tarafından 3-MPA SAMs'da bulunan terminal -COOH gruplarının aktive edilmesi sonucu aktif bir ester ara ürünün oluşmasıdır. Bu ara ürün, NHS ve 3-MPA SAMs'daki terminal -COOH'in reaksiyonu sonucu oluşan kararlı bir kondenzasyon ürünüdür (Sezgintürk, 2011). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 basamağında, anti-HE_4'ün yüzeye immobilizasyonu sonrası pik akımında azalma gözlenmiştir. Bu azalışın nedeni, antikorun SPCE/RGO/PTH/AuNP yüzeyini yalıtkan hale getirmesi ve bunun sonucu olarak elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmasıdır. Bu sonuç, Anti-HE_4'ün elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA basamağında, BSA'nın yüzeye inkübasyonu ile elektrot yüzeyinde Anti-HE_4 basamağına göre daha yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve bunun sonucu olarak elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azalmıştır. Difüzyonun azalması ile anodik pik akımı değeri de azalmıştır.

SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA/HE_4 basamağında ise, HE_4'ün yüzeye immobilizasyonu sonucunda oluşan yalıtkan tabaka, BSA basamağına göre artmıştır. Difüzyonun azalmasının bir sonucu olarak anodik pik akımı değeri azalmıştır. (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). Şekil 4.3 (A, B, C)'de verilen diferansiyel puls voltamogramlarında da benzer sonuçlar gözlenmiştir. Şekil 4.3(D)'deki elektrokimyasal empedans spektrumlarına göre, SPCE/RGO/PTH/AuNP elektroduna MPA ile kovalent bağlama aşamasında, AuNP üzerinde 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı molekülleri nedeniyle ortalama ΔRct değeri artmıştır. ΔRct değerindeki artış, 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı moleküllerinin bloke edici etkisidir. Bloke edici etki nedeniyle, elektrot yüzeyinde yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve çözeltideki 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$'nin elektronlarının elektrot yüzeyine difüzyonu azalmıştır. Elektronların elektrot yüzeyine difüzyonundaki azalış nedeniyle de ΔRct değeri artmıştır. Bloke edici etkinin yanında, elektrot yüzeyindeki 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı moleküllerindeki terminal -COO- grupları negatif yüklü bir yüzey oluşturmuştur. Böyle negatif yüklü bir yüzey, redoks probu anyonu ile -COOH grupları arasında elektrostatik itici etkiler göstermiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodu MPA ve EDC-NHS ile aktive edildiğinde, ortalama ΔRct değerinde azalış olmuştur. ΔRct değerinde azalış, 3-MPA'nın kendiliğinden biriken tek katmanlı moleküllerindeki terminal -COOH'ın EDC-NHS tarafından aktivasyonunu ve aktif bir ara ürünün oluşumunu göstermektedir (Sezgintürk, 2011). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 basamağında, anti-HE_4'ün yüzeye immobilizasyonu sonrası ortalama ΔRct değerinde artış gözlenmiştir. Rct değerinde artışın nedeni, antikorun SPCE/RGO/PTH/AuNP yüzeyini yalıtkan hale getirmesi ve bunun sonucu olarak elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmasıdır. Bu sonuç, Anti-HE_4'ün elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir (Sezgintürk, 2011, Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın, E. B. vd, 2020, Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). Antikor, BSA ve antijenin modifikasyon basamaklarından sonra, elektrot yüzeyinin yalıtkanlığının artışı nedeniyle direnç değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Direnç artışındaki değişimin yani ΔRct'nin en yüksek olduğu basamak ise, BSA basamağıdır. Bunun sebebi ise, BSA modifikasyonundan sonra dimmünosensör yüzeyinin diğer basamaklardakinden çok daha fazla yalıtkan hale gelmesidir. (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Demirbakan ve

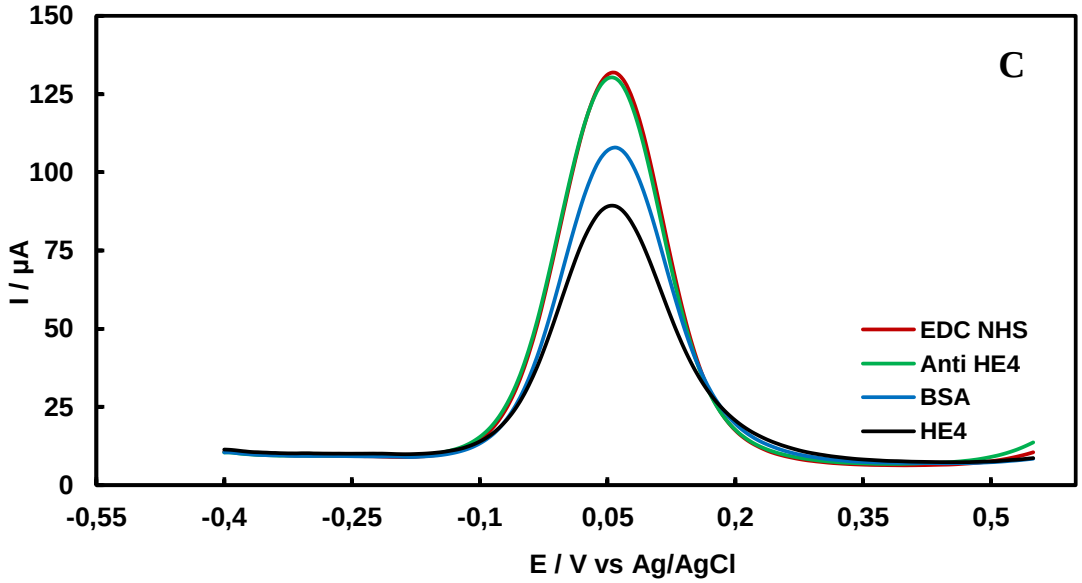
Sezgintürk, 2020). CV, DPV, SWV ve EIS'den elde edilen sonuçlara göre Anti-HE_4 elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir (Sezgintürk, 2011, Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın, E. B. vd, 2020, Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). CV, DPV, SWV ve EIS sonuçları birbiri ile uyumludur.



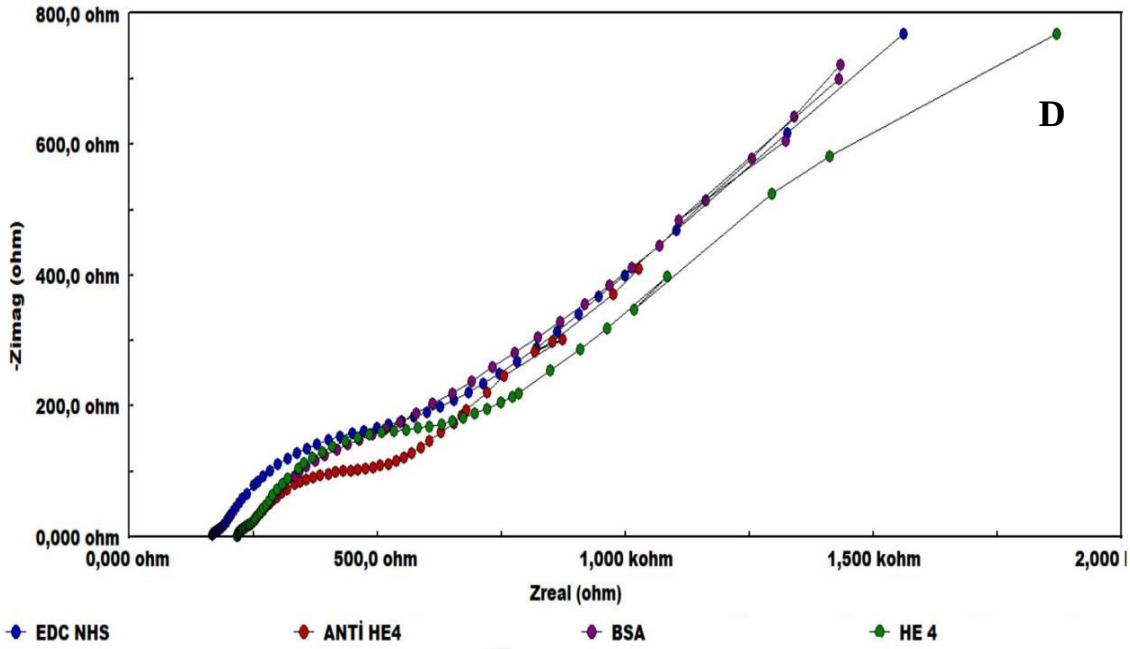
Şekil 4.3(A). HE_4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,5 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4.



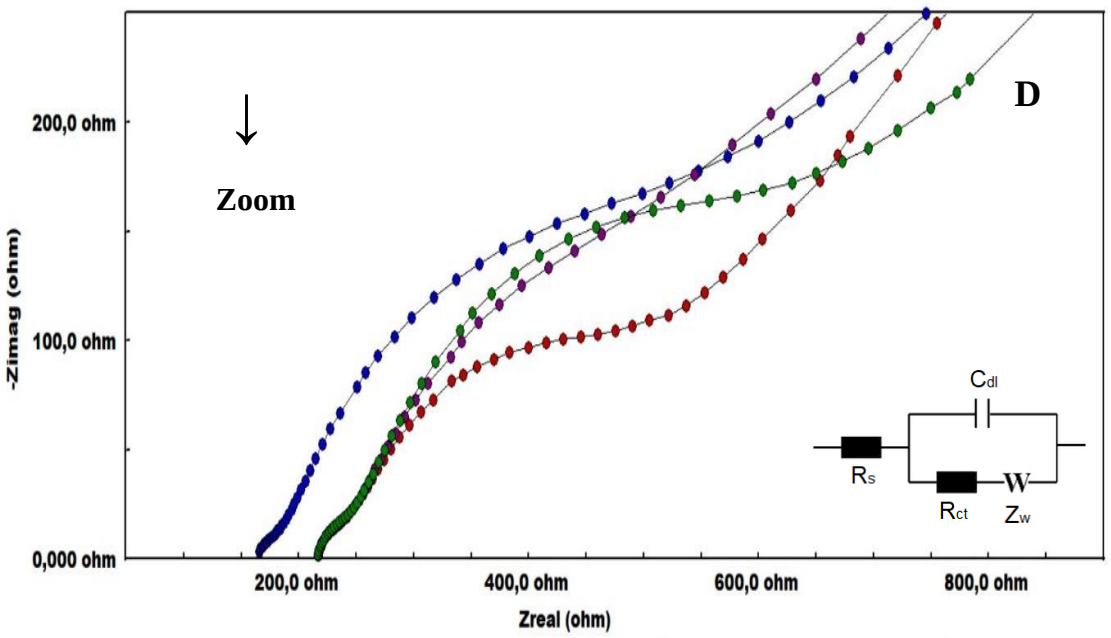
Şekil 4.3(B). HE_4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,5V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4.



Şekil 4.3(C). HE_4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki -0,4 V ile +0,55 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4.



--



Şekil 4.3(D). HE4 immunosensörünün immobilizasyon basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisindeki elektrokimyasal empedans spektrumları: EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-HE_4, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA, EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4 (EIS: 0,5–50000 Hz).

Şekil 4.3 (A, B, C ve D)'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. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA/HE_4 immünosensörünün hazırlanma basamaklarında EIS'de ölçülen direnç değerleri ve CV, DPV ile SWV'de ölçülen pik akımı yükseklikleri.

Elektrot türü	**EIS (ohm)**	**CV (µA)**	**DPV (µA)**	**SWV (µA)**
EDC-NHS	580,8	130,3	164,1	122,5
EDC-NHS/Anti-HE_4	428,2	126,6	160	121,4
EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA	1357,4	105,9	122,3	100,5
EDC-NHS/Anti-HE_4/BSA/HE_4	588,3	91,0	96,7	79,9

Çizelge 4.2'de gösterilmiş olan değerler incelendiğinde şu yorumlar yapılabilir: Hazırlanan transduserin ölçülen direnç ve pik akımı değerleri; EIS:114,8 ohm, CV:150,6 µA DPV:287,2 µA, SWV:185,6 µA idi. Transduser elektrodunun yüzeyi

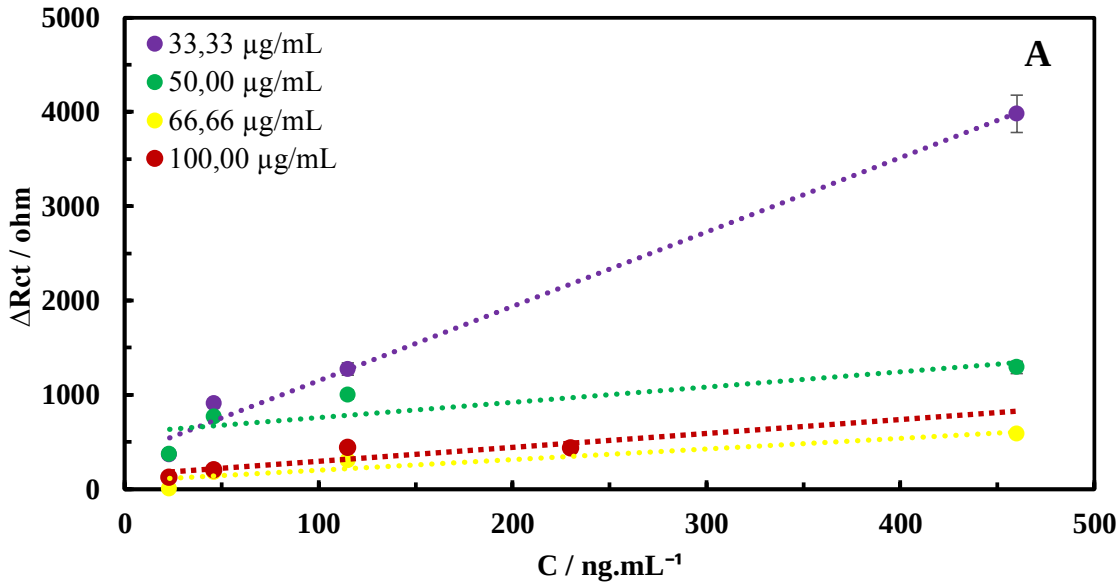
3-MPA ve EDC-NHS ile aktive edildiğinde dirençte artış ve anodik pik akımlarında azalma olmuştur. Anti-HE_4 transdusere tutuklandığında dirençte azalma ve anodik pik akımlarında da azalma olmuştur, bu da Anti-HE_4'ün yüzeye tutunduğunu ve iletkenliği azaltıcı bir etki gösterdiğini ifade etmektedir. Elektrodun yüzeyine BSA'nın modifiye edilmesi sonucu; elektrot yüzeyinde daha yalıtkan bir tabaka oluştuğu için dirençte belirgin bir artış ve anodik pik akımlarında azalma olmuştur ki bu da modifikasyonun gerçekleştiğini gösterir. Son basamakta, elektrodun HE_4 antijeniyle tutuklanması ile dirençte belirgin bir azalma olmuştur. CV, DPV ve SWV'de de anodik pik akımlarında azalma görülmüştür. Bu da HE_4 antijeninin Anti HE_4 antikoru ile bağlandığını yani reaksiyonun gerçekleştiğini gösterir (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Demirbakan ve Sezgintürk, 2020).

