

**BAZI NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARIN
ERKEN TANISINA YÖNELİK
NÖRO-BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE KLİNİK UYGULAMALARININ
ARAŞTIRILMASI**
Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA

DOKTORA TEZİ
KİMYA Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

2018

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BAZI NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARIN ERKEN TANISINA
YÖNELİK NÖRO-BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
VE KLİNİK UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA

Kimya ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır

Bu tez TÜBİTAK 113Z678 ve NKÜBAP.00.10.AR.15.03 tarafından desteklenmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA tarafından hazırlanan “Bazı Nörodejeneratif Hastalıkların Erken Tanısına Yönelik Nöro-Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi Ve Klinik Uygulamalarının Araştırılması ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özgür ÖZAY

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARIN ERKEN TANISINA YÖNELİK NÖRO-BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KLİNİK UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI

Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Alzheimer ve Parkinson hastalıkları sinir hücrelerinin ölümüne yol açan demans ile karakterize nörodejeneratif hastalıklardandır. Bu hastalıkların klinik tanısının, ancak semptomlar çıktıktan sonra yapılması tedavi sürecini geciktirmektedir. Bununla birlikte, bu hastalıklar, devletlerin sağlık ekonomisi üzerinde artan bir yük oluşturmaktadır. Bu sebeple bu hastalıkların erken teşhisi önemli bir hedef haline gelmiştir. Bu doktora tezinin kapsamında, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları için önem arz eden 4 biyo belirteç (CRP, SYN alfa, Tau-441 ve PARK-7) için elektrokimyasal temelli tek kullanımlık beş farklı nöro-biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Nöro-biyosensörlerin tasarımları, optimizasyon parametreleri ve analitik performansları elektrokimyasal impedans spektroskopisi, döngüsel voltametri ve kare dalga voltametrisi ile takip edilmiştir. Yüzeydeki morfolojik ve kimyasal değişiklikler taramalı elektron mikroskobu, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve atomik güç mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Tasarlanan nöro-biyosensörlerin klinik uygulamalardaki potansiyeli, hedef analitlerin beyin omurilik sıvısı, serum sıvısı ve tükürük sıvısında analizlenmesiyle belirlenmiştir. Geliştirilen nöro-biyosensör sistemlerinin, femtogram ve pikoogram düzeyinde hassasiyete, geniş tayin aralıklarına, yüksek tekrar üretilebilirlik potansiyeline, uzun depolanma stabilitesi ve rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nöro-biyosensör sistemlerinin fizyolojik sıvılarda hedef analitin tespitinde yüksek duyarlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Nöro-biyosensör, Alzheimer, Parkinson, elektrokimyasal impedans spektroskopisi

2018, 266 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DEVELOPMENT OF NEURO-BIOSENSOR SYSTEMS FOR EARLY DIAGNOSIS OF SOME NEURORODEGENERATIVE DISEASES AND INVESTIGATION OF CLINICAL PRACTICES

Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA

Namık Kemal University
Graduate School of Natural ve Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Alzheimer's ve Parkinson's are neurodegenerative diseases that causes the death of nerve cells ve characterized by dementia. The late diagnosis of these diseases causes the delay of the treatment period. Moreover, these diseases are an increasing burden on the state's health economy. Therefore, early diagnosis of neurodegenerative diseases has become very important in many respects. In this PhD thesis, five electrochemically-based disposable neuro-biosensor systems have been developed for four biomarkers (CRP, SYN alpha, Tau-441 ve PARK-7) which are potentialy important for Alzheimer's ve Parkinson's disease. The design of neurobiosensors, optimization parameters ve analytical performances were followed by electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry ve square wave voltammetry. The morphological and chemical changes on the surface were evaluated by scanning electron microscopy, fourier transform infrared spectroscopy and atomic force microscopy. The validation of the designed neurobiosensors in clinical practice was determined by analyzing target analytes in cerebrospinal fluid, serum fluid and saliva fluid. It has been determined that the developed neurobiosensor systems have sensitivity at femtogram ve picogram level, wide determination range, high reproducibility features, long storage stability and, regeneration capacity. It has also been observed that neuro-biosensor systems have high sensitivity in detecting target analytes in physiological fluids.

Keywords: Neuro-biosensor, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, elektrochemical impedance spectroscopy, biosensor

2018, 266 pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	i
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xii
KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklara Genel Bir Bakış.....	3
2.2. Alzheimer Hastalığı.....	5
2.3. Parkinson Hastalığı	8
2.4.Nörodejeneratif Hastalıklarda Erken Tanının Önemi ve Tanıda Kullanılan Biyolojik Belirteçler	10
2.5. C-reaktif Protein	18
2.6. Tau proteini	23
2.7. Synuclein alfa (SYN alfa)	26
2.8. PARK-7 (DJ-1)	29
2.9. Erken Tanıda Etkin Bir Araç: Nörobiyosensörler	31
2. 10. Nörobiyosensör Sistemleri Geliştirilirken Kullanılan Yenilikçi Materyaller	36
2.11. Kaynak Araştırması	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM	46
3.1. Nöro-biyosensörlerin Dizaynında Kullanılan Materyaller.....	46
3.2. Nöro-biyosensörlerin Dizaynında Kullanılan Cihazlar	48
3.3. CRP (1) Nöro-biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu.....	48
3.3.1. Elektrotların hazırlanması ve CPTMS ile SAMs oluşumu	48
3.3.2. CRP (1) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi.....	49
3.3.3. Elektrokimyasal Ölçümler.....	50
3.3.4. C-reaktif proteinin ölçüm prensibi	50
3.3.5. CRP (1) Nöro-biyosensörünün optimizasyon çalışmaları.....	51
3.3.5.2. Anti-CRP'nin konsantrasyon optimizasyonu.....	51
3.3.5.3 Anti-CRP'nin inkübasyon süresinin optimizasyonu	51

3.3.6. CRP (1) Nöro-biyosensörünün Analitik Performansı	52
3.3.6.1. CRP (1) Nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği	52
3.3.6.2. CRP (1) nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	53
3.3.6.3. CRP (1) Nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirlik çalışmaları.....	53
3.3.6.4. CRP (1) nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (tekrar kullanılabilirlik).....	54
3.3.6.5. Sabit Frekansta impedans (SFI) analizi.....	54
3.3.6.6. Kare dalga voltametrişi	55
3.3.6.7. CRP (1) nöro-biyosensörünün seçicilik çalışmaları.....	55
3.3.6.8. CRP (1) nöro-biyosensörünün depo ömrü	55
3.3.6.9. CRP (1) nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması... 56	
3.3.6.10. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	56
3.3.6.11. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	56
3.4. CRP (2) Nöro-biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu.....	57
3.4.1. Elektrotların hazırlanması ve CUTMS ile SAMs oluşumu.....	57
3.4.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi.....	57
3.4.3. Elektrokimyasal ölçümler	58
3.4.4. C-reaktif proteinin ölçüm prensibi	59
3.4.5. CRP (2) nöro-biyosensörünün optimizasyon çalışmaları.....	59
3.4.5.1. PAMAM dendrimerinin konsantrasyonun optimizasyonu	59
3.4.5.2. Anti-CRP'nin konsantrasyon optimizasyonu.....	59
3.4.6. CRP (2) nöro-biyosensörünün analitik performansı	60
3.4.6.1. CRP (2) nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği	60
3.4.6.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	61
3.4.6.4. CRP nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (Tekrar kullanılabilirlik)	61
3.4.6.5. Sabit frekansta impedans (SFI) analizi.....	62
3.4.6.6. Kare dalga voltametrişi	62
3.4.6.7. CRP (2) nöro-biyosensörünün seçicilik çalışmaları.....	62
3.4.6.8. CRP (2) nöro-biyosensörünün depo ömrü	62
3.4.6.9. CRP nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması	63
3.4.6.10. Taramalı Elektron mikroskopu (SEM).....	63
3.4.6.11. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	63
3.5. Synuclein alfa Nöro-biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu.....	63
3.5.1. Elektrotların hazırlanması ve altın nanopartikülün biriktirilmesi	63

3.5.2. Synuclein alfa (SYN-alfa) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi.....	64
3.5.3. Elektrokimyasal Ölçümler.....	64
3.5.4. SYN-alfanın ölçüm prensibi.....	65
3.5.5. SYN alfa Nöro-biyosensörünün Optimizasyon Çalışmaları	66
3.5.5.1. Monomer Konsantrasyonun Etkisi.....	66
3.5.5.2. Elektropolimerizasyon Döngü sayısının etkisi.....	66
3.5.5.3. Anti-SYN alfa konsantrasyon optimizasyonu.....	66
3.5.6. SYN-alfa nöro-biyosensörünün analitik performansı	66
3.5.6.1. SYN-alfa nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği	67
3.5.6.2. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	67
3.5.6.3. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirlik çalışmaları.....	67
3.5.6.4. SYN alfa nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (Tekrar kullanılabilirlik)...	68
3.5.6.5. Sabit frekansta impedans (SFI) analizi.....	68
3.5.6.6. Kare dalga voltametri.....	68
3.5.6.7. SYN alfa nöro-biyosensörünün seçicilik çalışmaları	69
3.5.6.8. SYN alfa nöro-biyosensörünün depo ömrü.....	69
3.5.6.9. SYN-alfa nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması.	69
3.5.6.10. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	69
3.5.6.11. Fourier-dönüştürme kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	70
3.6. Tau-441 nöro-biyosensörünün dizaynı ve fabrikasyonu.....	70
3.6.1. Elektrotların hazırlanması ve rGO ile modifikasyon	70
3.6.2. Tau-441 nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi	70
3.6.3. Elektrokimyasal ölçümler	72
3.6.4. Tau-441'in ölçüm prensibi	72
3.6.5. Tau-441 Nöro-biyosensörünün Optimizasyon Çalışmaları.....	72
3.6.5.1. Optimum rGO konsantrasyonunun belirlenmesi.....	72
3.6.5.2. 11-MUA konsantrasyon optimizasyonu.....	72
3.6.5.3. Anti-Tau konsantrasyon optimizasyonu.....	73
3.6.6. Tau-441 nöro-biyosensörünün analitik performansı	73
3.6.6.1. Tau-441 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği	73
3.6.6.2. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	74
3.6.6.3. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirlik çalışmaları	74
3.6.6.4. Tau-441 nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (tekrar-kullanılabilirlik)	74

3.6.6.5. Sabit frekansta impedans analizi	74
3.6.6.6. Tau-441 nörobiyosensörünün seçicilik çalışmaları.....	75
3.6.6.7. Tau-441 nöro-biyosensörünün depo ömrü	75
3.6.6.8. Tau-441 nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması ..	75
3.6.6.9. Taramalı elektron mikroskobu	76
3.6.6.10. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	76
3.6.6.11. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM).....	76
3.7. PARK-7 (DJ-1) Nöro-Biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu.....	76
3.7.1. Elektrotların hazırlanması ve altın nanopartiküllerin amino tiyol ile fonksiyonelleştirilmesi	76
3.7.2. PARK-7 (DJ-1) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi	77
3.7.3. Elektrokimyasal ölçümler	78
3.7.4. PARK-7'nin ölçüm prensibi.....	79
3.7.5. PARK-7 Nöro-biyosensörünün Optimizasyon Çalışmaları	79
3.7.5.1. 11-AUT konsantrasyon optimizasyonu.....	79
3.7.5.2. Optimum MWCNT konsantrasyonunun belirlenmesi	79
3.7.5.3. anti-PARK-7 (DJ-1) konsantrasyon optimizasyonu	79
3.7.6. PARK-7 nöro-biyosensörünün analitik performansı.....	80
3.7.6.1. PARK-7 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	80
3.7.6.2. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	81
3.7.6.3. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirlik çalışmaları	81
3.7.6.4. PARK-7 nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (tekrar-kullanılabilirlik).....	81
3.7.6.5. Sabit frekansta impedans analizi	81
3.7.6.6. PARK-7 nörobiyosensörünün seçicilik çalışmaları	82
3.7.6.7. PARK-7 nöro-biyosensörünün depo ömrü.....	82
3.7.6.8. PARK-7 nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması ..	82
3.7.6.9. Taramalı elektron mikroskobu	82
3.7.6.10. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	83
3.7.6.11. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM).....	83
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	84
4.1. CRP (1) Tayinine Yönelik Geliştirilen Nöro-Biyosensör	84
4.1.1. Nörobiyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı	84
4.1.2. CRP (1) nöro-biyosensörünün optimizasyon parametreleri	89
4.1.2.1. CPTMS'nin optimum konsantrasyonu.....	89

4.1.2.2. Anti-CRP'nin optimum konsantrasyonu	91
4.1.2.3. Anti-CRP'nin optimum immobilizasyon süresi	92
4.1.3. CRP (1) nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri	94
4.1.3.1. CRP'nin geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi.....	94
4.3.1.2. Nöro-biyosensörün tekrarlanabilirliği	96
4.3.1.3. Nöro-biyosensörün tekrar üretilebilirliği	97
4.1.3.4. CRP nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi (tekrar-kullanılabilirlik).....	97
4.1.3.5. Sabit Frekansta impedans (SFI) analizi.....	98
4.1.3.6. Kare dalga voltametri	100
4.1.3.7. CRP nöro-biyosensörünün seçiciliği.....	102
4.1.3.8. Nöro-biyosensörün depo ömrü.....	103
4.1.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik uygulamaları	103
4.1.3.10. SEM görüntüleri	104
4.1.3.11. FTIR sonuçları.....	106
4.2. C-reaktif protein (2) tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör.....	107
4.2.1. Nörobiyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı	107
4.2.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün optimizasyon parametreleri.....	110
4.2.2.1. PAMAM dendrimerinin optimum konsantrasyonu.....	110
4.2.2.2. Optimum anti-CRP konsantrasyonu.....	112
4.2.3. CRP (2) nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri	113
4.2.3.1. CRP'nin geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi.....	113
4.2.3.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	117
4.2.3.3. CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	117
4.2.3.4. CRP nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi (tekrar-kullanılabilirlik).....	118
4.2.3.5. Sabit frekansta impedans analizi	119
4.2.3.6. Kare dalga voltametri	121
4.2.3.7. CRP nöro-biyosensörünün seçiciliği.....	122
4.2.3.8. CRP nöro-biyosensörünün depo ömrü	123
4.2.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik uygulamaları	124
4.2.3.10. SEM görüntüleri	125
4.2.3.11. FTIR sonuçları.....	127
4.2.3.12. Tasarlanan CRP Nöro-biyosensörlerinin literatürdeki yeri.....	128
4.3. SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sistemi.....	130