4.4. HE_4 İmmunosensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi

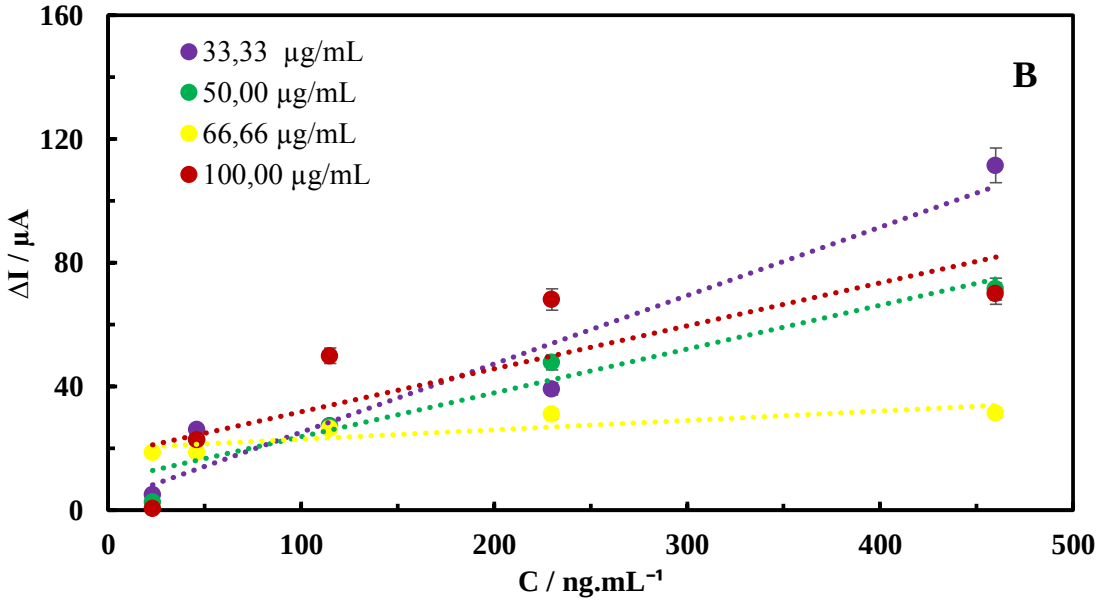
4.4.1. Anti-HE_4 antikor konsantrasyonunun optimizasyonu

Anti-HE_4 konsantrasyonunun optimizasyonu için, 33,33 µg/mL, 50,0 µg/mL, 66,66 µg/mL ve 100,0 µg/mL olmak üzere 4 farklı Anti-HE_4 konsantrasyonuna sahip HE_4 immünosensörleri hazırlanmıştır. Elektrotların yüzeylerine farklı konsantrasyonda hazırlanan anti-HE_4 çözeltisinden damlatılarak 45 dk boyunca sabit nem ortamında oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan HE_4 immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki HE_4'ün analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı HE_4 immünosensörleriyle farklı konsantrasyonlardaki HE_4'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 HE_4 konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve Şekil 4.4.(A)'da verilmiştir. Grafikler incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlenmiştir. DPV ölçümlerinden elde edilen akım farkı (ΔI) değerlerinin farklı HE_4 konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve Şekil 4.4.(B)'de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.4(A). Anti-HE_4'ün farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



Şekil 4.4(B). Anti-HE_4'ün farklı konsantrasyonlarının SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.4.(A) ve Şekil 4.4.(B)'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.

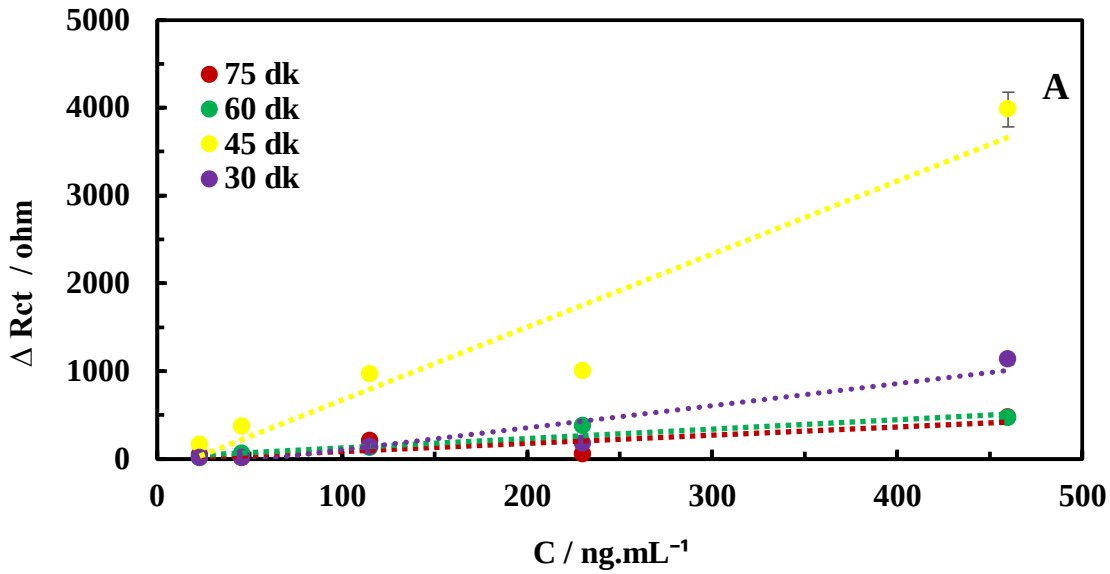
Metot	Anti-HE_4 konsantrasyonu (µg/mL)	Duyarlık (EIS:ohm.ng^{-1}.mL DPV:µA.ng $^{-1}$.mL)	Korelasyon katsayısı (r)
EIS	33,33	7,888	0,9916
	50,00	1,624	0,7175
	66,66	1,129	0,8794
	100,00	1,165	0,8758
DPV	33,33	0,221	0,9347
	50,00	0,142	0,9301
	66,66	0,030	0,7350
	100,00	0,139	0,6806

Şekil 4.4(A) ve Şekil 4.4(B)'de verilen her iki grafik incelendiğinde; HE_4 konsantrasyonu ile akım ve direnç değerlerinin artışında en doğrusal olan grafiğin 33,33 µg/mL Anti-HE_4 konsantrasyonuna ait olan grafik olduğu görülmektedir. Çizelge 4.3'teki duyarlık ve korelasyon katsayısı verileri incelendiğinde; 33,33 µg/mL Anti-HE_4 konsantrasyonunda duyarlığın en yüksek ve korelasyon katsayısının da 1'e en yakın olduğu görülmüştür. Tüm bu bilgiler ışığında, Anti-HE_4 için optimum antikor konsantrasyon değeri 33,33 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında HE_4 immünosensörleri 33,33 µg/mL Anti-HE_4 konsantrasyonu kullanılarak hazırlanmıştır.

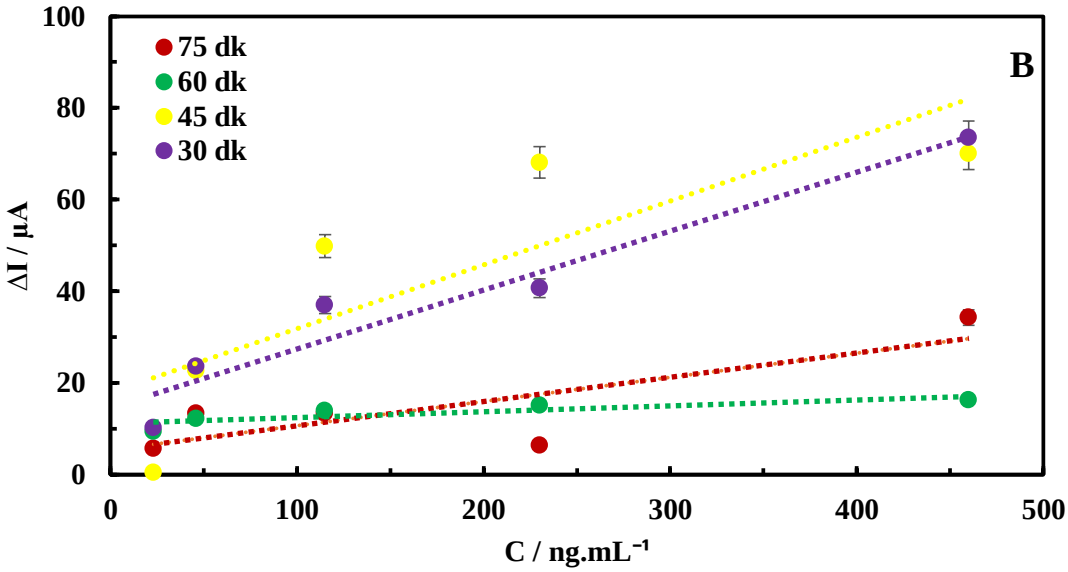
4.4.2. Anti-HE_4 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Optimum Anti-HE_4 konsantrasyonunu belirledikten sonra, Anti-HE_4'ün inkübasyon süresinin optimizasyonu basamağına geçilmiştir. Burada amaç; Anti-HE_4'ün hangi inkübasyon süresinde en verimli şekilde yüzeye tutuklanabileceğini tespit etmektir. Elektrotların her birinin yüzeyine 33,33 µg/mL Anti-HE_4 çözeltisi damlatılarak 30, 45, 60 ve 75 dakika olmak üzere dört farklı sürede sabit nem ortamında oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan HE_4 immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki HE_4'ün analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı HE_4

immünosensörleriyle farklı konsantrasyonlardaki HE_4'in analizi için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde EIS ve DPV ölçümleri yapılmıştır. Farklı Anti-HE_4 inkübasyon sürelerinde hazırlanmış SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörlerinin, farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS ve DPV cevaplarına etkileri incelenmiştir. Elektrokimyasal empedans spektrumlarından elde edilen ΔRct değerlerine karşı HE_4 konsantrasyonu grafiği Şekil 4.5.(A)'da, difreansiyel puls voltamogramlarından elde edilen ΔI değerlerine karşı HE_4 konsantrasyonu grafiği ise Şekil 4.5.(B)'de verilmiştir.



Şekil 4.5(A). Anti-HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



Şekil 4.5(B). Anti-HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.5.(A) ve Şekil 4.5.(B)'de verilmiş olan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Şekil 4.5(A) ve Şekil 4.5(B)'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri.

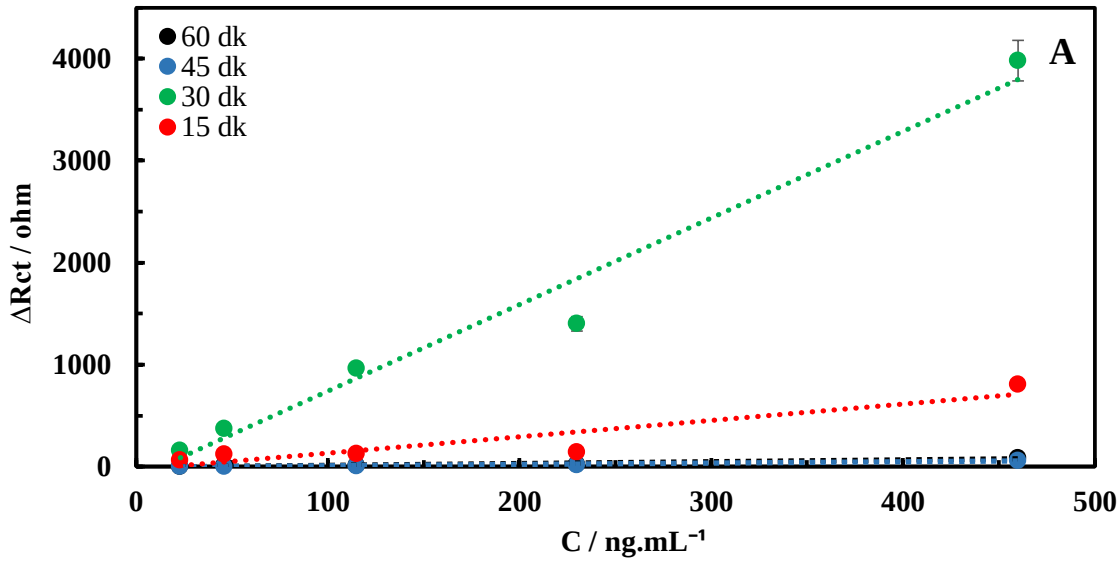
Metot	**Anti-HE_4 inkübasyon süresi (dk)**	**Duyarlık (EIS :ohm.ng^{-1}.mL DPV:µA.ng $^{-1}$.mL)**	**Korelasyon katsayısı (r)**
EIS	30	2,5172	0,8972
	45	8,4864	0,9733
	60	1,0689	0,9045
	75	0,9274	0,7465
DPV	30	0,1285	0,9400
	45	0,1844	0,9678
	60	0,0129	0,7330
	75	0,0528	0,6638

Şekil 4.5(A) ve Şekil 4.5(B)'de yer alan her iki grafik ve Çizelge 4.4 incelendiğinde; 30 dk inkübasyona bırakılmasının sonucunda Anti-HE_4'ün yüzeye iyi bağlanamadığı gözlemlenmiştir. 60 ve 75 dk'da ise yüzeyde bozulmalar başladığı için bu durumun biyomarker ölçüm sinyallerine de yansıdığı görülmüştür. Bu gözlemlenen sinyallerin doğrultusunda, akım ve direncin konsantrasyona bağlı en doğrusal artışının 45 dk bekleme süresi ile elde edildiği tespit edilmiştir. Buradan anlaşılan şudur ki; konsantrasyonu optimize edilmiş olan Anti-HE_4 45 dakika inkübasyona bırakıldığında HE_4 immünosensöründen daha yüksek performans elde edilmiştir. Sonuç olarak; Anti-HE_4 için optimum antikor inkübasyon süresi 45 dk olarak belirlenmiştir. Literatürde de antikorların elektrot yüzeyine immobilizasyonunda inkübasyon süresi genellikle 30 ile 60 dk arasındadır (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd, 2017). Bulunan sonuçlar literatür ile de uyumludur. Ayrıca antikorların yüzeye kuvvetle immobilizasyonu sonucunda Anti-HE_4 inkübasyon süre optimizasyonu deneylerinin sonuçları göstermektedir ki, antikorların yüzeye immobilizasyonu ne kadar kuvvetli olursa, immünosensörün duyarlığı da o kadar artmaktadır. Çalışmanın bundan sonraki kısımında, 33,33 µg/mL konsantrasyonundaki Anti-HE_4'ler 45 dk inkübe edilerek, HE_4 immünosensörleri hazırlanmıştır. Optimum Anti-HE_4 inkübasyon süresi belirledikten sonra, HE_4 antijeninin inkübasyon süresinin optimizasyonu basamağına geçilmiştir.