4.3.1. Nöro-biyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı	130
4.3.2. SYN alfa nörobiyosensörünün optimizasyon parametreleri	137
4.3.2.1. Optimum glutamik asit (monomer) konsantrasyonu	137
4.3.2.2. Optimum elektropolimerizasyon döngü sayısı	138
4.3.2.3. Optimum anti-SYN alfa konsantrasyonu	139
4.3.3. SYN alfa nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri	141
4.3.3.1. SYN alfa'nın geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi	141
4.3.3.2. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği	145
4.3.3.3. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirliği	145
4.3.3.4. SYN alfa nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi (tekrar-kullanılabilirlik)....	146
4.3.3.5. Sabit frekansta impedans analizi	148
4.3.3.6. Kare dalga voltametri	149
4.3.3.7. SYN alfa nöro-biyosensörünün seçiciliği	150
4.3.3.8. SYN alfa nöro-biyosensörünün depo ömrü	152
4.3.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamaları	153
4.3.3.10. SEM görüntüleri	154
4.3.3.11. FTIR sonuçları	156
4.3.3.12. SYN-alfa nöro-biyosensörünün literatürdeki yeri	158
4.4. Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sistemi	160
4.4.1. Nöro-biyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı	160
4.4.2. Tau-441 nörobiyosensörünün optimizasyon parametreleri	169
4.4.2.1. Optimum rGO konsantrasyonu	169
4.4.2.2. Optimum 11-MUA konsantrasyonu	170
4.4.2.3. Optimum anti-Tau konsantrasyonu	171
4.4.3. Tau-441 nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri	172
4.4.3.1. Tau-441'in geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi	172
4.4.3.2. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği	176
4.4.3.3. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği	177
4.4.3.4. Tau-441 nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi	178
4.4.3.5. Sabit frekansta impedans analizi	178
4.4.3.6. Tau-441 nörobiyosensörünün seçiciliği	179
4.4.3.8. Tau-441 alfa nöro-biyosensörünün depo ömrü	180
4.4.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamaları	181

4.4.3.10. SEM görüntüleri.....	183
4.4.3.11. FTIR sonuçları.....	186
4.4.3.12. AFM sonuçları.....	187
4.4.3.13. Tau-441 Nöro-biyosensörünün literatürdeki yeri.....	188
4.5. PARK-7 (DJ-1) tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sistemi	190
4.5.1. Nöro-biyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı	190
4.5.2. PARK-7 nöro-biyosensörünün optimizasyon parametreleri	197
4.5.2.1. Optimum 11-AUT konsantrasyonu	197
4.5.2.2. Optimum MWCNT konsantrasyonu	198
4.5.2.3. Optimum anti-PARK-7 optimizasyonu.....	200
4.5.3. PARK-7 nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri.....	201
4.5.3.1. PARK-7'nin geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi	201
4.5.3.2. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	205
4.5.3.3. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	205
4.5.3.4. PARK-7 nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi.....	206
4.5.3.5. Sabit frekansta impedans analizi	207
4.5.3.6. PARK-7 nöro-biyosensörünün seçiciliği	209
4.5.3.8. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamaları	210
4.5.3.9. SEM görüntüleri.....	212
4.5.3.10. FTIR sonuçları.....	214
4.5.3.11. AFM sonuçları.....	215
5. SONUÇ.....	217
6. KAYNAKLAR.....	220
7. EKLER.....	243
8. ÖZGEÇMİŞ.....	244

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 : Nörodejeneratif hastalıklarda biriken proteinler, formları ve lokalizasyonları....	4
Çizelge 2. 2 : Alzheimer hastalığının potansiyel biyobelirteçleri	15
Çizelge 2. 3 : PH için potansiyel biyobelirteçler.....	18
Çizelge 2. 4 : AH' nin teşhisinde kullanılan bazı teknikler ve kısıtlamaları	32
Çizelge 2. 5 : Biyomoleküllerin immobilizasyonu için ITO elektrot yüzey fonksiyonelleştirilmesinde kullanılan fonksiyonel gruplar	38
Çizelge 4. 1 : Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri	96
Çizelge 4. 2 : Nöro-biyosensörün tekrar üretilebilirliğine ait doğru denklemleri	98
Çizelge 4. 3 : Seçicilik çalışmalarına ait yük transfer direnci değerleri.....	102
Çizelge 4. 4 : CRP Nöro-biyosensör sisteminin serum örneklerinde uygulanabilirlik sonuçları	104
Çizelge 4. 5 : Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri	116
Çizelge 4. 6 : CRP Nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirliğine ait doğru denklemleri	118
Çizelge 4. 7 : CRP Nöro-biyosensör sisteminin serum örneklerinde uygulanabilirlik sonuçları	124
Çizelge 4. 8 : Literatürde bildirilen çeşitli CRP biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması.....	129
Çizelge 4. 9 : Artan SYN alfa konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, Ru ve kapasitanstaki değişiklikler	144
Çizelge 4. 10 : Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri	144
Çizelge 4. 11 : Geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile BOS örneklerinde bulunan SYN-alfa konsantrasyonlarının belirlenmesi	154
Çizelge 4. 12 : Literatürde bildirilen çeşitli SYN alfa biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması	158
Çizelge 4. 13 : Nöro-biyosensörün tasarım adımlarına ait impedimetrik parametreler	165
Çizelge 4. 14 : Artan Tau-441 konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler	175
Çizelge 4. 15 : Nörobiosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri	176

Çizelge 4. 16 : Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminde BOS ve srum örneklerinde Tau-441' in tayin sonuçları	182
Çizelge 4. 17 : Literatürde bildirilen çeşitli Tau biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması.	189
Çizelge 4. 18 : Nöro-biyosensörün tasarım adımlarına ait impedimetrik parametreler	194
Çizelge 4. 19 : Artan PARK-7 konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler	203
Çizelge 4. 20 : Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri	204
Çizelge 4.21: Geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile BOS ve tükürük örneklerinde bulunanPARK-7 konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	211

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1 : Alzheimer hastalığının önerilen mekanizması (Shaw ve ark. 2007)	6
Şekil 2. 2 : Alzheimer hastalığının patolojik gelişimi (Colin ve ark. 2015)	7
Şekil 2. 3 : CRP'nin 3 boyutlu yapısı (Steven Black ve ark. 2004).....	20
Şekil 2. 4 : CRP proteininin amino asit bileşenlerinin moleküler gösterimi, (B) fosfokolin, (C) o-fosforiletanolamin, (D) floreseinamin (Algarra ve ark. 2013).....	21
Şekil 2. 5 : Tau proteinin mikrotübül yapısında yeri ve nörofibriller yumakların oluşumu ile mikrotübüllerin parçalanması (Fitzpatrick, Falcon ve ark. 2017)	25
Şekil 2. 6 : Parkinson hastalığına sebep olan metabolik durumlar (Lee ve Trojanowski 2006)	29
Şekil 2. 7 : DJ-1 monomerinin moleküler modeli (Saito 2014)	30
Şekil 2. 8 : Kendiliğinden oluşan tek tabaka yapının ideal gösterimi (Gooding ve Ciampi 2011).....	39
Şekil 2. 9 : Enzim immobilizasyonunun kovalent (A) ve nonkovalent (B) etkileşimi (Taurino, De Micheli ve ark. 2012).....	41
Şekil 3. 1 : Nöro-biyosensör tasarım aşamalarının şematik gösterimi.....	49
Şekil 3. 2 : Nöro-biyosensör sisteminde kullanılan eşdeğer devre modeli	52
Şekil 3. 3 : Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi	58
Şekil 3. 4 : Nöro-biyosensör sisteminde kullanılan eşdeğer devre modeli	60
Şekil 3. 5 : Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi	65
Şekil 3. 6 : Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi	71
Şekil 3. 7 : Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi	78
Şekil 4. 1 : CRP Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) EIS spektrumu, (B) her adıma ait RCT değerleri (C) döngüsel voltamogramlar	88
Şekil 4. 2 : Farklı CPTMS konsantrasyonlarına ait yük transfer direnci	90
Şekil 4. 3 : Farklı CPTMS konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri	91
Şekil 4. 4 : Farklı anti-CRP konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri	92
Şekil 4. 5 : Farklı anti-CRP inkübasyon süreleriyle hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafiği.....	93
Şekil 4. 6 : Optimum koşullarda hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda CRP' ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği	95
Şekil 4. 7 : Nöro-biyosensör sisteminin rejenerasyon kapasitesi	98
Şekil 4. 8 : Nöro-biyosensörün Bode grafiği.....	99
Şekil 4. 9 : CRP Nöro-biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi	100
Şekil 4. 10 : (A) Nöro-biyosensör sisteminin farklı CRP konsantrasyonlarına kare dalga voltametri ile verdiği yanıt, (B) kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	101
Şekil 4. 11 : Nöro-biyosensör sisteminin farklı antijenlere karşı seçiciliği.....	102
Şekil 4. 12 : CRP Nöro-biyosensör sisteminin depolanma stabilitesi.....	103

Şekil 4. 13 : CRP Nörobiyosensörünün tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) yalın ITO, (B) ITO/OH, (C) ITO/OH/CPMTS (D) ITO/OH/CPMTS/anti-CRP, (E) ITO/OH/CPMTS/anti-CRP/BSA (F) ITO/OH/CPMTS/anti-CRP/BSA/CRP..	105
Şekil 4. 14 : CRP Nöro-biyosensörünün tasarım adımlarının FTIR spektrumları (A) CPMTS, (B) anti-CRP	106
Şekil 4. 15 : CRP Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) EIS verileri, (B) her adıma ait RCT değerleri (C) döngüsel voltametri verileri	109
Şekil 4. 16 : Farklı PAMAM konsantrasyonlarının yük transfer direncine etkisi.....	111
Şekil 4. 17 : Farklı PAMAM konsantrasyonlarıyla hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri	112
Şekil 4. 18 : Farklı anti-CRP konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri	113
Şekil 4. 19 : Optimum koşullarda hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda CRP' ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	115
Şekil 4. 20 : CRP Nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi	119
Şekil 4. 21 : CRP Nöro-biyosensörünün bode grafiği.....	120
Şekil 4. 22 : CRP nöro-biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi.....	120
Şekil 4. 23 : (A) Nöro-biyosensör sisteminin farklı CRP konsantrasyonlarına kare dalga voltametrisi ile verdiği yanıt, (B) kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği	121
Şekil 4. 24 : Nöro-biyosensör sisteminin farklı antijenlere karşı seçiciliği.....	123
Şekil 4. 25 : CRP Nöro-biyosensörlerinin tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO/11-CUTMS, (B) ITO/11-CUTMS/PAMAM, (C) ITO/11-CUTMS/PAMAM/anti-CRP, (D) ITO/11-CUTMS/PAMAM/anti-CRP/BSA, (E) ITO/11-CUTMS/PAMAM/anti-CRP/BSA/CRP	126
Şekil 4. 26 : CRP Nöro-biyosensörüne ait FTIR spekturumları (A) 11-CUTMS, (B) PAMAM, (C) Anti-CRP	127
Şekil 4. 27 : ITO elektrot yüzeyine altın nanopartikül kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar (A) 1. döngü (B) ilerleyen döngü sayısı ile birlikte kayan indirgenme potansiyeli.....	131
Şekil 4. 28 : (A) altın kaplamada kullanılan çözeltinin biriktirme öncesi ve sonrası durumu (B) yalın ITO ve altın nanopartikül kaplanmış ITO.....	132
Şekil 4. 29 : Altın nanopartikül katkılı ITO elektrot yüzeyinde glutamik asidin elektropolimerizasyonuna ait döngüsel voltamogramlar	133
Şekil 4. 30 : SYN-alfa Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) EIS verileri, (B) her adıma ait RCT değerleri (C) döngüsel voltametri verileri	135
Şekil 4. 31 : Farklı monomer konsantrasyonlarının Nöro-biyosensör sisteminin yanıtına etkisi	138
Şekil 4. 32 : Farklı döngü sayılarıyla gerçekleştirilen elektropolimerizasyon işlemlerinin nöro-biyosensör sistemi yanıtına etkisi	139
Şekil 4. 33 : Farklı anti-SYN-alfa konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri	140
Şekil 4. 34 : 500 ng/mL anti-SYN-alfa ile hazırlanan Nöro-biyosensörün doygunluk eğrisi	140

Şekil 4. 35 : Optimum koşullarda hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda SYN-alfaya' ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	142
Şekil 4. 36 : Nöro-biyosensör sisteminin tekrar üretilebilirliği (n=6).....	146
Şekil 4. 37 : SYN-alfa nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi	147
Şekil 4. 38 : SYN-alfa nöro-biyosensörünün bode grafiği.....	148
Şekil 4. 39 : SYN- alfa nörobiyosensörünün sabit frekansta impedans analizi	149
Şekil 4. 40 : Nöro-biyosensör sisteminin farklı SYN-alfa konsantrasyonlarına kare dalga voltametri ile verdiği yanıt ve kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği	150
Şekil 4. 41 : SYN-alfa nörobiyosensörünün farklı antijenlere karşı gösterdiği seçicilik.....	151
Şekil 4. 42 : SYN-alfa nöro-biyosensörünün depolanma stabilitesi	152
Şekil 4. 43 : SYN-alfa nöro-biyosensörlerinin tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO, (B) ITO/AuNP, (C) ITO/AuNP/PGA, (D) ITO/AuNP/PGA/anti-SYN-alfa, (E) ITO/AuNP/PGA/anti-SYN-alfa/BSA, (F) ITO/AuNP/PGA/anti-SYN-alfa/BSA/SYN-alfa	155
Şekil 4. 44 : ITO elektrot yüzeyinde altın nanopartikül biriktirilmesine ait EDX spektrumu	156
Şekil 4. 45 : SYN-alfa nöro-biyosensörünün FTIR spektrumları (a) PGA, (b) anti-SYN-alfa	157
Şekil 4. 46 : ITO elektrot yüzeyine altın nanopartikül kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar	161
Şekil 4. 47 : Tau-441 Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) elektrokimyasal impedans spektrumu, (B) her adıma ait RCT değerleri (C) döngüsel voltamogramlar.....	163
Şekil 4. 48 : 11-MUA ile modifikasyon adımına ait $Z'' - \omega - \frac{1}{2}$ grafiği	169
Şekil 4. 49 : Farklı 11-MUA konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin Tau-441' e verdiği yanıt	171
Şekil 4. 50 : Farklı anti-Tau ile hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin Tau-441' e verdiği yanıt	172
Şekil 4. 51: Optimum koşullarda hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda Tau-441'e verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	173
Şekil 4. 52 : Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirlik sonuçları.....	177
Şekil 4. 53 : Tau-441 nöro-biyosensörünün bode grafiği.....	178
Şekil 4. 54 : Tau-441 nöro-biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi.....	179
Şekil 4. 55 : Tau-441 nöro-biyosensörünün farklı antijenlere karşı gösterdiği seçicilik	180
Şekil 4. 56 : Nöro-biyosensörün depolanma stabilitesi.....	181
Şekil 4. 57: Nöro-biyosensör tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO/rGO, (B) ITO/rGO/AuNP, (C) ITO/rGO/AuNP/11-MUA, (D) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/Anti-Tau, (E) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/Anti-Tau/BSA, (F) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/Anti-Tau/BSA/Tau-441.....	184
Şekil 4. 58 : Rgo, AuNP ve 11-MUA adımlarına ait EDX spektrumları.....	185
Şekil 4. 59 : Tau-441 nöro-biyosensörünün FTIR spektrumu.....	186