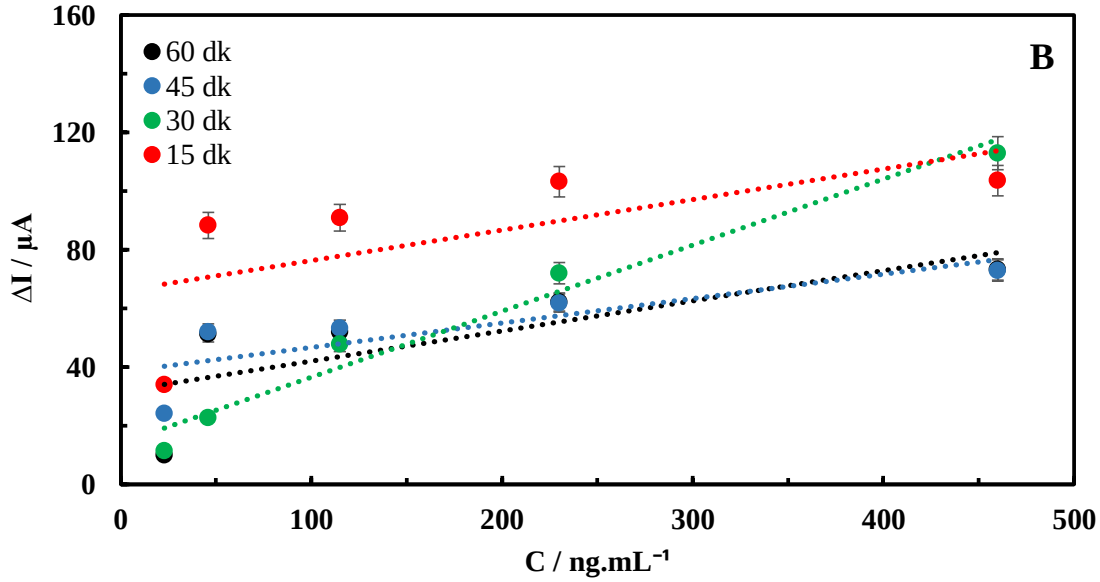
4.4.3. HE_4 antijen inkübasyon süre optimizasyonu

Tezin bu aşamasında, diğer optimum koşullar sağlandıktan sonra (33,33 µg/mL Anti-HE_4 konsantrasyonu ve 45 dk Anti-HE_4 inkübasyonu) son olarak HE_4'ün immünosensörün yüzeye en verimli şekilde tutuklanabileceği süre belirlenmiştir. Bu amaçla diğer optimum koşullar sabit tutularak hazırlanan immünosensörlere HE_4 çözeltisi damlatılmış ve 5 farklı antijen inkübasyon süresi için elektrotlar 15 dk, 30 dk, 45 dk ve 60 dk sürelerde sabit nem ortamında oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır. Hazırlanan HE_4 immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki HE_4'ün analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı HE_4 immünosensörleriyle farklı konsantrasyonlardaki HE_4'ün analizi için 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde EIS ve DPV ölçümleri yapılmıştır. Farklı HE_4 inkübasyon sürelerinde hazırlanmış SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörlerinin, farklı

konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS ve DPV cevaplarına etkileri incelenmiştir. EIS spektrumlarından elde edilen ΔRct değerlerine karşı HE_4 konsantrasyonu grafiği Şekil 4.6.(A)'da, DPV voltamogramlarından elde edilen ΔI değerlerine karşı HE_4 konsantrasyonu grafiği ise Şekil 4.6.(B)'de verilmiştir.



Şekil 4.6.(A). HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



Şekil 4.6.(B). HE_4'ün inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörünün farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı DPV cevabına etkileri (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

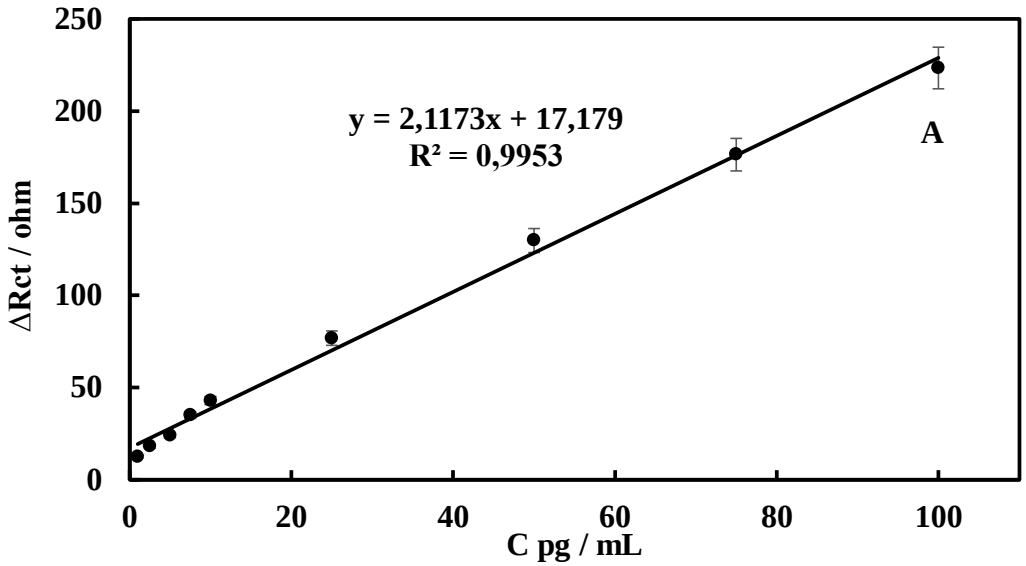
Çizelge 4.5. Şekil 4.6(A) ve Şekil 4.6(B)'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon değerleri.

Metot	HE_4 inkübasyon süresi (dk)	Duyarlık (EIS :ohm.ng^{-1}.mL DPV:µA.ng $^{-1}$.mL)	Korelasyon katsayısı (r)
EIS	15	1,6072	0,8505
	30	8,4864	0,9733
	45	1,1327	0,9603
	60	1,1794	0,8981
DPV	15	0,0383	0,7447
	30	0,2098	0,9805
	45	0,0525	0,9859
	60	0,0563	0,9750

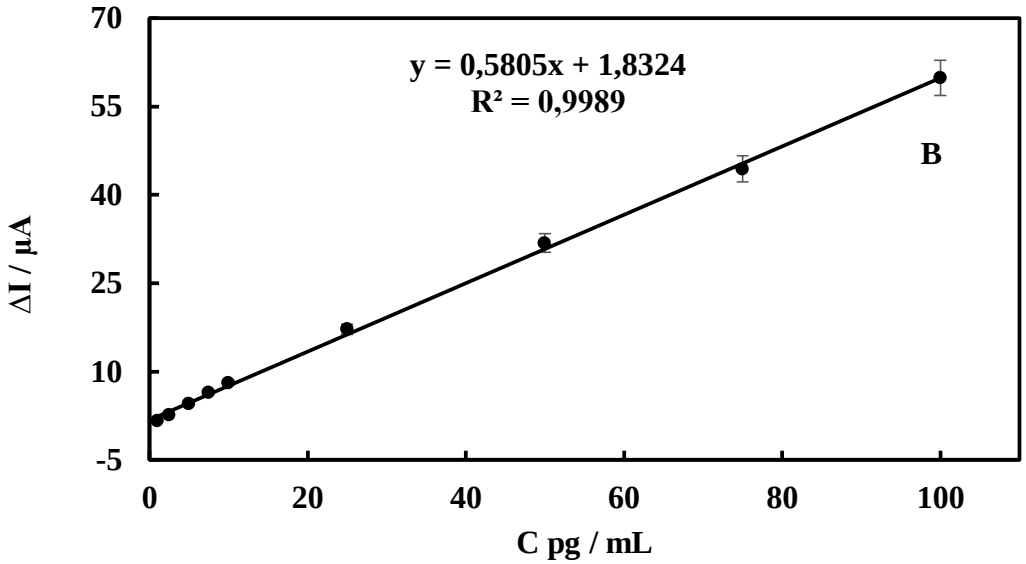
Şekil 4.6(A) ve Şekil 4.6(B)'de verilen her iki grafik ve Çizelge 4.5 incelendiğinde; HE_4 antijeninin inkübasyon süresi 15 dk'dan 30 dk'ya çıkarıldığında eğim (duyarlık) ve korelasyon katsayısı değerleri belirgin derecede artarken, 45 dk'dan sonraki inkübasyon sürelerinde bu değerler azalmaktadır. HE_4'ün düşük sürede inkübasyona bırakılmasının sonucunda yüzeye yeterince bağlanamadığı gözlemlenmiştir. 60 dk inkübasyon süresinde ise yüzeyde bozulmalar başladığı için bu durumun biyomarker ölçüm sinyallerine de yansıdığı görülmüştür. Korelasyon katsayısı değeri 1'e en yakın olan grafik de HE_4'ün 30 dk inkübasyona bırakılmasıyla elde edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e en yakın olması, akımın konsantırasyona bağlı en doğrusal artışının bu şartlarda gerçekleştiğini göstermektedir. Buradan anlaşılmaktadır ki; HE_4 immünosensörleri 30 dakika inkübasyona bırakıldığında immünosensörden daha yüksek performans elde edilmiştir. Sonuç olarak; HE_4 için optimum antijen immobilizasyon süresi 30 dk olarak belirlenmiştir. Literatürde de antikor-antijen arasında gerçekleşen immünoreaksiyon genellikle 30 ile 60 dk arasındadır (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd, 2017). Bulunan sonuçlar literatür ile de uyumludur. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında, 33,33 µg/mL konsantrasyonundaki Anti-HE_4'ler 45 dk, HE_4'ler ise 30 dk inkübe edilerek HE_4 immünosensörleri hazırlanmıştır.

4.5. HE_4 İmmünosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu

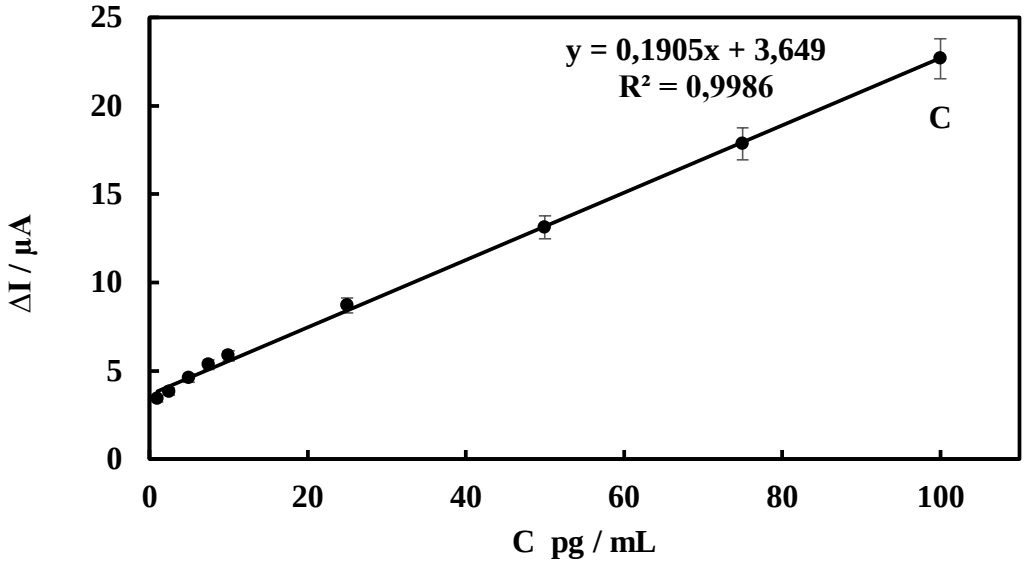
HE_4'ün SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörleri ile elektrokimyasal tayini; içerisinde 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisi bulunan elektrokimyasal hücrede 1-100 pg/mL, 0,01-10 ng/mL, 10-50 ng/mL, 50-500 ng/mL HE_4 konsantrasyonu lineer aralıklarında EIS, DPV ve SWV yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. EIS, DPV ve SWV ile elde edilen direnç ve akım datalarına göre çizilen grafikler Şekil 4.7(A, B, C)'de verilmiştir.



Şekil 4.7(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 1 ile 100 pg/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



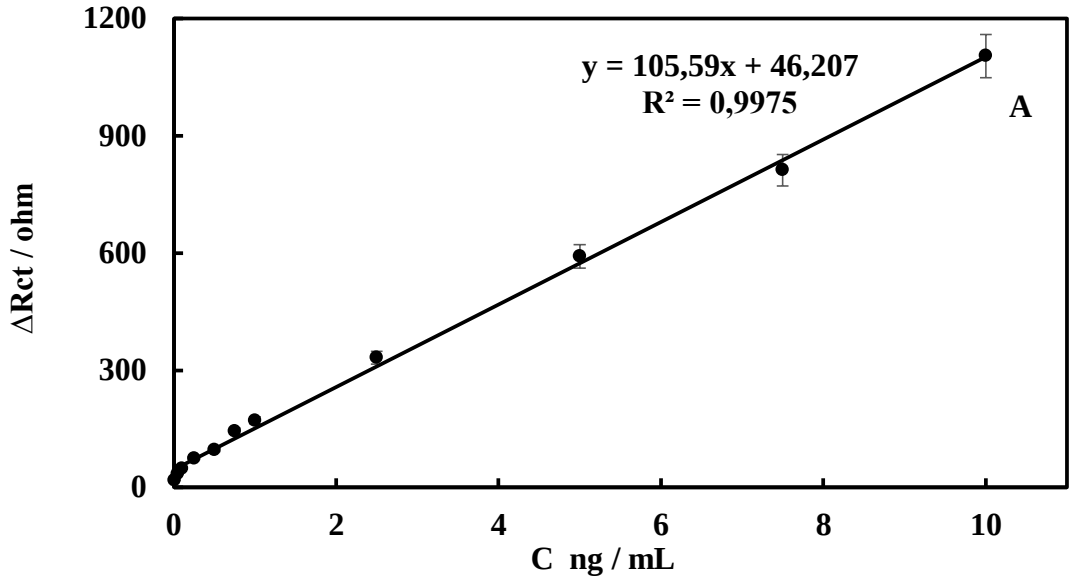
Şekil 4.7(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 1 ile 100 pg/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



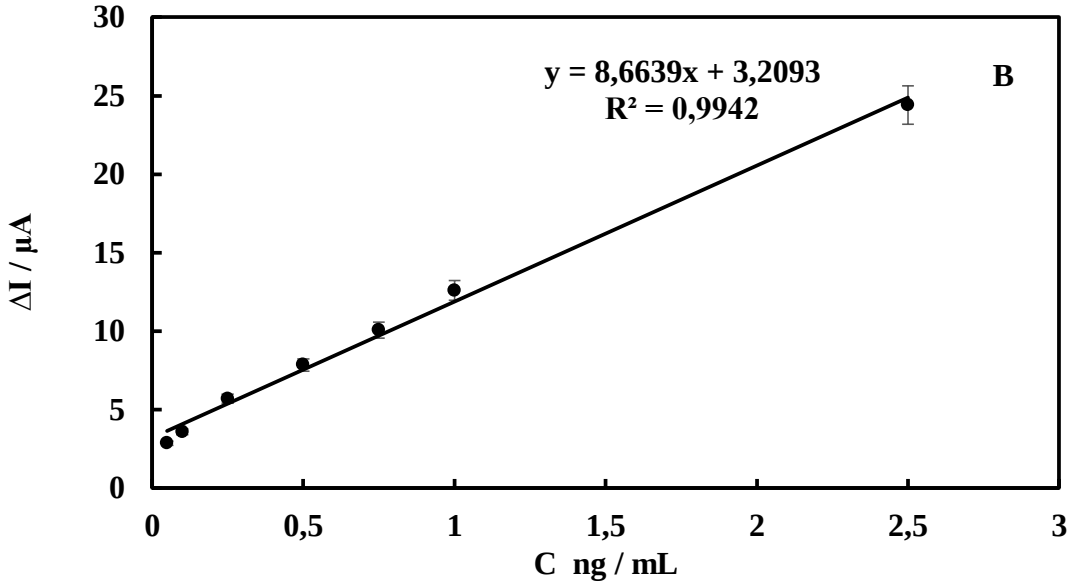
Şekil 4.7(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 1 ile 100 pg/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.7 (A, B, C) grafiklerinde HE_4'ün elektrokimyasal tayini için 1-100 pg/mL konsantrasyon aralığında EIS'den elde edilen direnç, SWV ve DPV'den elde edilen pik akımı değerlerinin değişimi verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, HE_4 ilavesiyle zamanla EIS için dirençte, SWV ve DPV için akımda bir artış olduğu görülmüştür. HE_4 konsantrasyonu ile artan akım ve direnç değerleri kullanılarak

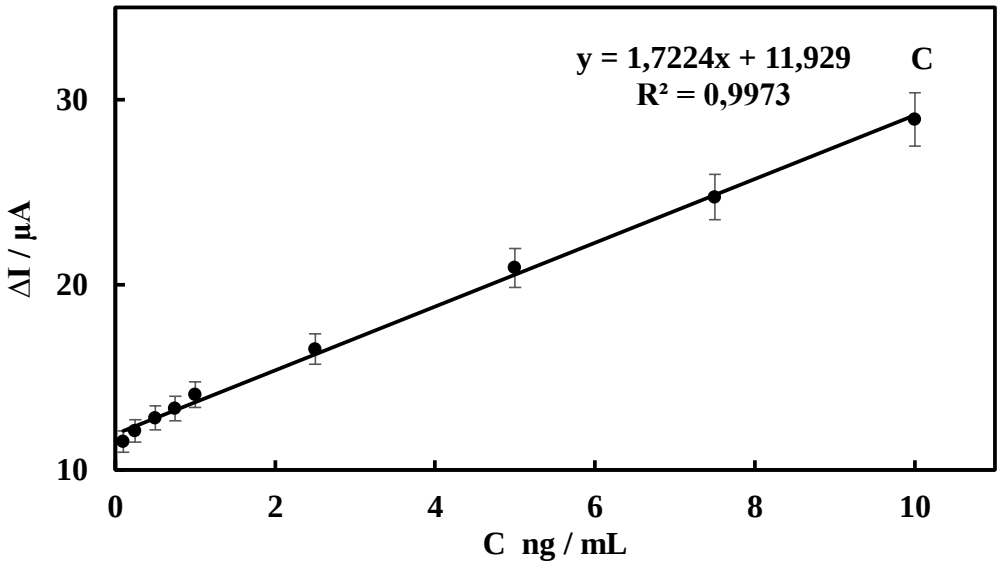
HE_4'ün kantitatif tayini yapılmıştır. HE_4 konsantrasyonunun artması ile direnç ve akım değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

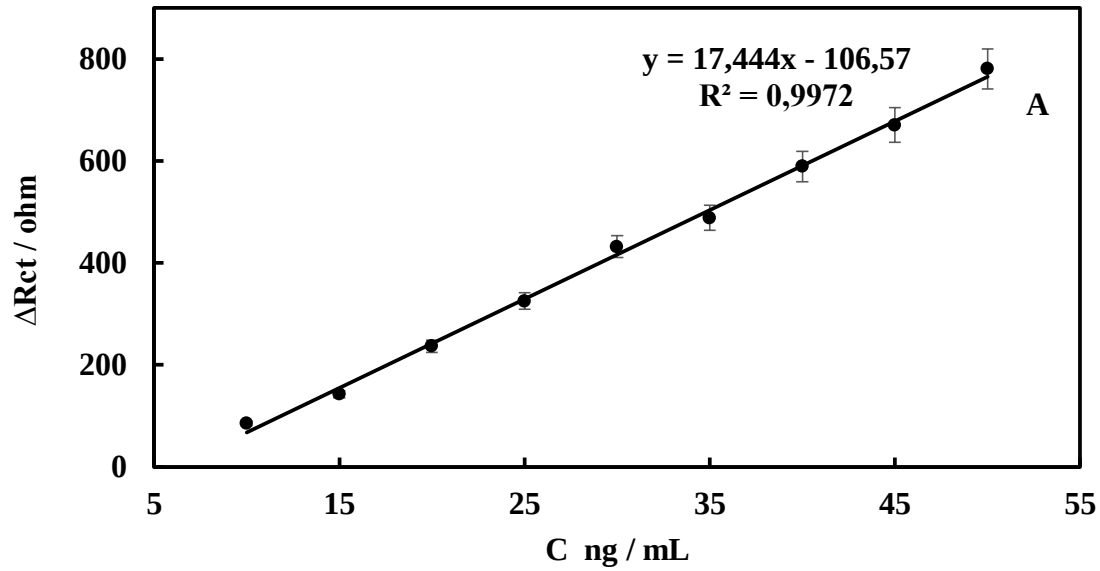


Şekil 4.8(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün 0,05 ile 2,5 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

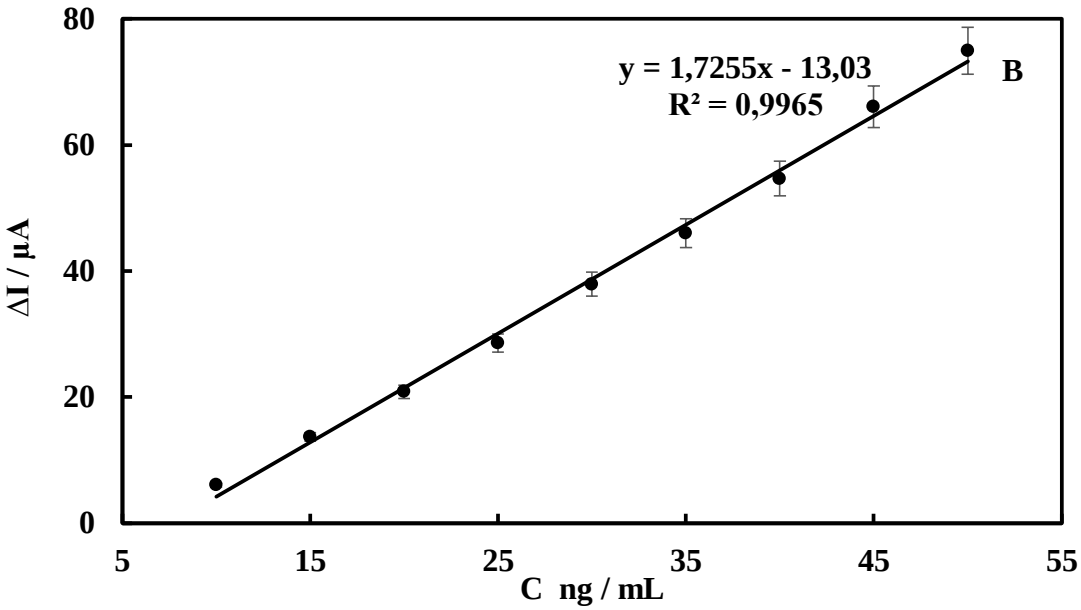


Şekil 4.8(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 0,1 ile 10 ng/mL aralığında artan HE_4 derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

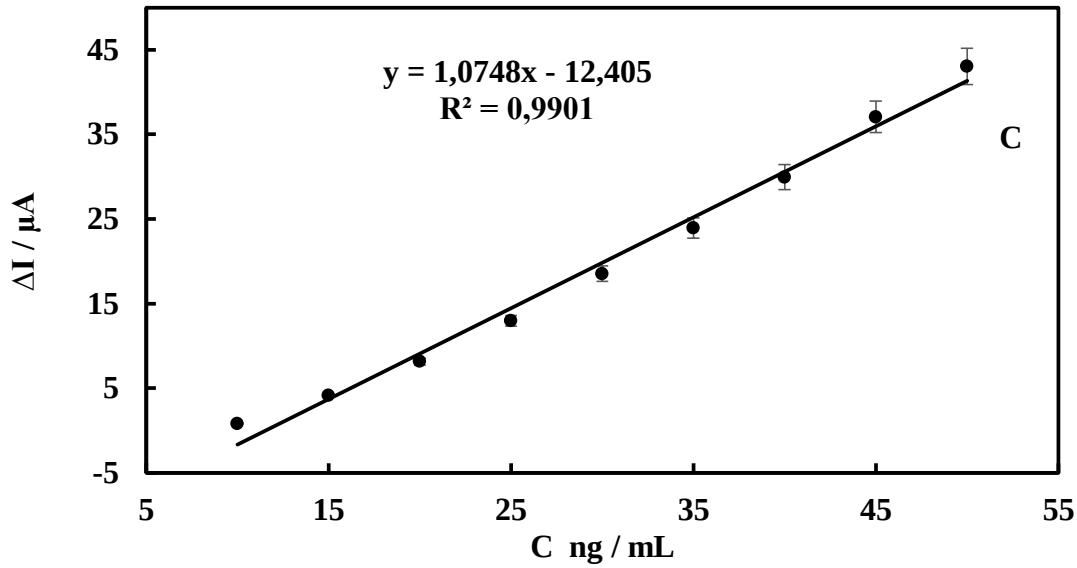
Şekil 4.8 (A, B, C) grafiklerinde HE_4'ün elektrokimyasal tayini için 0,01-10 ng/mL konsantrasyon aralığında EIS'den elde edilen direnç; 0,1-10 ng/mL konsantrasyon aralığında SWV'den ve 0,05-2,5 ng/mL konsantrasyon aralığında DPV'den elde edilen pik akımı değerlerinin değişimi verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, HE_4 ilavesiyle zamanla EIS için dirençte, SWV ve DPV için akımda bir artış olduğu görülmüştür. HE_4 konsantrasyonu ile artan akım ve direnç değerleri kullanılarak HE_4'ün kantitatif tayini yapılmıştır. HE_4 konsantrasyonunun artması ile direnç ve akım değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.9(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 10 ile 50 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