Şekil 4. 60: Tau-441 nöro-biyosensörünün tasarım adımlarına ait AFM görüntüleri (A) ITO/rGO, (B) ITO/rGO/AuNP, (C) ITO/rGO/AuNP/11-MUA, (D) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau441, (E) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau441/BSA, (F) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau441/BSA/Tau-441.....	187
Şekil 4. 61: ITO elektrot yüzeyine altın nanopartikül kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar ve ilerleyen döngü sayısı ile birlikte kayan indirgenme potansiyeli	191
Şekil 4. 62: PARK-7 nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) elektrokimyasal impedans spektrumu, (B) her adıma ait RCT değerleri (C) döngüsel voltamogramlar.....	192
Şekil 4. 63: 11-AUT ile modifikasyon adımına ait $Z'' - \omega - 1/2$ grafiği	196
Şekil 4. 64 : Farklı 11-AUT konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 konsantrasyonlarına verdiği yanıt.....	198
Şekil 4. 65: Farklı MWCNT konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 konsantrasyonlarına verdiği yanıt	199
Şekil 4. 66: 0,085/mL MWCNT ile hazırlanan nöro-biyosensörün doygunluk eğrisi	200
Şekil 4. 67: Farklı anti-PARK-7 konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 konsantrasyonlarına verdiği yanıt	201
Şekil 4. 68: Optimum koşullarda hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda PARK-7'ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	202
Şekil 4. 69 : PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirlik sonuçları	206
Şekil 4. 70 : PARK-7 nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi	207
Şekil 4. 71 : PARK-7 nöro-biyosensörünün Bode grafiği	208
Şekil 4. 72 : PARK-7 nörobiosensörünün sabit frekansta impedans analizi.....	208
Şekil 4. 73 : PARK-7 nörobiosensörünün farklı antijenlere karşı gösterdiği seçicilik	209
Şekil 4. 74 : PARK-7 nöro-biyosensörünün depolanma stabilitesi.....	210
Şekil 4. 75 : PARK-7 nöro-biyosensörlerinin tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO/AuNP (B) ITO/AuNP/11-AUT (C) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT (D) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7 (E) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7/BSA, (F) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7/BSA ...	213
Şekil 4. 76 : PARK-7 nöro-biyosensörünün FTIR spektrumları (a) 11-AUT, (b) anti-PARK-7	214
Şekil 4. 77 : PARK-7 nöro-biyosensörünün tasarım adımlarına ait AFM görüntüleri (A) ITO, (B) ITO/AuNP, (C) ITO/AuNP/11-AUT, (D) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT, (E) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK-7, (F) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK/BSA (G) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK/B	215

KISALTMALAR

AH	: Alzheimer hastalığı
PH	: Parkinson hastalığı
NH	: Nörodejeneratif hastalıklar
MSS	: Merkezi sinir sistemi
ITO	: İndiyum tin oksit
PET	: polietilenteraftalat
BOS	: beyin omurilik sıvısı
CPTMS	: siyanopropiltrimetoksisilan
CUTMS	: siyanoundesiltrimetoksisilan
PAMAM	: poliamidoamin
EDC	: N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
NHS	: N-hydroxysuccinimide
BSA	: Sığır serum albumini
Rgo	: İndirgenmiş grafen oksit
PGA	: poli- glutamik asit
AuNP	: Altın nanopartikül
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
11-MUA	: 11-merkaptoundekanoik asit
11-AUT	: 11-amino undekanethiyol
SAMs	: Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
AFM	: Atomik güç mikroskobu
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
CV	: Döngüsel voltametri
SWV	: Kare dalga voltametrisi
CRP	: C-reaktif protein
SYN alfa	: Synuclein alfa
SFI	: Sabit frekansta impedans

TEŞEKKÜR

Bilimsel bilgi dağarcığıma, tecrübelerime ve akademik duruşuma katkılarıyla doktorantı olmaktan her zaman gurur ve onur duyacağım danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Okumanın ve araştırmanın öneminden hayatım boyunca dem vuran sevgili ve saygıdeğer babam Mehmet Şevki SONUÇ ve annem Emine Mübine SONUÇ'a, kıymetli desteklerinden dolayı kardeşlerime,

Kıymetli tecrübelerini benimle paylaşan Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksekokulunun değerli hocaları Sayın Öğr. Gör. Deniz SAYGILI ve Öğr. Gör. Meryem METİNOĞLU'na,

Bilimsel bilgi ışığında yaptığımız tartışmalarla desteklerini her zaman gördüğüm aynı laboratuvarı paylaştığım değerli arkadaşlarım, Burçak DEMİRBAKAN ve Burcu ÖZCAN'a, katkıları için Aslı GÜNDOĞDU ve Elif Burcu BAHADIR'a,

Her tökezlediğimde elimden tutan, bu meşakketli yolculuk boyunca her daim yanımda olan sevgili eşim Dr. İhsan KARABOĞA'ya, gözlerimin nuru kızlarım Rana Meryem ve Sare Züleyha'ya en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Mayıs, 2018

Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA
Öğretim Görevlisi

İTHAF

*Dedem,
Rahmetli Hacı Ömer Ali DURAN'nın
aziz hatırasına
saygıyla ve minnetle...*

1. GİRİŞ

Yaşlanma insanoğlunun tarih boyunca süregelen tipik bir sorunudur ve gelişen teknolojiyle birlikte bu sorun insanoğlunun lehine dönerken beraberinde başka sorunları da getirmiştir. Ortalama yaşam süresi gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde artmakta, fakat bu artış yaşam kalitesine doğru orantılı bir şekilde yansıyamamaktadır (**Kara 2008**). Bu durumun başında, yaşlılık (60-80 yaş) ve ileri yaşlılık (80-90 yaş) döneminin ciddi bir sağlık sorunu olan nörodejeneratif hastalıklar gelmektedir.

Alzheimer Hastalığı, Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı gibi hastalıklar için kapsayıcı bir terim olarak kullanılan “nörodejeneratif hastalıklar”ın ortak özelliği bazı proteinlerin yanlış katlanması neticesinde nöronal yollarda bozulmalar meydana gelmesidir (**Chaudhuri ve Paul 2006**). Bununla birlikte “nörodejeneratif hastalıklar”ın başlamasını tetikleyen olaylar birbirinden farklıdır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) öngörülleri, 2040 yılına kadar nörodejeneratif hastalıkların kanseri aşarak (**Dua 2004**), 2030 yılına kadar da tahmini olarak 2 trilyon ABD doları ekonomik etkiye sahip olarak, dünya üzerindeki ölümlerin başlıca ikinci sebebi haline geleceğini belirtmektedir (**Prince ve ark. 2015**).

Dünya genelindeki sağlık sistemleri, nörodejeneratif hastalıklara bağlı demans tanısının karşılan(a)mamış ihtiyaçlarıyla başa çıkmada benzeri görülmemiş bir zorlukla karşı karşıyadır. Demans, klinik bir kavramdır ve buna bağlı hastalıkların tanısı nöropatolojik son çok iyi bilinmekle birlikte, temelde klinik semptomlara dayanmaktadır (**Isaac ve ark. 2017**).

Bu nedenle, bu 'protein katlanma bozukluklarının' etkili ve hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlayan teknolojilerin geliştirilmesi zorunludur. Böylelikle, hastalıkların tedavisinde ciddi önem arz eden patolojik mekanizmaların erken tespit edilmesi ve daha iyi anlaşılması sağlanabilecektir.

Bir biyosensör, bir moleküler tanılama birimiyle bir fizikokimyasal transdüseri birleştiren biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanır. Son yıllarda eğilim, moleküler düzeye yaklaşmak adına minyatürize edilmiş yüksek verimlilikte cihazlar geliştirmek üzerinedir. Bu eğilim, yüksek kapasiteli cihazlar, basit destekleyici sistemler, üretimde düşük maliyet ve

hızlı cevap süresi gibi çok değerli avantajlara sahiptir. Klinik testlerde kullanılacak bir biyosensör için cihazın spesifitesini karşılayan spesifik belirteçlerin tanımlanması gerekmektedir (**Taitt ve ark. 2005**). Biyosensörlerin, kolay kullanımları, ucuz olmaları, hızlı, sağlam ve hatta multi-analiz imkânı sunması gibi avantajları vardır (**Mittal ve ark. 2017**).

Nörodejeneratif hastalıklarda, kesin bir tedavi yolu henüz yoksa da, geliştirilmekte olan ilaçların erken dönemde uygulanması hastalığın yavaşlatılmasında önem arz etmektedir. Erken teşhis ayrıca hastalığın ilerleyişini yavaşlatmak için, bireylerin yaşam tarzında değişiklik yapmasına da imkân verebilmektedir.

Geleneksel olarak nörodejeneratif hastalıkların teşhisi, hastada spesifik semptomlarla ilişkili klinik bir muayene, hastanın daha önceki tıbbi geçmişinin dikkate alınması ve klinik laboratuvar testleri ile ilişkilendirilmesini kapsar. İnsan genomunun kodlarının çözülmesi, spesifik nörolojik bozukluklarla ilişkili proteomik ve genetik biyolojik belirteçlerin tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Kimyasal yapısının ve konsantrasyonunun belirlenmesi de dahil olmak üzere birden fazla biyo belirtecin tanımlanması, hastalığa ait “moleküler imza”nın takip edilmesi anlamına gelmektedir. Bu moleküler imzanın kliniksel parametrelerle birleştirilmesi etkili bir tedavinin belirlenmesi sürecinde klinisyenlere oldukça yardımcı olmaktadır (**Bell ve Kornguth 2007**).

Bu noktadan yola çıkılarak geliştirilen bu doktora tezinin amacı, Alzheimer ve Parkinson gibi demansın kritik şekilde tezahür ettiği nörodejeneratif hastalıkların erken tanısına yönelik, yenilikçi materyaller kullanılarak tasarlanmış nöro-biyosensör sistemleri geliştirmektir. Tasarlanan nöro-biyosensörlerin algılama ve tayin hedefinin kapsamında; AH için önemli bir inflamasyon biyobelirteci olan C-reaktif protein, nörofibriler plaklar içerisinde yer alan Tau proteini, PH patogenezinde kritik bir role sahip olan Synuclein alfa ve PARK-7 adlı proteinler bulunmaktadır. Laboratuvar ortamında elektrokimyasal temelli geliştirilen bu nöro-biyosensör sistemlerinin klinik uygulanabilirliği, gönüllü bireylerden alınan serum sıvısı, beyin omurilik sıvısı ve tükürük örneklerinde gerçekleştirilen ölçümlerle belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklara Genel Bir Bakış

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir sisteminin belli bölgelerindeki hücrelerin ilerleyici bir şekilde fonksiyonlarını kaybetmeleri ve akabinde hücre ölümünün gerçekleşmesi şeklinde tanımlanabilir (**Jellinger 2009**). Yetişkin sinir sisteminin sınırlı yenilenme kapasitesi göz önüne alındığında, nöronal hücre ölümünün nörodejeneratif sürecin geri döndürülemez ve yıkıcı bir evresi olduğuna işaret etmek mümkündür (**Dickson ve Weller 2011**).

Nörodejeneratif hastalıklara örnek olarak Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amiyotropik lateral skleroz, frontotemporal demans ve spinoserebellar ataksi verilebilir. Bu hastalıklar patofizyolojilerinde çeşitlilik gösterir; bazıları hafıza ve bilişsel bozukluklara neden olurken diğerleri kişinin hareket, konuşma ve nefes alma yeteneğini etkiler (**Gitler ve ark. 2017**).

Nörodejenerasyon üzerine yapılan araştırmaların odağının büyük kısmı nöronlara yönelmiş olsa da, glia hücrelerinin nörodejeneratif bozukluklardaki rolü de giderek daha fazla tanınmaktadır (**Dickson ve Weller 2011**). Glia hücrelerinden olan astrositlerde meydana gelen reaktif değişiklikler neredeyse her nörodejeneratif bozukluğun bir parçası olarak gösterilir. Hemen hemen tüm nörodejeneratif bozukluklarda rol oynayan bir diğer glial hücre mikroglialardır (**Miller ve ark. 2004**). Mikroglialar, neredeyse tüm hücrel hasarlara cevap veren mononükleer fagositik sistem hücreleridir. Bu hücreler ayrıca nöroinflamasyonla da bağlantılı hücrelerdir ki, bu noktada nöroinflamasyonu aktive edilmiş mikroglia ile karakterize, beynin doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarını belirtmek için kullanılan bir terim olarak tanımlamak gerekir. Nöroinflamasyonla özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında sıklıkla karşılaşılır (**Eikelenboom ve ark. 2010**).

Klinik ve patolojik çeşitliliğine rağmen nörodejeneratif bozuklukların birçoğu, oksidatif stres ve programlanmış hücre ölümü gibi bazı temel hastalık süreçlerinin yanı sıra protein agregasyonunu, protein degradasyonunu veya her ikisini de içerebilmektedir (**Dickson ve Weller 2011**). Nöronal kayıp, proteinopatiler olarak özetlenen ve birçok nörodejeneratif bozuklukta kendini gösteren, yanlış katlanmış proteinlerin hücre dışı ve hücre içi

birikmesine neden olan protein dizilerinin konformasyonel değişiklikleriyle ilişkilidir (Jellinger 2009).

Nörodejeneratif hastalıkları başlatan temel etkenler farklı olmakla birlikte bunları genetik, çevresel ve endojen faktörler olarak toparlamak mümkündür. Ancak bu durumların yaşlanma üzerindeki patojenik rolü ve temel moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Formani ve ark. 2004; Orosz ve ark. 2009). Altta yatan patogenezi sıklıkla farklı olsa da, daha önce de belirtildiği gibi protein agregasyonu, farklı nörodejeneratif hastalıkların en çarpıcı ortak özelliğidir. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklar, ilgili agregatların kimyasal yapısına göre sınıflandırılabilir. En bilinen örnekler, Alzheimer ve prion hastalıkları, tauopatiler ve α -sininükleopatilerdir (Çizelge 2.1). Tauopatilerde, mikrotübüle bağlı protein tau (τ) 'nın anormal fosforilasyonu, hücre içi agregasyonu kolaylaştırır, α -sininükleinin intranöronal agregatları, Parkinson hastalığına, Lewy cisimciği demansına ve çoklu sistem atrofisine neden olur. Huntington hastalığında, poliglutamin agregatları etkilenen nöronların çekirdeğinde bulunabilir. Tüm bu hastalıkların ortak özelliği, farklı proteinlerin kendi doğal yapılarını kaybetmeleri ve β -tabaka bakımından zengin ve çok benzer yapıya sahip fibriller oluşturarak hücre içinde veya dışında birikmeleridir (Dickson ve Weller 2011).

Çizelge 2. 1. Nörodejeneratif hastalıklarda biriken proteinler, formları ve lokalizasyonları

Hastalık	Protein agregatı	Form	Lokalizasyon
Alzheimer hastalığı	A β	Senil plak	Ekstraselüler
	Tau	Nörofibriller yumak	Sitoplazmik
Parkinson hastalığı	α -Synuclein	Lewy cisimcikleri	Sitoplazmik
Lewy cisimcikli demans	α -Synuclein	Lewy cisimcikleri	Sitoplazmik
Huntington hastalığı	Poliglutamin	İnklüzyon	Nükleer
Prion hastalıkları	PrP ^{Sc}	Amiloid plaklar	Ekstranükleer

Agregasyon süreci iki ayrı yoldan birini izleyebilir: düzensiz yol; amorf kümelerin rastgele oluşumuna ve düzenli yol ise simetri derecesi yüksek yapıların oluşumuna yol açar. İkinci süreç morfolojik olarak amiloid fibriller olarak tanınan eksensel olarak simetrik "tek boyutlu kristaller" in oluşumuyla sonuçlanır. Tam bu noktada amiloid ifadesini, β -tabakaca-

zengin fibriller istiflerden oluşan bir protein agregatı olarak tanımlayabiliriz (**Sawaya ve ark. 2007; Nilsson ve ark. 2010**).

Proteinlerin amino asit dizilimi, oluşan ara ürünlerin niteliği, proteinin çevresi, proteinin katlanma ve açılma oranı, yukarıda bahsedilen agregasyon yollarını belirleyen faktörlerdir (**Goldschmidt ve ark. 2010**).

1960' lı ve 1970' li yıllarda Glenner, Alzheimer veya Down sendromuyla ölen insanların beyinlerinde bulunan çeşitli amiloid proteinleri saflaştırmaya ve karakterize etmeye çalıştı. Uzun yıllar uğraştıktan sonra nihayet 1984'te başarılı oldu ve amiloid proteininin saflaştırılmasını rapor etti (**Glenner ve Wong 1984**). Nörodejenerasyonla ilgili bugün gelinen noktada yanlış katlanmış proteinlerin sadece hastalıkların nöropatolojik teşhisinde değil, nörodejenerasyonun moleküler mekanizmasında da primer rol oynadığı artık bilinmektedir (**Young 2009**).

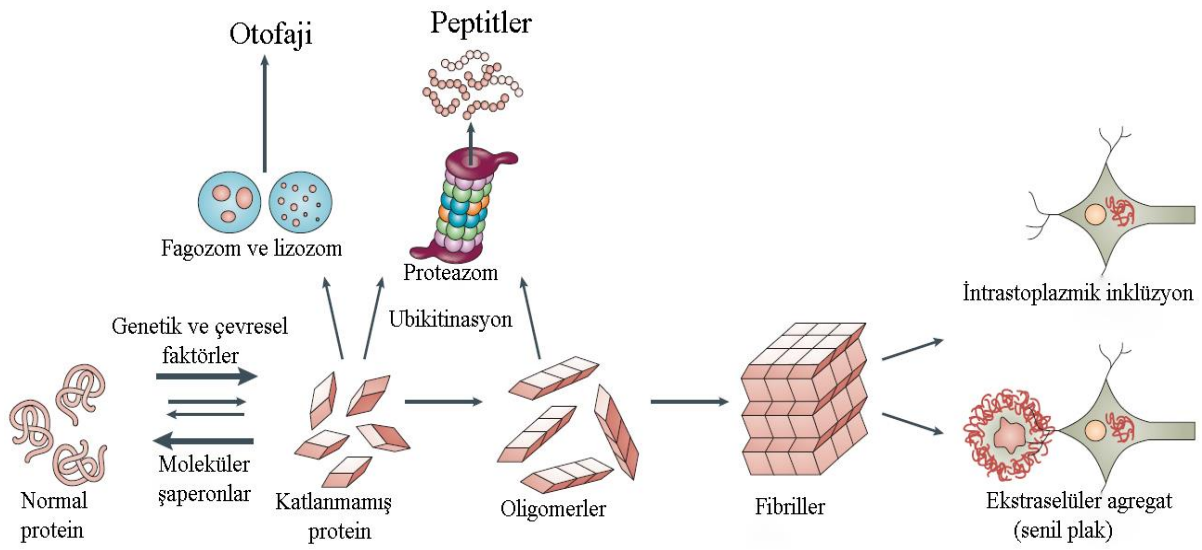
2.2. Alzheimer Hastalığı

Kasım 1901'de Alman nöropsikiyatrist Alois Alzheimer, Auguste D adındaki 51 yaşındaki akıl hastasını izleme aldı. Hastanın ölümüne kadar geçen 5 yıllık süreçte gözlemlediği ileri hafıza ve dil bozukluğu, yönelim bozukluğu, davranışsal (halüsinasyon, sanrılar, sinirlilik bozuklukları, paranoya) durumlar ve bununla birlikte saptadığı makroskobik ve mikroskobik bulgularla bu durumu "serebral korteksin kendine has bir hastalığı" olarak tanımladı. Dr. Alzheimer' ın yüzyılı aşkın bir süre önce tanımladığı klinik gözlemlerin ve patolojik bulguların birçoğu, günümüzde AH konusundaki anlayışımızın merkezindeki yerini korumaya devam etmektedir (**Emilien ve ark. 2012; Korolev 2014**).

Demansın en yaygın nedeni olan Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel belirtiler, davranışsal ve psikolojik belirtiler gösteren ve bununla birlikte kişinin günlük yaşam aktivitelerinin gerçekleştirilmesinde güçlük çekmesine sebep olan kronik bir hastalıktır (**Nahar ve ark. 2017**).

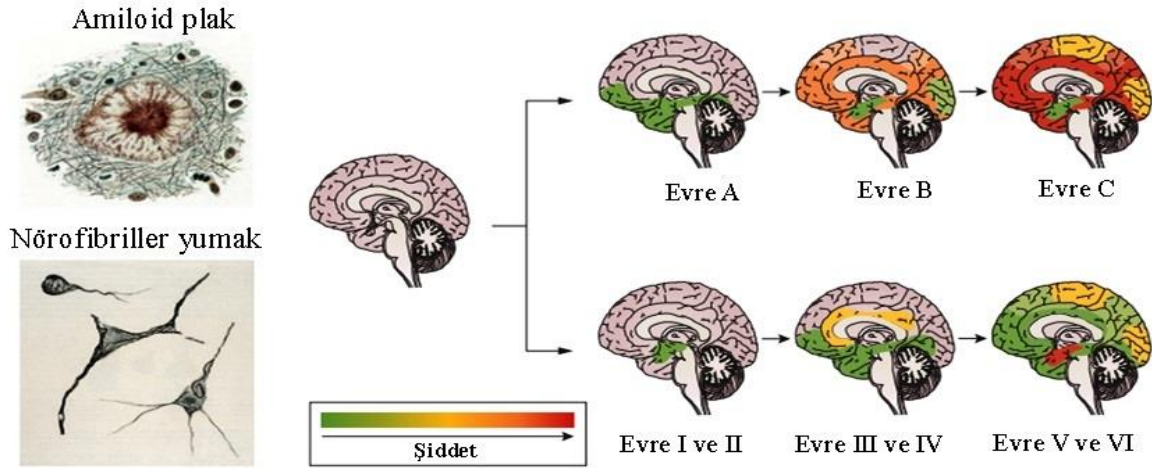
Alzheimer hastalığı, serebral korteks ve hipokampusun geniş alanlarını etkileyen ve aralıksız ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöropatolojik anormallikler, genellikle önce frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda daha sonra da bireyler arasında değişen

oranlarda olmak suretiyle neokorteksin diğer alanlarına yavaş yavaş ilerler. Alzheimer hastalığı iki farklı protein birikimi ile karakterizedir: senil (nöritik plaklar) ve nörofibriller yumaklar. Ekstrasellüler boşluklarda, ve kan damarlarının duvarlarında çözünmeyen amiloid β formlarının ($A\beta$) birikimi nöritik plakları oluştururken, nörofibriller yumak; mikrotübül protein tau'nun nöronlarda agrege olması ile ilişkilidir. $A\beta$; presenilin 1 (PS1, PSEN1 tarafından kodlanmış) ve PS2 (PSEN2 tarafından kodlanmış) içeren kompleks bir enzim ailesi (γ sekretazlar ve β sekretazlar) tarafından amiloid öncü proteininin (APP) proteolitik bölünmesiyle oluşturulur (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. Alzheimer hastalığının önerilen mekanizması (Shaw ve ark. 2007)

Alzheimer hastalığının klinik süreçleri incelendiğinde çeşitli alanlarda monoton gerileme gözlemlenir. Etkilenen bu klinik süreçler; bellek, oryantasyon, konsantrasyon, hesaplama kabiliyeti, dil kabiliyeti, resim kabiliyetinde değişiklikler ve çeşitli işlevsel kapasitelerde kayıp olarak sayılabilir. Hastalık ilerledikçe bu tabloya uzak hafıza bozukluğu, zaman/mekan algısının bozulması ve lisan bozuklukları gibi bilişsel eksiklikler de eklenir (Emilien ve ark. 2012).



Şekil 2. 2. Alzheimer hastalığının patolojik gelişimi (Colin ve ark. 2015)

Son yıllarda artan kanıtlar, Alzheimer hastalığının patogenezinin nöronal bölümlerle sınırlı kalmadığını, beyindeki immünolojik mekanizmaların da dahil edilebileceğini düşündürmektedir. Yanlış katlanmış ve agreg olmuş proteinler mikrogliya ve astrogliya üzerindeki ilgili reseptörlere bağlanarak hastalık progresyonuna ve şiddetine katkı sağlar (Şekil 2.2). Bu bağlanma ile inflamatuvar mediyatörlerin salınması nöroinflamasyonu tetikler (Heneka ve ark. 2015). AH'nin nöroinflamasyonla olan ilişkisine katkı sağlayan bileşenler arasında pentraxin akut faz proteinleri, nöronal tip nikotinik asetilkolin reseptörleri, peroksizomal proliferatörlerin aktive ettiği reseptörler, sitokinler ve kemokinler de mevcuttur. Hem mikrogliya hem de astrositlerin AH'nin patolojik mekanizmasında temel rol oynayan amiloid β proteinini ürettiği gösterilmiştir. A β 'nin kendisinin inflamatuvar bileşenlerin birçoğunun aktivasyonuna neden olan bir pro-inflamatuvar ajan olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Tuppo ve Arias 2005; Zhang ve Jiang 2015).

2016 Dünya Alzheimer raporuna göre dünya üzerinde yaklaşık 46,8 milyon insan Alzheimer tipi demans ile yaşamaktadır. 2050 yılına gelindiğinde bu sayının 131,5 milyon insana ulaşması tahmin edilmektedir (Prince ve ark. 2016). Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre 65 yaş üstü insanlarda AH'nin prevalansı %10-30 iken, insidansı %1-3 arasındadır (Colin ve ark. 2015). Amerika Alzheimer Derneğinin 2017 raporuna göre, Amerika Birleşik Devletlerinde 5,5 milyon insan Alzheimer tipi demans hastasıdır ve yüzyılın ortalarına gelindiğinde bu sayının 13,8 milyona yükselmesi öngörülmektedir. Bugün Amerika'da her 66 saniyede yeni bir Alzheimer tanısı alınmaktadır; 2050 yılına gelindiğinde,

her 33 saniyede bir yeni Alzheimer demans vakasının gelişmesi beklenmekte ve bu da yılda yaklaşık 1 milyon yeni vakaya tekabül etmektedir. Yine Birleşik Devletlerde 65 yaş üstü Alzheimer'lı hastalar için sunulan uzun süreli bakım ve hastaneye yatma hizmetlerinin 2017'deki toplam ekonomik bedelinin 259 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (**Association 2017**).

Türkiye Alzheimer Derneğinin açıklamalarına göre ise, Türkiyede yaklaşık 40bin kişi 65 yaş öncesi başlayan genç Alzheimer hastasıdır. 65 yaş üstünde ise 600 bin insanın Alzheimer tipi demans tanısı aldığı vurgulanmakta ve bu sayının 20 yıl içinde 2 katına çıkması öngörülmektedir (**Anonim 2018**).

2.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) en yaygın görülen hareket bozukluğu ve merkezi sinir sisteminin en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalığını temsil eder. Hastalık James Parkinson tarafından 1817 yılında ilk olarak "Titrek felç" olarak tanımlanmıştır (**Parkinson 2002**).

Parkinson hastalığı (PH) bazal ganglionlarda ve esas olarak da substansiya nigrada bulunan lezyonların sebep olduğu motor veya motor olmayan davranışlarda değişken ölçeklerde bozukluklara yol açan ilerleyici seyreden kronik bir nörodejeneratif hastalıktır.

Parkinson hastalığı genellikle 40-70 yaşları arasında, en sık olarak da 50 ile 60 yaşları arasında başlar. 20 yaşından önce başlarsa juvenil parkinsonizm adını alır ki bu noktada farklı bir dejenerasyon örüntüsü vardır (**Waters 2008**).