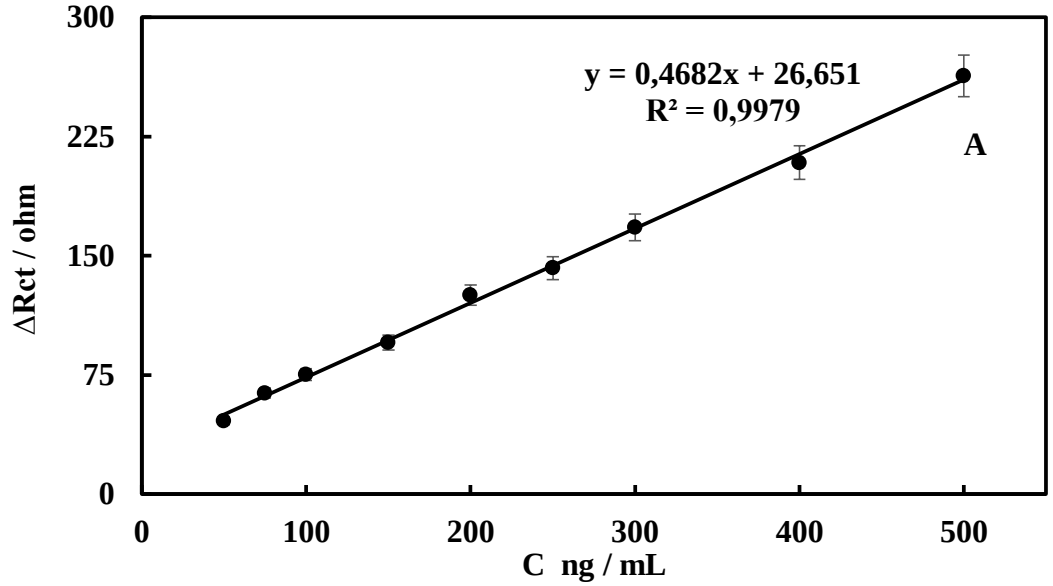


Şekil 4.9(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 10 ile 50 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

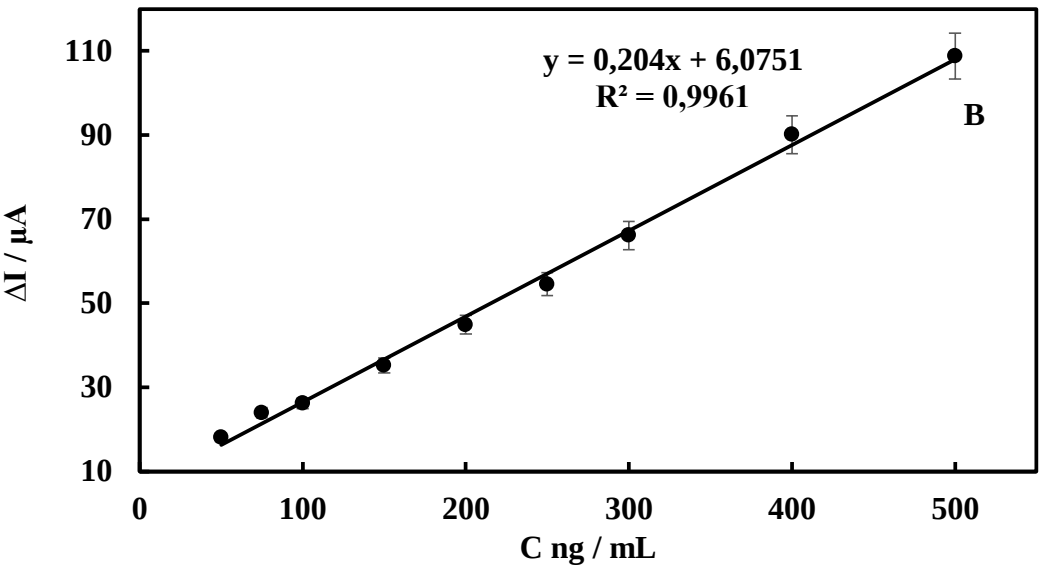


Şekil 4.9(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 10 ile 50 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

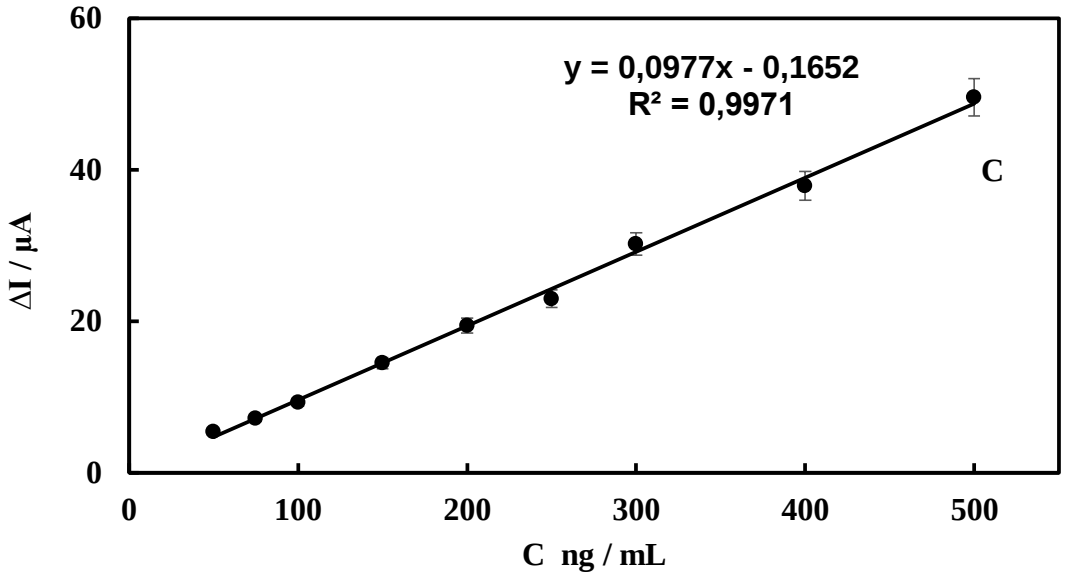
Şekil 4.9 (A, B, C) grafiklerinde HE_4'ün elektrokimyasal tayini için 10-50 ng/mL konsantrasyon aralığında EIS'den elde edilen direnç, SWV ve DPV'den elde edilen pik akımı değerlerinin değişimi verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, HE_4 ilavesiyle zamanla EIS için dirençte, SWV ve DPV için akımda bir artış olduğu görülmüştür. HE_4 konsantrasyonu ile artan akım ve direnç değerleri kullanılarak HE_4'ün kantitatif tayini yapılmıştır. HE_4 konsantrasyonunun artması ile direnç ve akım değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.10(A). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 50 ile 500 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı EIS'den elde edilen direnç değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



Şekil 4.10(B). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE4 immünosensöründe HE4'ün 50 ile 500 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).



Şekil 4.10(C). SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensöründe HE_4'ün 50 ile 500 ng/mL aralığında artan HE_4 konsantrasyonuna karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.10 (A, B, C) grafiklerinde HE_4'ün elektrokimyasal tayini için 50-500 ng/mL konsantrasyon aralığında EIS'den elde edilen direnç, SWV ve DPV'den elde edilen pik akımı değerlerinin değişimi verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, HE_4 ilavesiyle zamanla EIS için dirençte, SWV ve DPV için akımda bir artış olduğu görülmüştür. HE_4 konsantrasyonu ile artan akım ve direnç değerleri kullanılarak HE_4'ün kantitatif tayini yapılmıştır. HE_4 konsantrasyonunun artması ile direnç ve akım değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.

HE_4 immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu yapılmış ve ana Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. HE_4 immünosensörü için analitiksel karakterizasyon verileri.

Metot	LR	Duyarlık	LOD	LOQ	r
EIS	1 – 100 pg/mL	2180 ohm.mL.ng^{-1}	0,002 ng/mL	0,007 ng/mL	0,9976
	0,01 – 10 ng/mL	105,60 ohm.mL.ng^{-1}	0,14 ng/mL	0,46 ng/mL	0,9987
	10 – 50 ng/mL	17,44 ohm.mL.ng^{-1}	1,17 ng/mL	3,91 ng/mL	0,9986
	50 – 500 ng/mL	8,33 ohm.mL.ng^{-1}	8,33 ng/mL	27,78 ng/mL	0,9990
DPV	1 – 100 pg/mL	580 µA.mL.ng^{-1}	0,001 ng/mL	0,003 ng/mL	0,9992
	0,05 – 2,5 ng/mL	8,66 µA.mL.ng^{-1}	0,058 ng/mL	0,194 ng/mL	0,9971
	10 – 50 ng/mL	1,73 µA.mL.ng^{-1}	1,32 ng/mL	4,39 ng/mL	0,9982
	50 – 500 ng/mL	0,204 µA.mL.ng^{-1}	11,34 ng/mL	37,79 ng/mL	0,9980
SWV	1 – 100 pg/mL	190 µA.mL.ng^{-1}	0,002 ng/mL	0,004 ng/mL	0,9993
	0,1 – 10 ng/mL	1,69 µA.mL.ng^{-1}	0,164 ng/mL	0,545 ng/mL	0,9986
	10 – 50 ng/mL	1,07 µA.mL.ng^{-1}	2,22 ng/mL	7,39 ng/mL	0,9950
	50 – 500 ng/mL	0,098 µA.mL.ng^{-1}	9,87 ng/mL	32,89 ng/mL	0,9980

Çizelge 4.6'da 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 0,99'un üzerinde yani 1'e çok yakındır. Bu da, çalışılan aralıklarda akım ve direncin konsantrasyona bağlı artışının oldukça doğrusal bir şekilde orantılı olduğunu göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışığında; geliştirilen SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörü ile yapılacak HE_4 analizlerinde, HE_4'ün geniş bir konsantrasyon aralığında taranabileceği anlaşılmıştır.

EIS metodundan elde edilen analitiksel karakterizasyon verilerinde; 1-100 pg/mL lineer aralığında SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörünün duyarlılığı (2180 ohm.mL.ng^{-1}) en yüksek değerindedir. Ayrıca tespit limiti ve tayin sınırı verilerinin de (sırasıyla 0,002 ng/mL ve 0,007 ng/mL) en düşük değere ulaştığı görülmektedir.

DPV metodundan elde edilen analitiksel karakterizasyon verilerinde; 1-100 pg/mL lineer aralığında SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörünün duyarlılığı (580 µA.mL.ng^{-1}) en yüksek değerindedir. Ayrıca tespit limiti ve tayin sınırı verilerinin de (0,001 ng/mL ve 0,003 ng/mL) en düşük değere ulaştığı görülmektedir.

SWV metodundan elde edilen analitiksel karakterizasyon verilerinde; 1-100 pg/mL lineer aralığında SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörünün duyarlılığı (190 $\mu A.mL.ng^{-1}$) en yüksek değerindedir. Ayrıca tespit limiti ve tayin sınırı verilerinin de (0,002 ng/mL ve 0,004 ng/mL) en düşük değere ulaştığı görülmektedir.

Korelasyon katsayısı değerlerine bakıldığında; tüm sonuçlarda 0,99'un üzerinde ve 1'e çok yakındır. Bu da, çalışılan aralıklarda, akım ve direncin konsantrasyona bağlı artışının oldukça doğrusal bir şekilde orantılı olduğunu göstermektedir

Hazırlanan HE_4 immünosensörünün tekrarlanabilirliği 50 ng/mL HE_4 derişiminde üç ayrı yöntemle (EIS, SWV, DPV) test edilmiş ve her bir yöntem için bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri hesaplanarak Çizelge 4.7'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, standart sapmalar %5'in altındadır. Bu yüzden tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değerleri, 10 tekrara kadar HE_4'ün tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. HE_4 immünosensörünün tekrarlanabilirlik testi sonuçları.

Metot	**RSD**
EIS	% 4,09 (n=10), 50 ng/mL
DPV	% 4,29 (n=10), 50 ng/mL
SWV	% 1,95 (n=10), 50 ng/mL

Son yıllarda, HE_4 biyosensörü üretimine dair yapılan bazı çalışmalar ile bu çalışmada gerçekleştirilen HE_4 immünosensörünün performans karşılaştırması Çizelge 4.8'de verilmiştir.

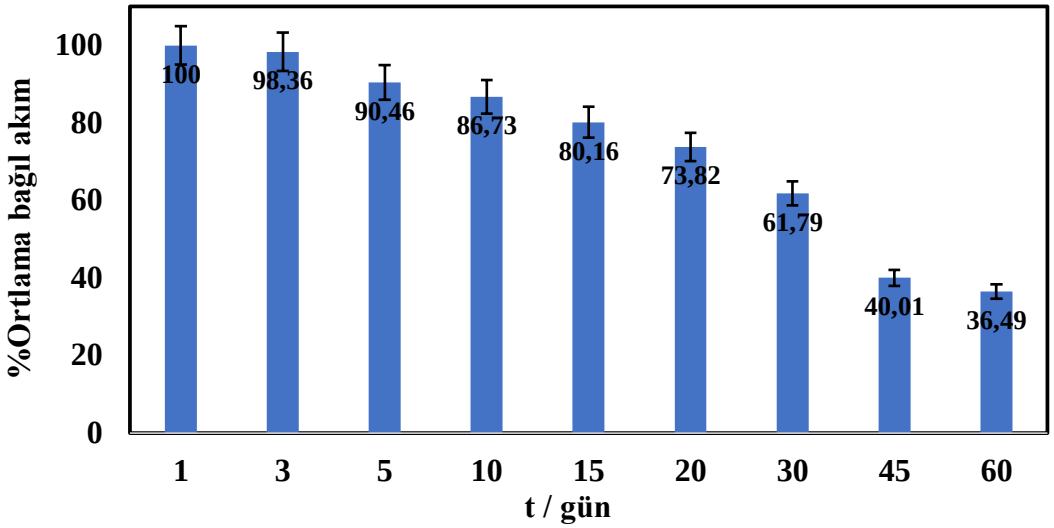
Çizelge 4.8. Literatürde hazırlanan HE_4 immünosensörleri ile bu çalışmada eliştirilen HE_4 immünosensörünün performans karşılaştırması

ELEKTROT	ÖLÇÜM YÖNTEMİ	TESPİT LİMİTİ	LİNEER ARALIK	DUYARLIK	UYGULAMA KARARLILIĞI	ANALİZ YÖNTEMİ	REFERANS
FTO	CV, EIS, DPV	1.21 µg/mL	10 µg/mL - 65 µg/mL.	-	30 gün	Elektrokimyasal kuantum nokta temelli manyeto-immünoanaliz	Qu ve Yu, 2018
GCE	CV, EIS	0,33 pg/mL	1 pM-50 nM	-	20 gün	Sandviç tipi amperometrik immünoanaliz	Yan et al. 2019
SPE	DPV	3,5 pM	3,5-29,2 pM	-	60 gün	Manyetik immünoanaliz	Bianchi et al. 2020
SPCE	EIS	2,16 pg/mL	1 – 100 pg/mL	2,18 ohm.mL.pg^{-1}	60 gün	Elektrokimyasal immünoanaliz	Bu çalışma*
		0,14 ng/mL	0,01 – 10 ng/mL	105,60 ohm.mL.ng^{-1}			
		1,17 ng/mL	10 – 50 ng/mL	17,44 ohm.mL.ng^{-1}			
		8,33 ng/mL	50 – 500 ng/mL	8,33 ohm.mL.ng^{-1}			
SPCE	DPV	1,04 pg/mL	1 – 100 pg/mL	0,58 µA.mL.pg^{-1}	60 gün	Elektrokimyasal immünoanaliz	Bu çalışma*
		0,058 ng/mL	0,05 – 2,5 ng/mL	8,66 µA.mL.ng^{-1}			
		1,32 ng/mL	10 – 50 ng/mL	1,73 µA.mL.ng^{-1}			
		11,34 ng/mL	50 – 500 ng/mL	0,204 µA.mL.ng^{-1}			
SPCE	SWV	1,16 pg/mL	1 – 100 pg/mL	0,19 µA.mL.pg^{-1}	60 gün	Elektrokimyasal immünoanaliz	Bu çalışma*
		0,164 ng/mL	0,1 – 10 ng/mL	1,69 µA.mL.ng^{-1}			
		2,22 ng/mL	10 – 50 ng/mL	1,07 µA.mL.ng^{-1}			
		9,87 ng/mL	50 – 500 ng/mL	0,098 µA.mL.ng^{-1}			

SPE : Yüzey baskılı elektrot
GCE : Camsı karbon elektrot,
DPV : Diferansiyel puls voltametrisi,
SPCE : Yüzey baskılı karbon elektrot
FTO : Flor katkılı kalayoksit elektrot,
CV : Döngüsel voltametri ,
EIS : Elektrokimyasal empedans spektroskopisi.