PH'nin patolojik bulguları, substantia nigranın özellikle pars kompaktanın ventral komponentini içeren bölgede ileri derecede nöron kaybı olduğu ve nöronlarda Lewy cisimciklerinin biriktiği yönündedir. Ölüm zamanında beynin bu bölgesinin %50-70 oranında nöronlarını yitirdiği tespit edilmiştir (**Davie 2008**). Substantia nigradaki nöronal kaybın sebep olduğu dopamin eksikliği ve α -synuclein agregatlarını içeren hücre içi inklüzyonlar hastalığın nöropatolojik özelliklerini oluşturur (**Poewe ve ark. 2017**).

Büyük ölçüde α -synucleinden oluşan intranöronal protein agregatları Parkinson hastalarının tamamında bulunur. Parkinson hastalığının kalıtsal biçimlerine neden olan α -synuclein kodlayan gen olan SNCA'nın nokta mutasyonlarının varlığı, α -synuclein'in Parkinson hastalığında kilit rol oynadığı fikrini kuvvetle desteklemektedir. Yaşlanan beyinle birlikte proteolitik savunma mekanizmalarında görülen düşüş α -synuclein birikiminde önemli bir rol oynayabilmektedir (**Vekrellis ve ark. 2011; Nalls ve ark. 2014**).

Çalışmalar, α -synuclein monomerlerinin önce oligomerlerin olduğu daha sonra küçük protofibriller ve sonunda da büyük ve çözünmeyen α -synuclein fibrillerinin (Lewy patolojisini oluşturan agregatlar bunlardır) olduğu patojenik bir süreci izleyerek nörotoksik özellik kazanabildiğinin üzerinde durmaktadır (**Xilouri ve ark. 2013; Kaushik ve Cuervo 2015; Poewe ve ark. 2017**).

α -synuclein'in hücre içi homeostazi, ubiquitin-proteazom sistemi ve lizozomal otofaji sistemi tarafından sürdürülür. Bu yolların genetik ya da çevresel sebeplerden ötürü hasara uğramasının yanlış katlanmış proteinlerin yıkılmamasına ve Lewy cisimlerinin gittikçe artmasına sebep olduğu düşünülmektedir (**Poewe ve ark. 2017**).

Dopamin üreten hücrelerin yukarıda belirtilen bazı sebeplerden ötürü kayba uğraması Parkinson hastalığının motor ve motor olmayan (hareketle ilgili olanlar ve hareketle ilgili olmayanlar) belirtilerini ortaya çıkarır. Motor semptomlar dinlenme halinde uzuvlarda görülen titreme (istirahat tremoru), hareketin yavaşlaması (bradikinezi) , kaslarda kasılma (rijidite), hareket edememe (akinezi), postür bozukluğu, tutarsız yürüyüş ve kamburluğu kapsar. Motor olmayan semptomlar arasında ise uyku bozuklukları, kabızlık, koku duyusunun kaybı, depresyon, cinsel işlev bozukluğu ve anksiyetite sayılabilir (**Jankovic 2003; Jankovic 2008**).

Dünya çapındaki verilerin meta analizinin yapıldığı bir çalışmada, yaşla birlikte PH'nin yaygınlaştığını gösterilmiştir (her 100.000 kişi için): 40-49 yaş arasında 41; 50- 59 yaş arası 107; 55-64 yaş arasında 173; 60-69 yaşlarında 428; 65-74 yıl arasında 425; 707 ila 79 yıl arasında 1087; ve 80 yaştan büyük 1903'tür. Coğrafik veriler analizlendiğinde ise 70-79 yaş arasındaki PH'li bireylerin Asyaya nispeten; Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralyada daha yüksek orvea bulunduğu görülmektedir (Pringsheim, Jette ve ark. 2014). Pek çok popülasyonda PH, kadınlara nispeten erkek bireylerde 2 kat daha fazladır. Dişi bireylerin

cinsiyete bağlı hormonları, cinsiyete bağlı genetik mekanizmalar ve çevresel risk faktörlerine maruz kalmada cinsiyete özgü farklılıklar, kadın bireylerdeki farklılıkları açıklayabilir (**Lix ve ark. 2010; Pringsheim ve ark. 2014; Pinter ve ark. 2015; Poewe ve ark. 2017**).

2.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Erken Tanının Önemi ve Tanıda Kullanılan Biyolojik Belirteçler

Birçok çalışmada gösterildiği gibi Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı ve frontotemporal (FTD) demans gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimi, klinik bulguların görülmesinden yaklaşık 10-20 yıl önce başlamaktadır. Çeşitli nörodejeneratif hastalıkların arkasındaki moleküler mekanizmalar birbirinden farklı olmasına rağmen, birçok süreç, örneğin nörit retraksiyonu, sinapsların fonksiyonunu kaybetmesi, yıkılması ve nihayetinde nöronal ölüm, genel olarak nörodejenerasyonun karakteristiğidir (**Bredesen 2009; Sheinerman ve Umansky 2013**).

Nörodejeneratif hastalıklarda kognitif bozukluğun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan tanı aracı, belirlenmiş klinik kriterlere dayanmaktadır. Bununla birlikte, özellikle erken evrelerde veya atipik türevlerde, hastalıklar arasındaki ayırıcı tanı güç olabilir (**Gómez-Río ve ark. 2016**).

Alzheimer hastalığı nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en yaygın görüleni olmasından ötürü, aktif olarak en sık çalışılan ve hakkında tanı araçları ve terapötik tedavilerin en çok geliştirilenidir.

AH'nin tanı süreci hastanın eğitim durumu, sosyoekonomik düzeyi gibi bilgilerin yer aldığı öyküsünün dinlenmesi ve fiziki muayene ile başlar. Daha sonra uygulanan çeşitli nöropsikiyatrik testlerle hafıza, dikkat, hesaplama yeteneği, hatırlama, dil gibi kabiliyetleri ölçümlenir (**Ayçiçek 2017**). Genetik başlangıçlı AH'de özellikle APP, PSEN1 ve PSEN2'nin ölçüldüğü Laboratuvar testleri önemlidir. Beyin omurilik sıvısında, amiloid, artmış tau proteini seviyeleri tanıda destekleyici olabilmektedir. Nörogörüntüleme teknikleri arasında MR ve kontrastsız bilgisayarlı tomografi fayda sağlayabilmektedir. FDG-PET, beyinde hipometabolizmanın, fonksiyonel MR (fMR) ve SPECT ise hipoperfüzyonun tanılanmasında kullanılabilecek tekniklerdendir. frontotemporal demans ve AH ayırıcı tanısında PET görüntüleme oldukça fayda sağlamaktadır. Amiloid plaklarının PET ile görüntülenmesi, β

amiloid yükünü ölçmek için kullanılabilir. Bu teknik genç hastalarda ayırıcı tanıda dikkat çekici olmakla birlikte, yaşlı bireylerde kognitif bozulmadan bağımsız olarak amiloid plakların birikebilme ihtimali göz önüne alındığında tetkikin ileri yaşta spesifitesi azalmaktadır. AH'nin kesin tanısı ancak hispatolojik olarak konulabilir ki bunun da elbette pratikte uygulanması mümkün değildir (**Knopman ve ark. 2001; Foster ve ark. 2007; Goldman ve ark. 2011**).

Parkinson hastalığı klinik olarak bradikineziye ek olarak esas teşkil eden bir motor özelliği (rijidite veya istirahat titremesi) ile karakterize edilir. Motor özelliklerin bozulmasının yanı sıra PH'da uyku döngüsü, halüsinasyon, duygudurum bozuklukları gibi motor olmayan semptomlar da gözlenir.

Parkinson hastalığında ¹⁸F etiketli l-DOPA ve PET kullanılarak striatal dopamin tükenmesinin görselleştirilmesi, 1980'lerin başında moleküler beyinsel görüntüleme bir atılım oldu. O zamandan beri çeşitli nörogörüntüleme teknikleri geliştirilmiştir. Örneğin, ¹²³I-ioflupane tek foton emisyonu CT (SPECT) (DaTscan olarak da bilinir), klinik rutinde kullanım için onaylanmış bir tekniktir. Yapısal manyetik rezonans görüntüleme (MRG), semptomatik parkinsonu tanımlamada oldukça yardımcıdır ve çeşitli MRG teknikleri atipik parkinsonizmdeki bazal gangliyonlarda ve infratentorial yapılarda gözlenen spesifik değişiklikleri ortaya çıkarabilir (**Garnett ve ark. 1983; Mahlknecht ve ark. 2010; Politis 2014; Stoessl ve ark. 2014**).

Bahsedilen tüm bu yöntemler – özellikle nörogörüntüleme- AH ve PH'nin tanı almasında çok kıymetli bilgiler sunmakla birlikte klinik belirtileri ortaya çıktıktan sonra tanıya yardımcı olan araçlardır. Ayrıca bu araçların bazılarının spesifitelerinin düşük olması, bazılarında kullanılan etiketli elementlerin yarı ömrünün kısa olması ve nispeten pahalı teknikler olmaları kullanılabilirliklerine sınırlamalar getirmektedir (**Henriksen ve ark. 2014**).

Yaşlı bireylerin otopsi bulgularında ortaya çıkan plaklar, yumaklar ve Lewy cisimcikleri, AH ve PH'nin klinik öncesi fazının çok uzun sürdüğünü göstermektedir ki bu durum klinik öncesi fazın karakterizasyonunun hayati bir hedef olmasına yol açmıştır. Aslında, AH demansını ortaya çıkmasından sonra iyileştirmek yerine, başlamasını önlemeye çalışmak fikri, on yıllar önce kök salmıştı; birçok araştırmacı, miyokardiyal ve serebral enfarktüs gibi AH'nin uygun terapi ile önlenebileceğini öne sürüyordu. Örneğin kan

basıncının ve kan lipid profilinin ölçülmesinin kalp krizi ve felcin önlenmesinde esas olduğu ve benzer şekilde etkili biyomarkerlarla (biyolojik belirteçlerle) risk altındaki kişilerin AH'nin klinik belirtileri öncesinde tedavi edilebileceği öne sürülmektedir (**Braak ve Braak 1997; Beach 2017**).

Tam bu noktada, "biyomarker" (biyobelirteç) tanımından ve gelişim sürecinden bahsetmek gerekir. Pubmed verileri "biyomarker" başlıklı ilk yayının 1980 yılına ait olduğunu ve meme kanserine ait bir serum biyomarkerından bahsettiğini göstermektedir. Daha sonra bu alvea çalışmaların hız kazanmasından ötürü 2001 yılında Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) bir biyomarkerı (biyobelirteç) objektif olarak ölçülebilen, terapötik müdahale için normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak değerlendirilebilen bir karakteristik olarak tanımlamıştır (**Colburn ve ark. 2001**). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), biyomarkerlar (biyolojik belirteçler) için biyolojik sistemle potansiyel bir tehlike arasındaki etkileşimi yansıtan kimyasal, fiziksel veya biyolojik olabilecek hemen hemen her ölçümü içeren ifadesini kullanarak daha geniş bir tanımlama yapmıştır. Ölçülen bu yanıt, hücresel düzeyde işlevsel, fizyolojik veya biyokimyasal olabilir (**Blennow ve ark. 2015; Beach 2017**).

Alzheimer demansının klinik ayrıntılara ve geçmişe dayanan kesin tanısı zor ve zorlayıcıdır. Bununla birlikte, tanı biyomarkerların desteğiyle kesinlik düzeyine yükseltilebilir (**Nahar ve ark. 2017**). Alzheimer hastalığı demansının teşhisi için Yaşlanma-Alzheimer Birliği Ulusal Enstitüsü biyobelirteçler ifadesini araştırma amaçlı olarak ve "mevcut olduğu yerde ve klinisyen tarafından uygun görüldüğünde kullanılabilen opsiyonel klinik araçlar" olarak önermiştir. Biyobelirteç testi, AH'nin teşhisini sürecin kanıtına katkı sağlayarak daha kesin bir düzeye getirir (**McKhann ve ark. 2011; Sheikh-Bahaei ve ark. 2017**).

Biyobelirteçler klinik manada farklı amaçlarla kullanılabilir: (1) Tanılar arasında farklılığı sağlamak için; örneğin PH ile diğer nörodejeneratif bozukluklar arasındaki farkı değerlendirilmesinde. Farklılıklar bulunsa bile, bunlar hasta grupları arasında bulunur ve hiçbiri bireysel hastaların teşhisinde yardımcı olmak için yeterince duyarlı değildir. Dahası, karşılaştırmalar tipik olarak güvenilir tanı almış hasta grupları arasında yapılmaktadır ki erken ya da sorunlu vakalarda tanıya yardımcı olacak biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. (2) Hastalığın klinik öncesi aşamada tanımlanması nörodejeneratif hastalıklar için özellikle önemlidir ve çoğu biyolojik değişiklikler tanıdan yıllarca önce ortaya çıkar. (3) Biyobelirteçler, özellikle

ilaç çalışmalarında hastaları takip ederken de kullanılabilir. Örneğin multipl sklerozda manyetik rezonans görüntüleme (MRI) verilerinin ilaç çalışmalarında birincil sonlanım noktası olarak kullanılması gibi biyobelirteçler de kullanılabilir.(4) Biyolojik belirteçlerin çok önemli bir özelliği, değişime neden olan temel süreçlerin anlaşılmasına yardımcı olmak ve böylece sürece müdahale edebilmektir (Le ve ark. 2017).

Ne yazık ki, klinisyenler ve bilim adamları erken teşhisin önemi ve gerekliliğinin farkında olmalarına rağmen bugüne dek, prodromal veya prelinik fazda nörodejenerasyonun başlangıcının kesin olarak tahmin edilmesi için klinik olarak onaylanmış hiçbir biyolojik gösterge kullanılmamıştır. Bu nedenle, nörodejeneratif hastalıkların erken teşhisi için spesifik biyolojik belirteçlerin keşfedilmesi ve tanımlanması üzerinde daha fazla çaba harcamaya ivedilikle ihtiyaç vardır.

Alzheimer Birliği Ronald ve Nancy Reagan Enstitüsü ve Yaşlanma Ulusal Enstitüsü ideal bir biyolojik belirteç ve ilgili çalışmaların kriterleri için 1998 yılında bir kılavuz yayınladı. İdeal bir biyolojik belirtecin, hastalığın başlangıcında AH'yi yakalayabileceğini, hastalığın nöropatolojisinin en az bir temel özelliğini tespit edebileceğini, AH'yi diğer demanslardan ayırt edebileceğini ve teyit edilmiş AH vakalarında doğrulama sağlayabilmesi gerektiğini bildirdiler.