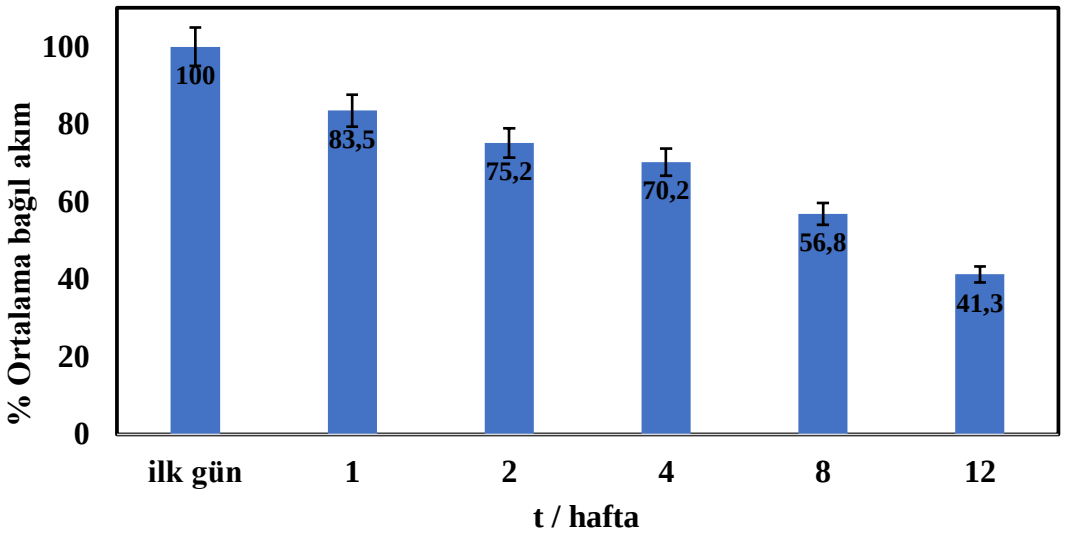
Çizelge 4.8 incelendiğinde; tez kapsamında geliştirilen HE_4 immünosensörünün diğerlerinden daha düşük tespit limitine imkan verdiği (bugüne kadar ilk defa pikogram seviyesinde), yüksek duyarlığa sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca geliştirdiğimiz HE_4 immünosensörü ile HE_4'ün, diğer biyosensörlere göre çok daha geniş bir konsantrasyon aralığında taranabildiği göze çarpmaktadır. Diğer çalışmalarda uygulama kararlılığı olarak genelde daha kısa süreler söz konusuyken, bu çalışmada HE_4 immünosensörünün uygulama kararlılığı 60 gün olarak belirlenmiştir. HE_4 analizini elektrokimyasal olarak yapan ve bu parametrelere sahip olarak geliştirdiğimiz HE_4 immünosensörü birçok yönden avantaj sağladığı için, bugüne dek hazırlanan biyosensörler arasında çok değerli ve çok önemli bir yere sahiptir.

Optimum şartlarda hazırlanan HE_4 immünosensörünün uygulama kararlılığı, 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında DPV ve SWV metotları kullanılarak pik akımlarının ölçülmesi ile test edilmiştir. Hazırlanan immünosensörler +4°C'de muhafaza edilmiştir. DPV ve SWV sonuçlarına göre % ortalama bağıl akımlar hesaplanmış ve % ortalama bağıl akım değerlerinin ortalamasına karşı gün grafiği çizilerek Şekil 4.11'de verilmiştir. Başlangıçta HE_4 immünosensörünün voltametrik cevabı 3. günün sonunda %1,64, 5. günün sonunda %9,54, 10. günün sonunda %13,27, 15. günün sonunda 19,84, 20. günün sonunda %26,18, 30. günün sonunda %38,21, 45. günün sonunda %59,99 ve 60. günün sonunda ise %63,51 oranında azalmıştır. HE_4 immünosensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 60. güne kadar HE_4 için voltametrik yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir biyosensör için, bu uygulama kararlılığının iyi olduğu ve biyosensör formülasyonunda bulunan RGO, PTH ve AuNP'nin biyosensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir (Lai et al., 2019).



Şekil 4.11. HE_4 immünosensörünün 50 ng/mL HE_4 konsantrasyonuna karşı elde edilen yüzde ortalama bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Optimum çalışma şartlarında geliştirilen HE_4 immünosensörünün depolama kararlığını belirlemek için, BSA basamağına kadar hazırlanan immünosensörler -20^oC'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu immünosensörler ile 12 hafta boyunca DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl çözeltisinde 4'er tekrarlı ölçüm ile HE_4'ün voltametrik tayini yapılmıştır. HE4 immünosensörü hazırlandığı ilk gün, daha sonra ise sırasıyla; 1 hafta, 2 hafta, 4 hafta, 8 hafta, 12 hafta depolama sürelerinde test edilmiştir. DPV ve SWV sonuçlarına göre % bağıl akımlar hesaplanmış ve % bağıl akım değerlerinin ortalamasına karşı hafta grafiği çizilerek Şekil 4.12'de verilmiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörünün 12. haftaya kadar HE_4'e karşı yanıt verdiği görülmektedir. % ortalama bağıl akım verileri incelendiğinde HE_4'ün ilk gün analizine kıyasla immünosensörün voltametrik cevabı 1. haftanın sonunda %16,5, 2. haftanın sonunda %24,8, 4. haftanın sonunda %28,8, 8. haftanın sonunda %43,2 ve 12. haftanın sonunda %58,7 oranında azalmıştır. HE_4 immünosensörünün 12. haftanın sonunda HE_4'e karşı yanıt verdiği görülmüştür.

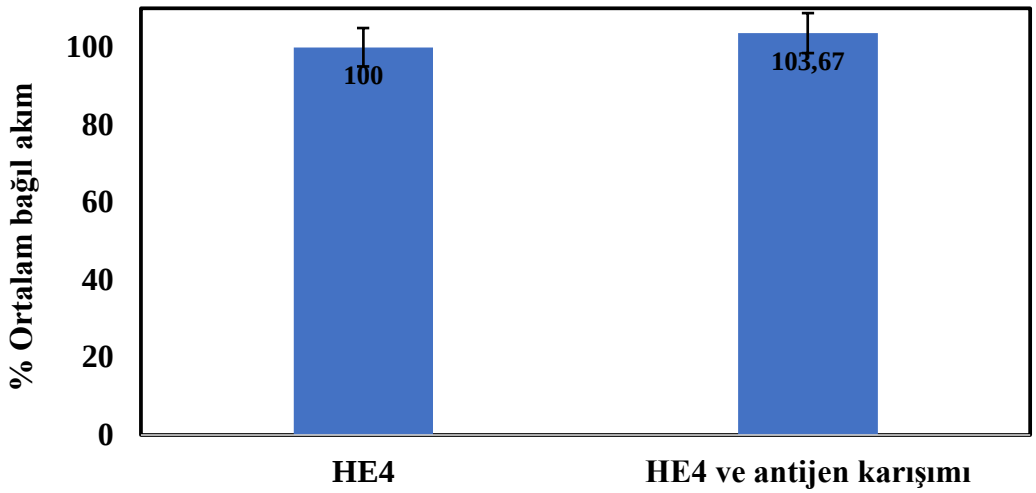


Şekil 4.12. HE_4 immünosensörünün 50 ng/mL HE_4 konsantrasyonuna karşı elde edilen ortalama yüzde bağıl akım değerleri-hafta sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

4.6. Seçicilik Testi

HE_4 immünosensörünün HE_4'ün elektrokimyasal tayininde kullanılmasında, girişim yapabilecek antijenler olan CA 125, 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. Hazırlanan immünosensörlere sadece 20 ng/mL HE_4 antijenini içeren çözelti ile pH 7 fosfat tamponuyla tek çözeltide hazırlanan her biri 20 ng/mL konsantrasyonda alınan antijenleri içeren çözelti damlatılmıştır. 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl) çözeltisinde SWV ve DPV ile üçer tekrarlı olmak üzere toplam 6 ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümlerden elde edilen datalara karşı % bağıl akımlar hesaplanmış ve % bağıl akımların ortalaması alınarak grafik çizilmiştir. Şekil 4.13'teki 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 HE_4'ün analizini voltametrik yöntemle yapılmasının en önemli sebebi voltametrik yöntemin seçiciliğinin yüksek olmasıdır. HE_4'ün elektrokimyasal analizi, girişim yapabilecek

diğer 9 antijenin varlığında voltametrik olarak yapılmıştır. Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz HE_4 immünosensörünün seçiciliğinin yüksek olduğunu gösterir (Felix ve Angnes, 2018).



Şekil 4.13. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörü ile HE_4 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

Geliştirilen HE_4 immünosensörleri yapay kan serumu (insan kan serumu) numunelerindeki HE_4'ün analizinde kullanılmıştır. Bu deneyde, elektrotlar BSA basamağına kadar optimum şartlarda hazırlanmış ve son basamak için HE_4 içeren yapay kan serumu numunesi kullanılmıştır. Sigma firmasından satın alınan H6914 kodlu insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7.4 tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonlarda (50 pg/mL, 2 ng/mL, 25 ng/mL) HE_4 ilave edilerek HE_4 içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. Bilinen miktarda HE_4 içeren kan serumu numunelerinin elektrokimyasal tayini, optimum şartlar kullanılarak HE_4 immünosensörleri ile voltametrik olarak yapılmıştır. Ölçümler her bir konsantrasyon örneği için EIS ile ikişer, DPV ve SWV ile üçer defa alınmış ve ölçümlerin ortalaması, % geri kazanım ve % hata değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.9'da yapay kan serumu numunelerinin analiz sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 4.9. Yapay kan serumu (insan kan serumu) örneklerinde HE_4 analizi.

Metot	**Eklenen HE_4**	**Hesaplanan HE_4**	**% Geri kazanım**	**% Hata**
EIS	50 pg/mL	47,63 pg/mL	95,26	4,74
	2,0 ng/mL	2,09 ng/mL	104,5	4,5
	25 ng/mL	24,12 ng/mL	96,48	3,52
DPV	50 pg/mL	48,84 pg/mL	97,68	2,32
	2,0 ng/mL	2,014 ng/mL	100,7	0,7
	25 ng/mL	25,71 ng/mL	102,84	2,84
SWV	50 pg/mL	48,91 pg/mL	97,82	2,18
	2,0 ng/mL	2,032 ng/mL	101,6	1,6
	25 ng/mL	24,51 ng/mL	98,04	1,96

Çizelge 4.9'daki değerler incelendiğinde; yapay kan serumu örneklerinde HE_4 analizinin üç farklı yöntemle (EIS, DPV, SWV) ve her bir yöntemde üç farklı HE_4 derişiminde (50 pg/mL, 2,0 ng/mL, 25 ng/mL) yapıldığı görülmektedir. Analiz sonuçları incelendiğinde düşük hata oranlarıyla HE_4'ün geri kazanımının yüksek olduğu yani yapılan analizlerin başarılı olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

1. SPCE'lerin yüzeyi CV ile temizlendikten sonra RGO ile modifiye edilmiş ve SEM ile karakterize edilmiştir. 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.

2. SPCE/RGO'lar üzerinde önce TH'in elektrokimyasal polimerizasyonu yapılmış ve sonrasında AuNP ile modifiye edilerek SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodu elde edilmiştir. Tiyoninin elektropolimerizasyonu ile elektroaktif bir film tabakası oluşmuştur. Formülasyona eklenen AuNP, biyosensör arayüzünün yapısına katılarak PTH ile kararlı bir film tabakası oluşturmuştur (Lai et al., 2018). Elde edilen SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodunun CV, DPV, SWV ve EIS metotları ile elektrokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodunda CV, DPV, SWV ve EIS metotlarından elde edilen sonuçlara göre pik akım ve direnç değerlerinde artış, elektronik iletkenliğinde yükselme olduğu tespit edilmiştir. Elektrot formülasyonunda RGO'nun bulunması, elektroaktif yüzey alanını ve böylelikle de elektronik iletkenliği artırmıştır. RGO, PTH ve AuNP materyallerinin elektrot formülasyonunda birlikte yer alması sinerjik bir etki göstermiştir. Bu ise, elektrodun elektroaktif yüzey alanını, dolayısıyla da elektronik iletkenliği ve elektrodun tersinirliğini artırmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur (Lai et al., 2014).