Biyobelirteç adayının öne çıkan özelliklerinden bazıları şu şekilde listelenmiştir:

- Fizyolojik yaşlanma süreçlerini yansıtır.
- Merkezi sinir sisteminin temel patofizyolojik süreçlerini yansıtır.
- Farmakolojik müdahaleye tepki gösterir.
- Yüksek hassasiyet gösterir.
- Yüksek özgüllük gösterir.
- Zaman içinde tekrarlanabilir ve güvenilir ölçümlere sahiptir.
- Dünya çapındaki laboratuvarlarda tekrarlanabilirliğe sahiptir.
- İnvaziv olmayan, kolay uygulanan testlerde ölçülebilir olmalıdır.
- Uygulanan kişilere zarar vermemelidir.
- Testler düşük maliyetli, basit ve hızlı olmalıdır.
- Taşınma sırasında stabilitesini koruyabilmelidir.
- Sadece hastane ortamında değil başka alanlarda toplanan sıvılarda da uygulanabilmelidir.

- Güvenilir araştırmacılarla yapılmış çalışmalar en az iki bağımsız çalışmayla doğrulanmalı ve sonuçları hakemli dergilerde yayınlanmalıdır.
- Alzheimer Hastalığı'nı saptamadaki tanısal duyarlılığı >%85, diğer demanslardan ayırt etmedeki özgülüğü >%75'in üzerinde olmalıdır (**Growdon ve ark. 1998; Kerman ve Tamiya 2006; Humpel 2011; Hanağası 2012**).

Bu amaçla araştırmacılar serum, tükürük, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve biyopsilerdeki olası potansiyel biyolojik belirteçleri değerlendirmişlerdir (**Delenclos ve ark. 2016**). Serumun yanı sıra klinik muayene için umut verici alternatif bir yaklaşım, beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan biyokimyasal belirteçlerin kullanılmasıdır. BOS, beyin ve omurilikten gelen intersitisiyel sıvının bir devamıdır. Beyindeki nöropatolojik değişiklikler veya kritik işlevsel yolları etkileyen biyokimyasal süreçler BOS'un kompozisyonuna doğrudan yansır. Alzheimer hastalığı patolojilerine ait BOS belirteçleri ölçümlenerek Alzheimer hastalığının patolojisinin mevcut olup olmadığı belirlenebilir. AH için temel BOS biyobelirteçleri, amiloid β 1-42 ($A\beta$ 1-42), total-tau (t-tau) ve fosfo-tau181 (p-tau) olup sırasıyla senil plaklarda $A\beta$ depolanmasına, nöronal ölüme ve tau'nun nörofibriller yumrular içindeki hiperfosforilasyonuna karşılık gelir. AH'li hastalar normal kontroller ile kıyaslandığında daha düşük $A\beta$ 1-42 seviyesi ile daha yüksek t-tau ve p-tau seviyeleri ve özellikle t-tau / $A\beta$ 1-42 veya p-tau / $A\beta$ 1-42 oranının yüksekliğine % 85-90'a varan hassasiyet ve özgülükle sahiptirler (**Galimberti ve Scarpini 2008; Sheikh-Bahaei ve ark. 2017**). Tau ve $A\beta$, beyin omurilik sıvısından ELISA ile kolaylıkla ölçülür. AH'li binlerce hastanın yanı sıra sağlıklı ve hastalarda yaygın olarak incelenen AH biyolojik belirteçleridir (**Clark ve ark. 2006; Thal ve ark. 2006; Shaw ve ark. 2007**).

Altı çizilmesi gereken nokta, bahsedilen BOS biyobelirteçlerinin hepsinin birer potansiyel olduğu ve tanıda hâlâ aday statüsünde olduğudur. Bununla birlikte bu alanda yapılan çalışmalar gittikçe hız kazanmaktadır.

Beyin omurilik sıvısı ve görüntüleme belirteçleri en çok ilerleme kaydedilen ve kullanıma en yakın olan belirteçlerdir. Bununla birlikte, kan temelli biyolojik belirteçlerin uygulanabilir olduğuna ve başarı sağlanabilirse, özellikle klinik çalışmalar bağlamında belirli bir yere sahip olabileceğine dair umut verici bulgular vardır (**Henriksen ve ark. 2014; Huynh ve Mohan 2017**). Kan temelli biyolojik belirteçlerin potansiyel avantajı açıktır - kan alma, diğer vücut sıvılarına göre daha kolay ve acısızdır ve kan temelli testler, yüksek

verimlilik ve ucuz ölçümlere sahiptir. Kan temelli belirteçler, zayıf yaşlı insanların bile tekrarlanan ölçümler yapmalarına imkan verebilmektedir. Toplumda birinci basamak bakım hizmetleri veren sağlık kuruluşları veya hastanın evinde rutin olarak tetkik edilebilen kan temelli bir belirteç elde edilebilir. Ayrıca kan biyobelirteçlerinin bir kısmı, BOS ve genetik biyolojik belirteçlere göre diagnostik açıdan daha doğru görünmektedir, ancak daha fazla doğrulama gereklidir. Bununla birlikte, kan temelli biyolojik belirteçlerin merkezi sinir sistemi hastalıkları açısından zorlukları da eşit derecede açıktır; periferik kan beyinle doğrudan bağlantılı değildir. (Thambisetty ve Lovestone 2010).

Alzheimer hastalığına ait potansiyel - aday biyobelirteçler buldukları vücut sıvısına göre Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir. Proteomiks alanındaki hızlı gelişmeler bu tablonun sürekli yenilenmesini ve validasyonuna katkı sağlamaktadır.

Çizelge 2. 2. Alzheimer hastalığının potansiyel biyobelirteçleri

Analit	Vücut Sıvısı	Referans
Tau (tTau ve pTau)	Serum, BOS	(Clark ve ark. 2006; Thal ve ark. 2006; Shaw ve ark. 2007; Anoop ve ark. 2010; Genius ve ark. 2012; Zetterberg ve ark. 2013; Blennow 2017; El Kadmiri ve ark. 2017; Huynh ve Mohan 2017; Henriques ve ark. 2018)
A β ve antikorları	Serum, BOS	(Clark ve ark. 2006; Thal ve ark. 2006; Shaw ve ark. 2007; Anoop ve ark. 2010; Humpel 2011; Genius, ve ark. 2012; Blennow 2017; El Kadmiri ve ark. 2017; Huynh ve Mohan 2017; Henriques ve ark. 2018)
α -Antikimotiropsin	Kan, BOS	(Abraham ve ark. 1988; DeKosky ve ark. 2003; Shaw ve ark. 2007; Tyagi ve ark. 2013)
Amiloid öncül proteini (APP)	BOS	(Sennvik ve ark. 2000; Shaw ve ark. 2007; Blennow ve ark. 2010; Lewczuk ve ark. 2010; Blennow ve ark. 2015; Alexopoulos ve ark. 2017; Huynh ve Mohan 2017; Müller ve ark. 2017)

Devam **Çizelge 2.2.** Alzheimer hastalığının potansiyel biyobelirteçleri

APP izoformları	Plateletler	(Baskin ve ark. 2000; Padovani, Borroni ve ark. 2002; Shaw ve ark. 2007)
β -Sekretaz (BACE)	Plateletler	(Chintamaneni ve Bhaskar 2012; Huynh ve Mohan 2017)
CD59	Serum, plazma, BOS	(Shaw ve ark. 2007; Donev ve ark. 2009)
C-reaktif protein	Serum, plazma, BOS	(Shaw ve ark. 2007; Kravitz ve ark. 2009; Mancinella ve ark. 2009; Thambisetty ve Lovestone 2010; Humpel 2011; Strang ve ark. 2012; Yarchoan ve ark. 2013; Slevin ve ark. 2015; Sharma ve Singh 2016)
Clq	Serum, plazma, BOS	(Simonsen ve ark. 2007; Zhou ve ark. 2008; Fagan ve Holtzman 2010)
8-hidroksi-deoksiganin	BOS, plazma, idrar	(Shaw ve ark. 2007; Pantel ve Hampel 2010)
Glutamin sentetaz	Serum, BOS	(Tumani ve ark. 1999; Sultana ve Butterfield 2010; Timmer ve ark. 2015)
Interlökin-6-reseptör kompleks	Serum, BOS	(Shaw ve ark. 2007; Chalaris ve ark. 2011; Chintamaneni ve Bhaskar 2012)
Kallikrein	BOS, plazma	(Diamveis ve ark. 2000; Ashb ve ark. 2010)
Melanotransferrin	Serum, BOS	(Rachakonda ve ark. 2004; Bailey 2007; Aftab ve Waraich 2012)
Nörofilament proteins	BOS	(Tortelli ve ark. 2012; Scherling ve ark. 2014; Wurtman 2015)
Nitrotirosin	BOS	(Sunderlve ve ark. 2006; Shaw ve ark. 2007; Galasko ve Montine 2010; Butterfield ve ark. 2011)
Oksisterols	Plazma, BOS	(Thambisetty ve Lovestone 2010; Leoni ve Caccia 2011; Lehmann ve ark. 2013)
S100 β	Kan, BOS	(Chintamaneni ve Bhaskar 2012)
α -2-macroglobulin	Kan, BOS	(Song ve ark. 2009; Anoop ve ark. 2010; Dursun ve ark. 2015; Huynh ve Mohan 2017)

Devam **Çizelge 2.2.** Alzheimer hastalığının potansiyel biyobelirteçleri

Apolipoprotein E (APOE)	BOS	(Huynh ve Mohan 2017)
Neurogranin (ngn)	BOS	(Kester ve ark. 2015; Blennow 2017; Huynh ve Mohan 2017; Henriques ve ark. 2018)
YKL-40	BOS	(El Kadmiri ve ark. 2017; Huynh ve Mohan 2017)
Visinin-like-protein- 1 (VILIP-1)	BOS	(El Kadmiri ve ark. 2017; Huynh ve Mohan 2017)
İsoprostatanlar		(Mufson ve Leurgans 2010; Henriques ve ark. 2018)
Tümör Nekrozis faktör α		(Sharma ve Singh 2016)
NFL neurofilament light	Kan	(Zetterberg ve ark. 2016; Blennow 2017)
Transforming growth factor β		(Chintamaneni ve Bhaskar 2012)

Parkinson hastalığı genellikle klinik öykü ve motor semptomlara dayanarak teşhis edilir. Motor semptomlar ortaya çıktığında, substantia nigra (SN) pars compacta'daki dopaminerjik nöronların % 60' ının çoktan kaybedildiği ve hastalığın biyolojisinin orta veya geç evrede olduğu düşünülmektedir (Le ve ark. 2017). Bununla birlikte hastalığa ait nörodejenerasyon yıllar önce başlamaktadır (Parnetti ve ark. 2013). Ayrıca, sınırlı klinik ve beyin görüntüleme değerlendirmesi dışında, tipik olarak pahalı olan Parkinson hastalığının progresyonunu izlemek veya deneysel tedavilerin etkinliğini değerlendirmek için belirlenmiş bir objektif ve / veya etkin yöntem bulunmamaktadır (Hong ve ark. 2010).

PH için erken tanı, hastalığı tedavisinin geliştirilmesine yönelik güncel çabalar göz önüne alındığında öncelik taşımaktadır. Ayrıca, PH tanısının doğruluğunun artırılması, hastalığın çoklu sistem atrofisi (MSA), ilerleyici supranükleer palsi (PSP) ve kortikobazal dejenerasyon (CBD) gibi diğer parkinsonizm biçimlerinden ayrılmasına yardımcı olacaktır. Geliştirilecek biyobelirteçler PH'nin tanımlanmış olan alt tiplerinin birbirinden ayırt edilmesini de sağlayabilecektir (Wu ve ark. 2011; Marras ve Lang 2012).

PH için güvenilir biyolojik belirteçlerin bulunması için yoğun araştırmalar sürmektedir. Beyin omurilik sıvısı (BOS), yaşayan hastalarda PH'nin biyolojik belirteçlerinin potansiyel bir kaynağıdır, çünkü hastalıklı beyin ile doğrudan temas halindedir. BOS havuzu proteinlerini, hem kan temelli proteinler hem de beyin dokusu temelli proteinler oluşturmaktadır (**Van Dijk ve ark. 2010**).

Diğer nörodejeneratif hastalıklarda da olduğu gibi PH'de de biyolojik belirteçleri genetik temelli, görüntüleme temelli ve BOS-kan temelli biyobelirteçler olarak ayırmak mümkündür (**Poewe ve ark. 2017**).