3. SPCE/RGO/PTH/AuNP elektrodu, immünosensörün transduser kısmını oluşturmaktadır. Hazırlanan transduser elektrotlarının yüzeyi 3-MPA ve EDC-NHS ile aktive edilmiş ve bu aktivasyon Anti-HE_4'ün elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanmasını sağlamıştır. Daha sonrasında, elektrodun yüzeyine bloklama ajanı olarak kullanılan BSA'nın modifiye edilmesi sonucu; dirençte belirgin bir artış ve anodik pik akımlarında azalış olmuştur ki bu da modifikasyonun gerçekleştiğini gösterir. Son basamakta, elektrodun HE_4 antijeniyle tutuklanması ile dirençte yüksek

bir miktarda azalma olmuş ve anodik pik akımlarında da azalma görülmüştür. Bu da HE_4 antijeninin Anti HE_4 antikoru ile bağlandığını ve immobilizasyonun gerçekleştiğini göstermiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA/HE_4 immünosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu için, EDC-NHS, Anti-HE_4, Anti-HE_4/BSA ve Anti-HE_4/BSA/HE_4 basamaklarında CV, DPV, SWV ve EIS metotları ile ölçümler alınmıştır. Her basamakta azalan pik akımı ve artan direnç değerleri her basamağın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir (Ning et al., 2013, Sezgintürk, 2011, Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın, E. B. vd, 2020, Demirbakan ve Sezgintürk, 2020).

4. Farklı Anti-HE_4 konsantrasyonlarında hazırlanmış SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS ve DPV cevaplarına etkileri incelenmiştir. Grafiklerde verilen doğru denklemleri göz önüne alındığında, her iki grafikte de en yüksek eğim (duyarlık) ve korelasyon katsayısının (r) en düşük konsantrasyon değeri olan 33,33 µg/mL Anti-HE_4 ile hazırlanan immünsensörlerle elde edildiği görülmüştür. Tüm bu bilgiler ışığında, Anti-HE_4 için optimum antikor konsantrasyon değeri 33,33 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

5. Farklı Anti-HE_4 inkübasyon sürelerinde hazırlanmış SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörlerinin, farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS ve DPV cevaplarına etkileri incelenmiştir. Grafiklerde verilen doğru denklemleri göz önüne alındığında, her iki grafikte de en yüksek eğim (duyarlık) ve korelasyon katsayısının (r) Anti-HE_4'ün 45 dk boyunca inkübasyonuyla hazırlanan immünsensörlerle elde edildiği görülmektedir. Sonuç olarak; Anti-HE_4 için optimum antikor immobilizasyon süresi 45 dk olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Literatürde de antikorların elektrot yüzeyine immobilizasyonu genellikle 30 ile 60 dk arasındadır. Bulunan sonuçlar literatür ile de uyumludur (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd, 2017).

6. Farklı HE_4 inkübasyon sürelerinde hazırlanmış SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immunosensörlerinin, farklı konsantrasyonlardaki HE_4 antijenine karşı EIS ve DPV cevaplarına etkileri incelenmiştir. Grafiklerde verilen doğru denklemleri göz

önüne alındığında, her iki grafikte de en yüksek eğim (duyarlık) ve korelasyon katsayısının (r) HE_4 antijeninin 30 dk boyunca inkübasyonuyla hazırlanan immünsensörlerle elde edildiği görülmektedir. Sonuç olarak; HE_4 için optimum antijen immobilizasyon süresi 30 dk olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Literatürde de antikor-antijen arasında gerçekleşen immünoreaksiyon genellikle 30 ile 60 dk arasındadır (Aydın ve Sezgintürk, 2017, Aydın vd, 2017).

7. HE_4 immünsensörünün analitiksel karakterizasyonları yapılmış, karakterizasyon parametreleri EIS, DPV ve SWV metotlarıyla yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. HE_4'ün SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4 immünosensörleri ile 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 için 1 – 100 pg/mL lineer aralığında tespit limiti 0,002 ng/mL, tayin sınırı 0,007 ng/mL; 0,01 – 10 ng/mL lineer aralığında tespit limiti 0,14 ng/mL, tayin sınırı 0,46 ng/mL; 10 – 50 ng/mL lineer aralığında tespit limiti 1,17 ng/mL, tayin sınırı 3,91 ng/mL; 50 – 500 ng/mL lineer aralığında tespit limiti 8,33 ng/mL, tayin sınırı 27,78 ng/mL'dir.

DPV için 1 – 100 pg/mL lineer aralığında tespit limiti 0,001 ng/mL, tayin sınırı 0,003 ng/mL; 0,05 – 2,5 ng/mL lineer aralığında tespit limiti 0,058 ng/mL, tayin sınırı 0,194 ng/mL; 10 – 50 ng/mL lineer aralığında tespit limiti 1,32 ng/mL, tayin sınırı 4,39 ng/mL; 50 – 500 ng/mL lineer aralığında tespit limiti 11,34 ng/mL, tayin sınırı 37,79 ng/mL'dir.

SWV için; 1 – 100 pg/mL lineer aralığında; tespit limiti 0,002 ng/mL, tayin sınırı 0,004 ng/mL; 0,1 – 10 ng/mL lineer aralığında; tespit limiti 0,164 ng/mL, tayin sınırı 0,545 ng/mL; 10 – 50 ng/mL lineer aralığında; tespit limiti 2,22 ng/mL, tayin sınırı 7,39 ng/mL; 50 – 500 ng/mL lineer aralığında; tespit limiti 9,87 ng/mL, tayin sınırı 32,89 ng/mL'dir.

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 bilgiler ışığında; geliştirilen SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörü ile yapılacak HE_4 analizlerinde, HE_4'ün geniş bir konsantrasyon aralığında taranabileceği anlaşılmıştır.

HE_4 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 %4,09, DPV için %4,29, SWV için %1,95. Tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değerleri, 10 tekrara kadar HE_4'ün tayininin iyi olduğunu göstermiştir.

8. Optimum şartlarda hazırlanan HE_4 immünosensörünün uygulama kararlılığı, 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında DPV ve SWV metotları kullanılarak pik akımlarının ölçülmesi ile test edilmiştir. Hazırlanan immünosensörler +4°C'de muhafaza edilmiştir. DPV ve SWV sonuçlarına göre % ortalama bağıl akımlar hesaplanmış ve % ortalama bağıl akım değerlerinin ortalamasına karşı gün grafiği çizilerek Şekil 4.11'de verilmiştir. Başlangıçta HE_4 immünosensörünün voltametrik cevabı 3. günün sonunda %1,64, 5. günün sonunda %9,54, 10. günün sonunda %13,27, 15. günün sonunda 19,84, 20. günün sonunda %26,18, 30. günün sonunda %38,21, 45. günün sonunda %59,99 ve 60. günün sonunda ise %63,51 oranında azalmıştır. HE_4 immünosensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 60. güne kadar HE_4 için voltametrik yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir biyosensör için, bu uygulama kararlılığının iyi olduğu ve biyosensör formülasyonunda bulunan RGO, PTH ve AuNP'nin biyosensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir (Lai et al., 2019).

9. Optimum çalışma şartlarında geliştirilen HE_4 immünosensörünün depolama kararlığını belirlemek için, BSA basamağına kadar hazırlanan immünosensörler -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu immünosensörler ile 12 hafta boyunca DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl çözeltisinde 4'er tekrarlı ölçüm ile HE_4'ün voltametrik tayini yapılmıştır. HE_4 immünosensörü

hazırlandığı ilk gün, daha sonra ise sırasıyla; 1 hafta, 2 hafta, 4 hafta, 8 hafta, 12 hafta depolama sürelerinde test edilmiştir. DPV ve SWV sonuçlarına göre % bağıl akımlar hesaplanmış ve % bağıl akım değerlerinin ortalamasına karşı hafta grafiği çizilerek Şekil 4.12'de verilmiştir. SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörünün 12. haftaya kadar HE_4'e karşı yanıt verdiği görülmektedir. % ortalama bağıl akım verileri incelendiğinde HE_4'ün ilk gün analizine kıyasla immünosensörün voltametrik cevabı 1. haftanın sonunda %16,5, 2. haftanın sonunda %24,8, 4. haftanın sonunda %28,8, 8. haftanın sonunda %43,2 ve 12. haftanın sonunda %58,7 oranında azalmıştır. HE_4 immünosensörünün 12. haftanın sonunda HE_4'e karşı yanıt verdiği görülmüştür.

10. Geliştirilen HE_4 immünosensörleri yapay kan serumu (insan kan serumu) numunelerindeki HE_4'ün analizinde kullanılmıştır. Bu deneyde, elektrotlar BSA basamağına kadar optimum şartlarda hazırlanmış ve son basamak için HE_4 içeren yapay kan serumu numunesi kullanılmıştır. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonlarda (50 pg/mL, 2 ng/mL, 25 ng/mL) HE_4 ilave edilerek HE_4 içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. Kan serumu numunelerinin elektrokimyasal tayini, optimum şartlar kullanılarak HE_4 immünosensörleri ile voltametrik olarak yapılmıştır. Ölçümler her bir konsantrasyon örneği için EIS ile ikişer, DPV ve SWV ile alınmış, % geri kazanım ve % hata değerleri hesaplanmıştır.

EIS metoduyla yapılan analizlerde; 50 pg/mL için %4,74 hata oranıyla %95,26 geri kazanım, 2 ng/mL için %4,5 hata oranıyla %104,5 geri kazanım, 25 ng/mL için %3,52 hata oranıyla %96,48 geri kazanım tespit edilmiştir.

DPV metoduyla yapılan analizlerde; 50 pg/mL için %2,32 hata oranıyla %97,68 geri kazanım, 2 ng/mL için %0,7 hata oranıyla %100,7 geri kazanım, 25 ng/mL için %2,84 hata oranıyla %102,84 geri kazanım tespit edilmiştir.

SWV metoduyla yapılan analizlerde; 50 pg/mL için %2,18 hata oranıyla %97,82 geri kazanım, 2 ng/mL için %1,6 hata oranıyla %101,6 geri kazanım, 25 ng/mL için %1,96 hata oranıyla %98,04 geri kazanım tespit edilmiştir.

11. HE_4 immünosensörünün HE_4'ün elektrokimyasal tayininde kullanılmasında, girişim yapabilecek antijenler olan CA 125, 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. Yapılan ölçümlerden elde edilen datalara karşı % bağıl akımlar hesaplandı ve % bağıl akımların ortalaması alınarak grafik çizilmiştir. Grafik incelendiğinde, antijen karışımının çok az girişim yaptığı (%3,67 oranında) tespit edilmiştir. Bu da hazırlanan HE_4 immünosensörünün seçiciliğinin yüksek olduğunu gösterir (Felix ve Angnes, 2018).

Hazırlanan SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE_4/BSA immünosensörünün HE_4 tayininde göstermiş olduğu yüksek elektronik iletkenlik, duyarlık, stabilite, düşük tespit limiti, geniş lineer aralık ve gerçek numune analizleri sonuçları, bu immünosensörün HE_4'ün tayininde kullanımının uygun olduğunu göstermektedir. Amaçlandığı gibi hızlı, seçiciliği, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği yüksek bir elektrokimyasal immunosensör geliştirilmiştir. Ayrıca, bu immünosensörün üretim aşamasında kullanılan materyaller ile ekonomik, basit ve kolay uygulanabilir olması da, HE_4'ün tayininde avantaj sağlayan bir yeniliktir.

KAYNAKLAR

Ahmed A.A., Abdou A.M., 2019. Diagnostic Accuracy of CA 125 and HE_4 in Ovarian Carcinoma Patients And The Effect of Confounders on Their Serum Levels, Faculty of Medicine, Zagazig University, Zagazig City, Al Sharqia Governorate, 12p, Egypt.

Al-Ogaıdı I., Et Al., Dual Detection of Cancer Biomarker CA 125 Using Absorbance and Electrochemical Methods. Analyst, 2013. 138(19): P. 5647-53

Anık, Ü., 2012. Elektrokimyasal Biyosensörler. Telefoncu A. Ve Kılınç A. (Editörler), Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler. Ege Üniv. Matbaası, 97-107 Ss. İzmir.

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.

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.

Azevedo, A.M., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S. And Fonseca, L.P. 2005. Ethanol Biosensors Based On Alcohol Oxidase. Biosens Bioelectron, 21: 235-247.

Bakker, E., & Telting-Diaz, M. 2002. Electrochemical sensors. Analytical chemistry, 74(12), 2781-2800.

Bard, J., Faulkner, L.R. 2001. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. Analytical Chemistry, 73: 60-64.

Bianco, A., Cheng, H. M., Enoki, T., Gogotsi, Y., Hurt, R. H., Koratkar, N., Zhang, J. 2013. All in the Graphene Family- A Recommended Nomenclature for Two-Dimensional Carbon Materials. Carbon, 65, 1-6.

Bilgi, M., & Ayranci, 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.

Bond, A. M. 1980. Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, Inc., 518p., New York.

Borman, W. F. H. 1982. The Effect of Temperature and Humidity on the Long-Term Performance of Poly (Butylene Terephthalate) Compounds. Polymer Engineering and Science, Mid-October, 1982, Vol. 22, NO. 14

Bouzari Z., Rahimi H., Gholinia H., Yazdani S., Hajian-Tilaki K., Soleimani M.J., 2019. Cancer Antigen 125 (CA 125), Human Epididymis Protein 4 (HE_4), Risk of Malignancy Index (RMI), And Risk Of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as Diagnostic Tests in Ovarian Cancer, Internatıonal Journal of Cancer Management, 7p.

Čadková, M., Dvořáková, V., Metelka, R., Bílková, Z., & Korecká, L. 2015. Alkaline Phosphatase Labeled Antibody-Based Electrochemical Biosensor for Sensitive HE_4 Tumor Marker Detection. Electrochemistry Communications, 59, 1–4.

Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dornenanu, S.A., Ryabov, A.D. and Csoregi, E. 2004. Biosensors For Life Quality Design, Development and Applications. Sensors Actuat B, 102: 179-194.