PH'nin erken tanısı için pek çok biyobelirteç önerilmiştir, bunlar arasında en çok çalışılanları ve en etkin olanları α -sinüklein, DJ-1 (Parkinson hastalığı protein-7), ve bazı lizozomal enzimlerdir (**Parnetti ve ark. 2013**). PH'ye ait bazı potansiyel biyobelirteçler Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 3. PH için potansiyel biyobelirteçler

Analit	Vücut Sıvısı	Referans
Sinüklein alfa	BOS	(Hong ve ark. 2010; Stefanis 2012; Parnetti ve ark. 2013; Gao ve ark. 2015; Atik ve ark. 2016; Bergström ve Ingelsson 2016; Shalash ve ark. 2017)
DJ-1 (PARK-7)	BOS, tükürük	(Hong ve ark. 2010; Devic ve ark. 2011; Parnetti ve ark. 2013; Masters ve ark. 2015; Ariga ve Iguchi-Arigo 2017; Poewe ve ark. 2017)
Apolipoprotein A1	Plazma	(Qiang ve ark. 2013; Chahine ve ark. 2014; Swanson ve ark. 2015)
Ürat	Serum	(de Lau ve ark. 2005; Chahine ve ark. 2014; Le ve ark. 2017)

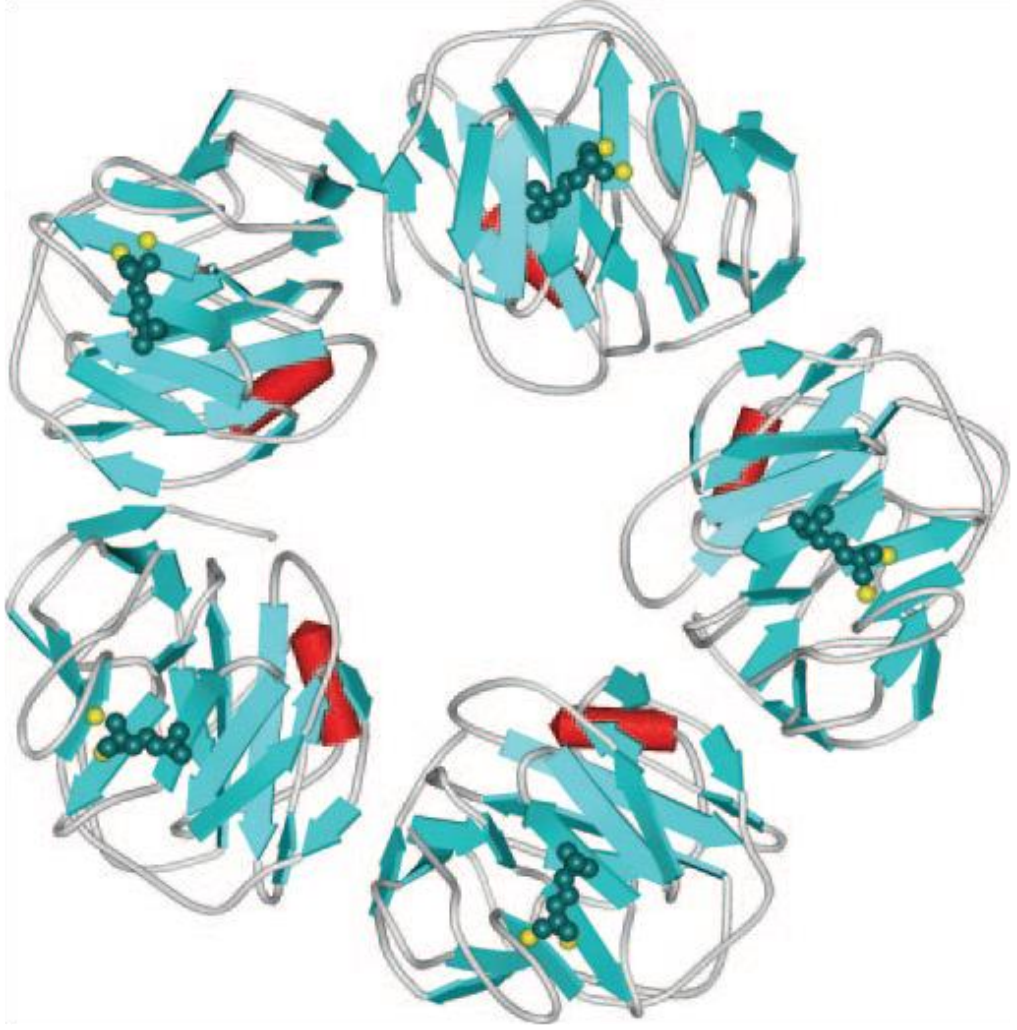
2.5. C-reaktif Protein

C reaktif protein (CRP) 1930'da Rockefeller Üniversitesi'nden William S. Tillet ve Thomas Francis tarafından keşfedildi. Bu araştırmacılar, akut pnömokok pnömonili hastaların kanlarındaki bir maddenin bakterilerin hücre duvarında bulunan C-polisakkarit ile reaksiyona girdiğini tespit ettiler. C reaktif madde adını verdikleri bu madde enfeksiyonların seyirinden

çok önce ortaya çıkmaktaydı ve kanda yüksek konsantrasyonlarda bulunuyordu. Hasta enfeksiyondan kurtulduğundaysa, kanda bu maddeye rastlanamıyordu. CRP' nin C-polisakkarit ile etkileşimi, tamponda kalsiyumun varlığına bağlıydı. Maddenin bir protein olduğu tespit edildiğinde, C reaktif protein veya CRP adını aldı (**Tillett ve Francis 1930; Du Clos ve Mold 2004**).

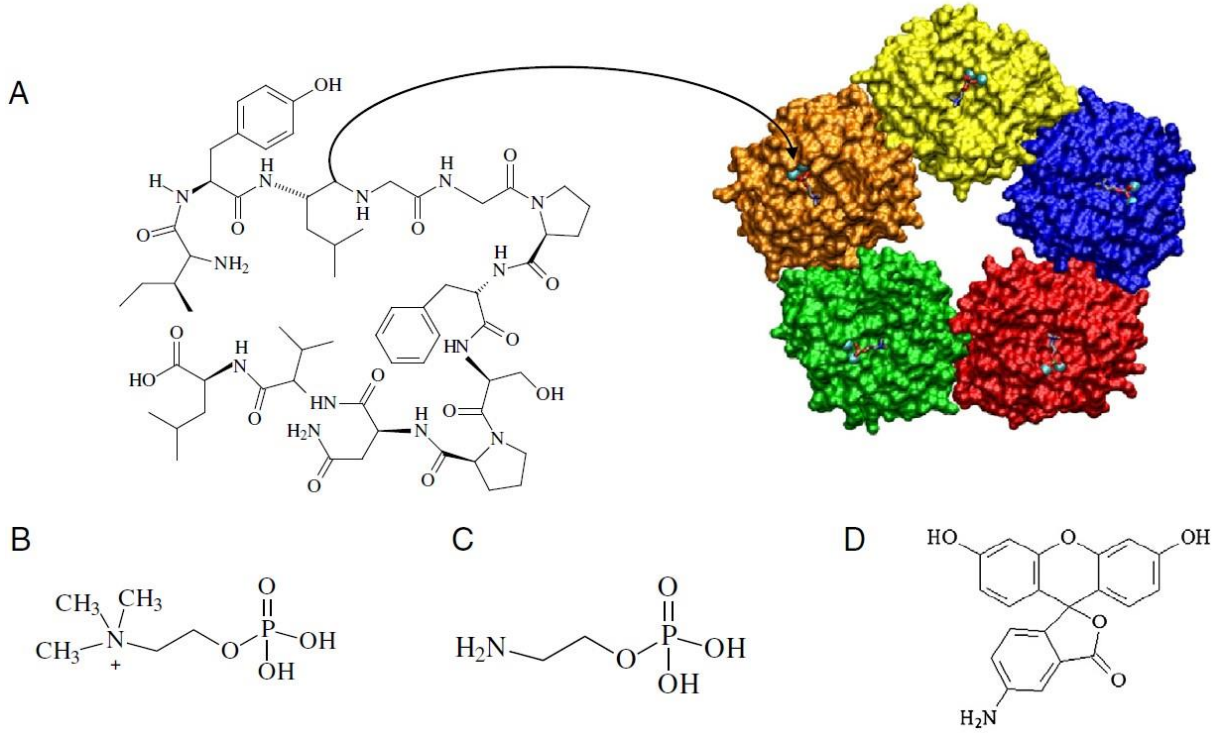
CRP, insanlarda yalnızca yaklaşık 75 yıl önce keşfedilmesine rağmen, antik bir moleküldür; at nalı yengeci ya da *Limulus polyphemus* gibi uzak türlerde dahi mevcut bir proteindir (Şekil 2.3.). At nalı yengeci antik bir türdür ve mevcudiyeti dünyadaki dinazorların ortaya çıkmasından 70 milyon yıl öncesine dayanmaktadır. Bu organizmalar enfeksiyona karşı savunma mekanizmalarını CRP'nin yanı sıra lektinler, limulin ve serum amiloid P bileşeni (SAP) gibi moleküllere borçludurlar (**Du Clos ve Mold 2004**).

CRP, disk benzeri merkezi bir gözenek etrafında simetrik olarak düzenlenmiş, her biri 23 kDa olan, non kovalent bağlı beş özdeş alt birimden oluşan “pentraxin” ailesinden bir akut faz proteindir. Diskin bir yüzü ligand bağlama yüzüdür ve B olarak belirlenmiştir. B yüzü, protomör başına bağlı iki kalsiyum iyonunun varlığı ile karakterizedir. Kalsiyum iyonları molekülün kararlılığı ve ligandların bağlanması için önemlidir. Karşıt A yüzünün ise C1q ve Fc reseptörleri ile etkileşime girdiği düşünülmektedir. A yüzünde bir yarı, protomörün merkezinden pentamerin merkezi gözeneğine kadar uzanır ve bu yarı sınırları boyunca Asp-112 ve Tyr-175 de dahil olmak üzere CRP'nin C1q'e bağlanması için kritik olan kalıntıları içerir. Protomörler kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulur ve eğer yüksek pH ile ayrışırsa yeniden birleştirilemezler. CRP'nin yüksek konsantrasyonlarda, kendi kendine toplanma eğilimi vardır. Pentamer, ısıtmaya ve proteaz saldırısına karşı dayanıklıdır (**Agrawal ve ark. 2001; Black ve ark. 2004; Du Clos ve Mold 2004**).



Şekil 2. 3.CRP'nin 3 boyutlu yapısı (Steven Black ve ark. 2004)

CRP, tanımlanan ilk akut faz proteinidir ve iltihaplanma ve doku hasarının hassas bir sistemik belirteçidir. Akut faz tepkisi; doku hasarı, enfeksiyon, inflamasyon ve malign tümörler için non-spesifik fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri içerir. İnsanlarda, CRP'nin plazma seviyesi, akut bir inflamatuvar uyarın sonrasında, hepatositlerin sentezini artırarak, 1000 kat veya daha fazla olarak belirgin bir şekilde yükselebilir (Black ve ark. 2004). Konsantrasyonunun akut faz yanıtındaki ani yükselmesi ve sonrasındaki hızlı düşüşün yanı sıra, diüurnal varyasyon göstermemesi ve cinsiyet ile yaş gibi özelliklerde farklılaşmaması dikkat çekici biyolojik özelliklerindedir (Sisman ve ark. 2007).



Şekil 2. 4. CRP proteininin amino asit bileşenlerinin moleküler gösterimi, (B) fosfokolin, (C) o-fosforiletanolamin, (D) floreseinamin (Algarra ve ark. 2013)

İnflamasyon belirtici olmasının yanında, bu kadim protein pek çok biyolojik işleve de sahiptir. Biyolojik zarlarda bulunan fosfokoline kalsiyum aracılı olarak bağlanır. Bu bağlanmayla aktive olan bu yolak, fosfokolin içeren mikroorganizmaların, ölü ya da hasarlı hücrelerinin fagositozunu sağlar. CRP'nin bu mekanizması, doğal savunma sisteminin ilk adımıdır. Ayrıca CRP'nin VLDL ve LDL'nin yapısına girdiği de ileri sürülmektedir. Nekrotik ve apoptotik doku hücrelerinin temizlenmesine katkı sağlayarak hasarlı dokunun iyileşmesine yardımcı olur. Ancak bağışıklığın diğer elemanları gibi, metabolizmaya sağladığı faydalarının yanı sıra zararları da mevcuttur (Sisman ve ark. 2007). Şekil 2.4. CRP'nin yapısında bulunan aminoasitleri göstermektedir.

Sağlıklı genç erişkinlerde CRP'nin ortalama konsantrasyonu 3,0 mg/L iken bir inflamasyonla karşılaşıldığında 10 bin kat artarak 500 mg/L'ye varabilir. Plazma CRP, sadece sitokin IL-6'nın transkripsiyonel kontrolü altındaki hepatositler tarafından üretilmektedir. CRP'nin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 19 saattir ve sağlıklı da hastalık koşullarında da sabittir, böylece dolaşımdaki CRP konsantrasyonunun tek belirleyicisi sentez hızıdır,

dolayısıyla bu durum CRP üretimini uyaran patolojik sürecin niteliğini doğrudan yansıtır **(Pepys ve Hirschfield 2003)**.

CRP'nin kardiyometabolik hastalıkların patogeneğinde ve bilhassa aterosklerozda önemli bir inflamasyon belirteci olduğuna dair dikkat çekici çalışmalar vardır **(Sisman ve ark. 2007; Packard ve Libby 2008; Uno ve Nicholls 2010)**. Bununla beraber, CRP obezite **(Fernández-Bergés ve ark. 2014; Motie ve ark. 2014; Babaei ve ark. 2015)** ve diyabette **(Wang ve ark. 2013; Dezayee ve Al-Nimer 2016)** önemli bir diagnostik parametredir. Ayrıca, çeşitli kanser türlerinde CRP'nin hem diagnostik hem de prognostik belirteç olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur **(Pierce ve ark. 2009; Allin ve Nordestgaard 2011; Hong ve ark. 2012; Martino ve ark. 2013)**.

CRP ve amiloid P'nin içinde bulunduğu pentraxinler, vücudun birçok patolojik durumunda bulunan bir akut faz proteini ailesidir. Doku hasarından veya inflamasyondan sonra seviyeleri önemli ölçüde yükselme eğilimi gösterir **(Tuppo ve Arias 2005)**. Nöroinflamasyon, merkezi sinir sisteminin bağışıklık yanıtlarının geniş bir yelpazesini tanımlamak için kullanılan, periferik inflamasyondan farklı olarak mikrogliya ve astrositler gibi hücrelerle ilgili bir terimdir. Endotelyumun son derece özelleşmiş bir formu olan kan beyin bariyeri, periferik inflamasyondan türetilen pro-inflamatuar mediatörler için geçirgenlik sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bu mediatörleri serbest bırakmak, iletmek ve lökositin beyne geçişine izin vermek için uyarılabilir. Bu nöroinflamatuvar yanıt; sinaptik bozukluk, nöronal ölüm ve beynin içindeki çeşitli hastalık patolojilerinin alevlenmesi ile sonuçlanır **(Lyman ve ark. 2014)**. Nöroinflamasyonun pek çok potansiyel belirteci vardır; bunlar içerisinde yer alan CRP; IL-6 ve IL-1 aktivasyonunun aracılık ettiği inflamasyonunun genel bir tanı belirteci olarak kullanılır. Esas olarak hepatositler tarafından üretilen CRP'nin, senil plaklar ve nörofibriler yumrular ile ilişkili olduğu bulunmuştur **(Osera ve ark. 2012)**.

Yapılan çalışmalar CRP'nin Alzheimer'lı bireylerde potansiyel bir belirteç olduğunu (Çizelge 2.2), konsantrasyonunun arttığını **(O'Bryant ve ark. 2013; Yarchoan ve ark. 2013; Gong ve ark. 2016)** ve yine AH'li hastalardan alınan beyin kesitlerinde senil plaklar ile birlikte lokalize olduğunu göstermiştir **(Strang ve ark. 2012)**. Hastalığın ilerleyen yaşla birlikte ilerlemesi CRP'nin konsantrasyonunu daha da arttırmıştır ki bu durum nörodejenerasyonun inflamasyon elemanlarıyla indirekt bir iletişim halinde olduğunun göstergesi olarak sayılmıştır **(Kravitz ve ark. 2009)**.