Chen, M., Zhao, C., Xu, Q., Nie, B., Xu, L., Weng, S., & Lin, X. 2015. Electrochemical Immunoassay Based On Polythionine as the Signal Source for The Sensitive Detection of Carcinoma Embryonic Antigen. Analytical Methods, 7(24), 10339–10344.

Chen F., Shen J., Wang J., Cai P., Huang Y., 2018. Clinical Analysis of Four Serum Tumor Markers in 458 Patients with Ovarian Tumors: Diagnostic Value Of The Combined Use Of HE_4, CA 125, CA19-9, And CEA in Ovarian Tumors, Cancer Management and Research, P:1313-1318.

Demir T., 2016. Nikotinamit Adenin Dinükleotidin Nanoelektrokimyasal Davranışlarının Araştırılması, Hitit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 108s, Çorum.

Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. K. 2020. A novel ultrasensitive immunosensor based on disposable graphite paper electrodes for troponin T detection in cardiovascular disease. Talanta, 213, 120779.

Derkuş B., 2012. Anti-Miyelin Temelli Protein Tayini için İmpedimetrik İmmünosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 168s, Ankara.

D'Orazio, P. 2003. Biosensors in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta, 334(1-2), 41-69.

Dreyer, D. R., Todd, A. D., & Bielawski, C. W. 2014. Harnessing The Chemistry of Graphene Oxide. Chemical Society Reviews, 43(15), 5288. 14p.

Eda, G., Fanchini, G., & Chhowalla, M. 2008. Large-Area Ultrathin Films of Reduced Graphene Oxide as a Transparent and Flexible Electronic Material. Nature Nanotechnology, 3(5), 270-274.

Erdem, K.A., 2000. İlaç ve DNA (Biyo)Sensörlerinin Tasarımı Ve Uygulamaları, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Erdem M.M., 2010. Elektrokimyasal DNA Sensörü için Nanomalzemelere Dayalı Elektrot Materyallerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 112s, Aydın.

Felix, F. S., & Angnes, L. 2018. Electrochemical immunosensors–A powerful tool for analytical applications. Biosensors and Bioelectronics, 102, 470-478.

Gosser, D.K. 1994. Cyclic Voltammetry. Simulation and Analysis of Reactionmechanisms, Vch, 154p., New York.

Hall Eah, 1990. Biosensors, Ch.1: Biosensors in Context, Open University Press, İngiltere;3-30. İndirect Comparisons.

Hua J., Liu J., Hua M., Cai R., Li M., Wang J., Wang J. on Behalf of Cancer Biomarker Assessment Working Group, 2019. Diagnostic Performance of Biomarkers for Ovarian Cancer, Medicine, 4p.

Jeong J, Kim H, Lee Dj, Jung Bj, Lee Jb. 2016. RCA-Based Biosensor For Electrical And Colorimetric Detection of Pathogen DNA. 2016 Dec;11(1):242. Epub 2016 May 4.

Karaboğa, M. N. S., & Sezgintürk, M. K. 2019. Cerebrospinal fluid levels of alpha-synuclein measured using a poly-glutamic acid-modified gold nanoparticle-doped disposable neuro-biosensor system. Analyst, 144(2), 611-621.

Kesik, M., Kanık, F. E., Hızalan, G., Kozanoglu, D., Esentürk, E. N., Timur, S., & Toppare, L. 2013. A functional immobilization matrix based on a conducting polymer and functionalized gold nanoparticles: Synthesis and its application as an amperometric glucose biosensor. *Polymer*, *54*(17), 4463-4471.

Kim B., Park Y., Kim B., Ahn H.J., Lee K-A., Chung J.E., Han S. W., 2018. Diagnostic Performance of CA 125, HE_4, And Risk of Ovarian Malignancy Algorithm for Ovarian Cancer, Journal of Clinical Lboratory Analysis, 8p.

Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A. 2005. Potentiometric Enzyme Electrode for Urea Determination Using İmmobilized Urease in Poly(Vinylferrocenium) Film. Sensors and Actuators B: Chemical, 109: 194-199.

Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A. 2006. Amperometric Enzyme Electrode For Urea Determination Using İmmobilized Urease in Poly (Vinylferrocenium) Film. Sensors and Actuators B: Chemical, 114: 500-506.

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.

Lai, Y., Deng, Y., Yang, G., Li, S., Zhang, C., & Liu, X. 2018. Molecular imprinting polymers electrochemical sensor based on AuNPs/PTh modified GCE for highly sensitive detection of carcinomaembryonic antigen. Journal of biomedical nanotechnology, 14(10), 1688-1694.

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.

Malhotra, B.D., S. Kumar, And C.M. Pandey, 2016. Nanomaterials Based Biosensors For Cancer Biomarker Detection. Journal Of Physics: Conference Series, 2016. 704.

Mello, L.D. And Kubota, L.T. 2002. Review Of The Use Of Biosensors As Analytical Tools In The Food And Drink İndustries. Food Chem, 77: 237-256.

Mindivan Ferda, 2018. Grafen Oksit (GO) Ve İndirgenmiş Grafen Oksit (RGO) Dolgulu Pvc Kompozitlerin Mekanik Özelliklerinin Karşılaştırılması, 1biyoteknoloji Uygulama Ve Araştırma Merkezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, 6s, Bilecik.

Moore, R. G.; Brown, A. K.; Miller, M. C.; Skates, S.; Allard, W. J.; Verch, T.; Bast, R. C. 2008. The Use Of Multiple Novel Tumor Biomarkers For The Detection Of Ovarian Carcinoma In Patients With A Pelvic Mass. Gynecologic Oncology, 108(2), 402–408.

Moore, R. G., Hill, E. K., Horan, T., Yano, N., Kim, K., Maclaughlan, S., Singh, R. K. 2014. HE_4 (Wfdc2) Gene Overexpression Promotes Ovarian Tumor Growth. Scientific Reports, 4(1).

Ning X., Yun X., Guıfang W., Qingqin F., Qianqian C., Hongmei F., Xiaoling S., Lin L., 2013. Probing Of Edcnhss-Mediated Covalent Coupling Reaction By The Immobilization Of Electrochemically Active Biomolecules, 2013 Int. J. Electrochem. Sci., 8 (2013) 2459 – 2467.

Osteryoung, J. G. And Osteryoung, R. A. 1985. Square Wave Voltammetry. Analytical Chemistry, 57, 101a-110a.

Özcan B., 2015. Bazı Hastalıkların Erken Teşhisi İçin Yeni Biyoalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 72s, Tekirdağ.

Özmen T., 2015. Herbisit Olarak Kullanılan Bromasilin Tayini İçin Voltametrik Yöntem Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 84s, Ankara.

Parkinson G., Pejcic B., 2005. Using Biosensors To Detect Emerging Infectious Diseases, Final Report, Curtin University Of Technology, Nanochemistry Research Institute, The Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, 83p., Perth, Western Australia.

Pei, S. F., & Cheng, H. M. 2012. The Reduction Of Graphene Oxide. Carbon, 50(9), 3210-3228.

Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P., & González-Cortés, A. 2008. Gold Nanoparticle-Based Electrochemical Biosensors. Electrochimica Acta, 53(19), 5848–5866.

Price, C. P. 2001. Regular Review: Point Of Care Testing. Bmj, 322(7297), 1285–1288.

Priyadarsini S., Mohanty S., Mukherjee S., Basu S., Mishra M., 2018. Graphene and Graphene Oxide as Nanomaterials for Medicine and Biology Application Journal of Nanostructure in Chemistry (2018) 8:123–137.

Reanpang P, Chaılapakul and Jakmunee J., 2018. Fabrication of A Home-Made Spce Modified with Thionine For Determination of Hydrogen Peroxide. Chiang Mai J. Sci. 2018; 45(3): 1449-1459 Http://Epg.Science.Cmu.Ac.Th/Ejournal/Contributed Paper.

Ruggeri G., Bandiera E., Zanotti L., Belloli S., Ravaggi A., Romani C., Bignotti E., Tassi R.A., Tognon G., Galli C., Caimi L., Pecorelli S., 2011. HE_4 And Epithelial Ovarian Cancer: Comparison and Clinical Evaluation of Two Immunoassays and a Combination Algorithm, Clinica Chimica Acta, Elsevier, 7p.

Sakhraoui Heey., Maouche N., 2016. Illustration of Squar-Wave Voltammetry as an Efficientanalytıcal Method for Nanomol Amount High Detection of Heavy Metals for Environmental Applications, Université Farhat Abbas Sétif-1, Dept. Génie Des Procédés, Faculté De Technologie, Laboratoire D'electrochimie Et Matériaux, Algérie.

Sancar A., Kulaksız G., 2007. Nükleotid Eksizyon Onarımı Ve Kanser, Türk Biyokimya Dergisi, 2007-32 : P.104-111.

Scholz, F. 2010. Electroanalytical methods (Vol. 1). Berlin: Springer.

Sezgintürk, M. K. 2011. A new impedimetric biosensor utilizing vegf receptor-1 (flt-1): Early diagnosis of vascular endothelial growth factor in breast cancer. Biosensors and Bioelectronics, 26(10), 4032-4039.

Shalaby, A., Nihtianova, D., Markov, P., Staneva, A. D., Iordanova, R. S., & 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. (1981). Principles of Instrumental Analysis, (Second Ed), 1981.

Skoog, D., Holler, F.J. and Nieman, T. A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. Saunders College Publishing, 849, United States of America.

Skoog, D. A. 2004. Fundamentals of Analytical Chemistry, Thomson-Brooks/Cole.

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., et al., Immunoassays for The Cancer Biomarker CA 125 Based on a Large-Birefringence Nematic Liquid-Crystal Mixture. Biomed Opt Express, 2015. 6(1): P. 245-56.

Şahin M., 2013, Etanol-Metanol Karışımının Tayini için Yüzey Baskılı Elektrotların Modifiye Edilmesiyle Amperometrik Alkol Biyosensörünün Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 191s., Antalya.

Şahin, M., & Ayrancı, E. 2015. Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials. Electrochimica Acta, 166, 261-270.

Telefoncu, A. 2012. Biyosensörlere Genel Bakış ve Biyosensör Uygulamalarında Son Gelişmeler. Telefoncu A. ve Kılınç A. (Editörler), Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler. Ege Üniv. Matbaası, 5-12 Ss, İzmir.

Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. 2001. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Analytical Letters, 34(5), 635–659.

Tiyek, İ., Dönmez, U., Yıldırım, B., Alma, M. H., Ersoy, M. S., & Karataş, Ş. 2016. Synthesis of reduced graphene oxide by chemical method and its characterization. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 20(2), 349-357.

Tothill, I. E. 2001. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. Computers and Electronics in Agriculture, 30(1-3), 205-218.

Türkçapar N., Özden A. 2005. Tümör Markerları ve Klinik Önemi, Ankara Üniversitesi, Sağlık, Kültür ve Spor Dairesi, İç Hastalıkları ve Romatoloji Bölümü, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Güncel Gastroenteroloji, Aralık 2005, Ankara.

Wang, J. 2000. Analytical Electrochemistry. John Wiley and Sons. Inc., 186 P. Newyork.

Wang, H. S., Li, T. H., Jia, W.L., Xu, H.Y. 2006. Highly Selective And Sensitive Determination of Dopamine Using a Nafion/Carbon Nanotubes Coated Poly(3-Methylthiophene) Modified Electrode. Biosensors and Bioelectronics, 22:664-669.

Wang, J. 2008. Electrochemical Glucose Biosensors. Chem Rev, 108: 814-825.

Wang, J. And S.T. Yau, 2011. Field-Effect Amperometric Immuno-Detection Of Protein Biomarker. Biosens Bioelectron, 29(1): P. 210-4.

Wang J., Chen, L., Hocevar S.B., And Ogorevcb B., 1999. One-Step Electropolymeric Co-İmmobilization of Glucose Oxidase and Heparin for Amperometric Biosensing of Glucose.

Wang S.C., Chang K.S., Yuan C.J, 2009. Enhancement of Electrochemical Properties of Screen-Printed Carbon Electrodes by Oxygen Plasma Treatment. Elsevier, Electrochimica Acta 54 (2009) 4937–4943.

Yager, P., Domingo, G. J., & Gerdes, J. 2008. Point-Of-Care Diagnostics for Global Health. Annual Review of Biomedical Engineering, 10(1), 107–144.

Yanbin Li, 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.

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). Electrochimica acta, 44(10), 1585-1596.

Yeşiller, Ş. G. 2014. Enzim Aktivitesinin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Temelli Biyosensör Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi.

Yıldız, A., Genç, Ö. Ve Bektaş, S. 1997. Enstrümantal Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, 506, Ankara.,

Yuan, X., Sun, J. C., Blanco, M., Wang, H., Zhang, J., & Wilkinson, D. P. (2006). AC impedance diagnosis of a 500 W PEM fuel cell stack: Part I: Stack impedance. Journal of Power Sources, 161(2), 920-928.

Yuan, J., Duan, Yang, Luo, & Xi, M. 2012. Detection of Serum Human Epididymis Secretory Protein 4 in Patients with Ovarian Cancer Using a Label-Free Biosensor Based on Localized Surface Plasmon Resonance. International Journal of Nanomedicine, 2921.

Zhang, J., & Oyama, M. 2007. Electrocatalytic Activity of Three-Dimensional Monolayer of 3-Mercaptopropionic Acid Assembled on Gold Nanoparticle Arrays. Electrochemistry Communications, 9(3), 459–464.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayla YILMAZ AKTAN

Doğum yeri : İskenderun-HATAY

Doğum tarihi : 07.05.1987

Medeni hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ylmzayla@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve yıl)

Lise : Nuran Yılmaz Çok Programlı Lisesi 2001-2004

Lisans : Antalya Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü 2005-2009

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Tezli Y. L. 2017-2020

Uluslararası Kongreler:

M. Bilgi Kamaç, M. Altun, A. Yılmaz Aktan, M. Yılmaz, M.K. Sezgintürk. Preparation and electrochemical characterization of label-free HE_4 immunosensor on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polythionine and gold nanoparticles. EUROANALYSIS, İstanbul 1-5 September 2019 (Poster Sunumu).