2.6. Tau proteini

1975 yılında, tau proteini, domuz beyininden mikrotübüle bağlı bir faktör olarak izole edildi. Bir önceki yıl, Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde nörofibriler yumrulara eşleştirilmiş bir heliks filament (PHF) proteini tespit edildi, ancak 1986 yılına kadar PHF proteini ile tau'nun aynı olduğu keşfedilemedi (**Iqbal ve ark. 2016**).

Memeli MSS gelişim süreci nöronların oluşumu, göçü ve farklılaşmasına ihtiyaç duymaktadır. Bu hücrel olayların her biri son derece dinamik bir mikrotübül hücre iskeletine ihtiyaç duyar. Ayrıca, mitozda kromatidlerin ayrılması, göç sırasında çekirdek translokasyonu ve nöritlerin büyümesi için de gereklidir. Mikrotübüller, genlerin ve proteinlerin en büyük ailelerinden birinin iki üyesi olan α - ve β -tubulin'in küresel bir altbirimlerinden oluşan polimerlerdir (**Avila ve ark. 2016**).

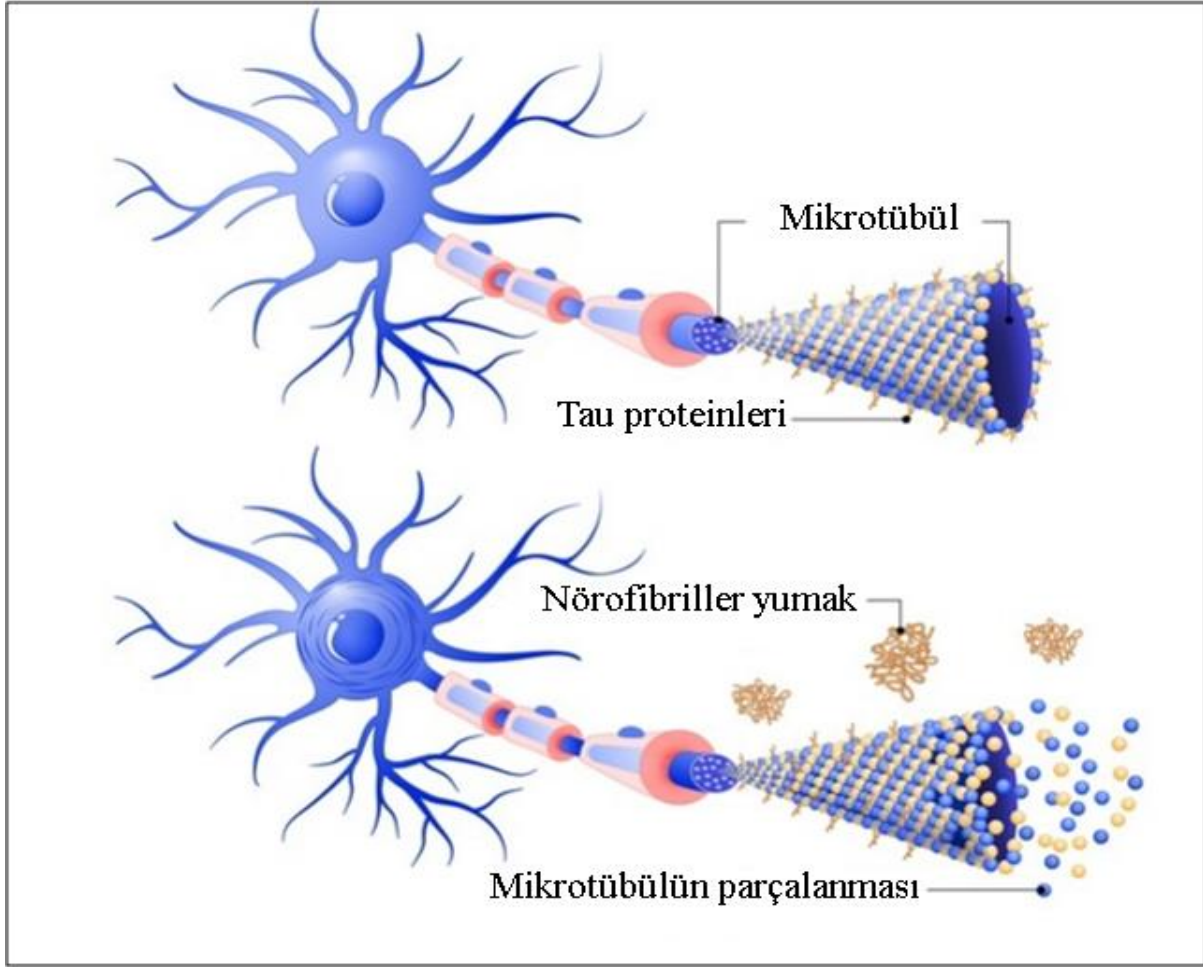
Tau esas olarak aksonlarda bulunan ve mikrotübüllere bağlanarak onları stabilize eden normalde katlanmamış halde bulunan bir proteindir. Mikrotübüller hücre iskeletini oluşturur ve hücrenin yapısal bütünlüğünü korumak ve besin maddelerini hücre gövdesinden sinaptik terminallere taşımak açısından kritik öneme sahiptir (**Spillantini ve Goedert 2013; Dani ve ark. 2016**).

İnsan tau proteini, 17 nolu kromozom üzerinde bulunan MAPT geni tarafından kodlanır. MAPT geni 16 ekson içermektedir; ekson 0 ve 14 transkribe edilmekte ancak translasyona uğramamaktadır. İnsan merkezi sinir sisteminde, tau proteini, ekzon 2, 3 ve 10'un alternatif birleşmeleri neticesinde, altı tau protein izoformunu (37-46 kDa'lık) üreten 6 kb'lik bir mRNA transkriptinden dönüştürülür (**Guo ve ark. 2017**). İzofomlar, mikrotübül bağlanma tekrarlarının sayısında farklılık gösterir ve tau, 3- tekrar (3R) veya 4-tekrar (4R) formlarında mevcut olabilir (**Dani ve ark. 2016**). Tau ifadesi, yetişkin insan beyinde, tau'nun altı izoformunun tümünün merkezi sinir sisteminde eksprese edildiği, fetal beyinde yalnızca en kısa tau izoformunun eksprese edildiği şekilde düzenlenir. Sağlıklı yetişkinlerin serebral korteksinde yaklaşık olarak eşit miktarda 3R ve 4R tau izoformları mevcuttur (**Guo ve ark. 2017**). Farklı tau izoformları farklı mikrotübül dinamiklerini düzenler (**Avila ve ark. 2016**).

Tau'nun mikrotübüllere bağlanma kabiliyeti aynı zamanda, proteinin fosforilasyon, glikosilasyon, glikasyon, ubikuitinasyon, sumoilasyon ve nitrasyon yoluyla modifikasyonu ile de düzenlenir (**Stoothoff ve Johnson 2005; Dani ve ark. 2016**). Tau; 45 serin, 35 treonin ve 5 tirozin kalıntısı bulunan 85 varsayımsal fosforilasyon alanı ihtiva eder. Sağlıklı beyindeki tau, tübülün ile etkileşimi ve mikrotübül birleşiminin gerçekleşmesi için optimal olarak protein molü başına 2-3 mol fosfat içerir. Tau üzerindeki potansiyel fosforilasyon alanlarının sayısı göz önüne alındığında, fosforilasyonun tau'nun fizyolojik fonksiyonu üzerinde derin bir etkisi olduğu şaşırtıcı değildir.

Normal bir olgunlukta tau'nun on kat fazlasının üzerinde nöron tübülün bulunur. Tau'nun nöronal konsantrasyonu ~ 2 uM'dir ve ~ 100 nM'lik bir Kd'de mikrotübüllere bağlanır. Bu nedenle pratik olarak tüm tau'nun, hücrede mikrotübüllere bağlı olduğu düşünülür (**Iqbal ve ark. 2010**).

Patolojik koşullar altında tau'nun fosforilasyonu artar, bu da mikrotübüllere olan afinitesini düşürerek hücre iskeletinde -özellikle nöronlarda- dengesizleşmeye neden olur. Dört mikrotübül bağlama tekrarlarının her birine denk konumlarda bulunan Ser262, Ser293, Ser324 ve Ser356 kalıntılarının fosforilasyonu, Tau'nun mikrotübüle bağlanmasını azaltır. In vitro çalışmalar Thr214, Thr231 ve Ser235'deki fosforilasyonun tau'nun mikrotübüllerden ayrılmasına sebep olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, mikrotübül bağlanma alanı dışında kalan tau bölgelerinin de tau'nun hücre iskeletiyle olan ilişkisini etkilediğini göstermektedir (**Guo ve ark. 2017**).



Şekil 2. 5. Tau proteinin mikrotübül yapısında yeri ve nörofibriller yumakların oluşumu ile mikrotübüllerin parçalanması (Fitzpatrick, Falcon ve ark. 2017)

Tau'nun anormal fosforilasyonu ile protein agregasyonu arasında köklü bir bağlantı vardır. Tau fosforilasyonu tau'nun mikrotübüllere bağlanmasını azaltarak mikrotübülün stabilitesinin azalmasına sebep olur (Şekil 2.5.). Yapıdan ayrılmış olan tau kendi kendine agregat olarak, önce oligomerlerini sonra da yüksek dereceli tau agregatlarını oluşturur. Bu agregatlar nörotoksik etkileriyle Alzheimer hastalığında nöronal disfonksiyona ve akabinde nöronal ölüme yol açar. Bu durum iki teoriyle açıklanabilir. Birincisi yüksek tau fosforilasyonu, tau'yu mikrotübüllerden ayırır ve akson mikrotübül bütünlüğünü tehlikeye atarak sinaptik disfonksiyonu indükleyen aksonlardan somatodendritik bölmeye tau hatalarını uyarır. İkincisi ise, tau'nun fosforilasyonu, hücre içi degradasyon yolunu alt üst edebilir. Örneğin, Ser262 veya Ser356 üzerinde fosforile olmuş tau, ısı şok proteini 70-90 kompleksinin C terminüsü tarafından tanınmaz ve bu nedenle proteazomun degradasyonundan korunmuş olur (Guo ve ark. 2017).

Yapılan çalışmalar, AH'deki nörofibriler yumakların hakim bileşenlerinin çift sarmal ve düz filament olduğunu ortaya koymuştur; her iki filament tipi de çoğunlukla anormal derecede fosforile olmuş tau proteininden kaynaklanır. Merkezi sinir sistemine ait 6 tau izoformunun gerçek molekül ağırlığı aralığı 37-46 kDa'dır. Bununla birlikte, AH'li beyinden ekstrakte edilen nörofibriler yumaklardaki Tau'nun SDS-PAGE üzerinde, görünen moleküler ağırlıkları 68, 64 ve 60 kDa lık 3 banttır. İnsanın beyininden çıkarılan tau'nun gerçek ve görünür molekül ağırlıkları arasındaki bu uyumsuzluğun nedeni, translasyon sonrası modifikasyonun ve değişken SDS bağlanmasının kombinasyonundan kaynaklanmaktadır **(Guo ve ark. 2017)**. Ayrıca ortaya çıkan bazı kanıtlar, A β ve tau agregatları arasındaki karmaşık bir patolojik ilişkiyi de desteklemekte ve bu, mikroglial aktivasyonun da dahil olduğu nöroinflamasyon sürecini içerebilmektedir **(Dani ve ark. 2016)**.

Alzheimer patolojisi ile ilgili geldiğimiz noktada, Tau ve hiperfosforillenmiş tau'nun AH'nin ana patolojik değişikliklerini yansıtan beyin omurilik sıvısı biyo belirteçlerinden olduğunu söyleyebiliriz. AH hastalarının BOS'undaki yüksek tau düzeyi beyindeki nöronal hasar ve dejenerasyon yoğunluğu hakkında fikir verebilmektedir **(Rosén ve ark. 2013)**. T-tau ve P-tau için en sık kullanılan ölçüm yöntemi, tau'nun tüm izoformlarını fosforilasyon durumundan bağımsız olarak tespit eden monoklonal antikörlere dayalı ELISA'dır. Kandaki Tau düzeylerini analiz etmek için kullanılan immünoassayler de geliştirilmiştir **(Hampel, Blennow ve ark. 2010; Lu, Zhu ve ark. 2015)**. Fakat AH veya nörodejenerasyonun belirlenmesi için BOS tau'ya göre kan tau'nun potansiyeli daha düşüktür **(Gozes ve ark. 2017)**.

2.7. Synuclein alfa (SYN alfa)

1985 yılında "Torpedo californica" adlı bir balığın kolinerjik sinaptik veziküllerinden saflaştırılmış bir antikora karşı 143 amino asitlik (AA) nöron spesifik bir protein tespit edildi. Dahası tespit edilen bu proteinle yüksek homolojiye sahip bir sıçan beyininden de 140-AA'lık bir protein tespit edildi. Araştırmacılar bu proteine, nöronların hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde bulunmasından ötürü "synuclein" adını verdiler, lakin daha sonraki çalışmalar sinükleinin çekirdekteki lokalizasyonunu doğrulayamamıştır. Torpedo balığındaki sinükleiner molekül ağırlıklarına göre 17.5 kDa, 18.5 kDa ve 20 kDa olmak üzere üç ana alt sınıfta sınıflandırılmıştır. 17.5 kDa olan içlerinde ağırlıklı olarak en fazla eksprese olandır **(Emamzadeh 2016)**.

Synucleinler, alfa-, beta- ve gama-sinükleini içeren küçük çözünür proteinlerin bir ailesidir. Göreceli olarak küçük bir protein olan 140 AA'lık α -Syn, beyinde büyük orvea presinaptik terminallerde eksprese edilir ve bu nedenle nöronal membranın stabilitesini modüle etmekte, presinaptik sinyali etkilemekte ve veziküler transfer trafiğinde rol oynamaktadır. Ayrıca, α -syn, sitozolik beyin fraksiyonlarındaki çözünebilir toplam proteinin % 1'ini oluşturur, bu da nöronal fonksiyonda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. α -syn, esasen bir hücre içi protein olmasına rağmen, BOS, kan ve plazma gibi biyolojik sıvılarda da bulunur (**Atik ve ark. 2016**). α -synuclein ekspresyonu, sinirsel gelişim sırasında, sinirsel fenotipin belirlenmesini takiben ve sinaptik bağlantıların kurulmasının ardından indüklenir. Bu veriler α -synuclein'in sinaptik iletim modülatörü olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (**Stefanis 2012**).

α -Syn, N-terminalinde lipit bağlayan α -sarmal; amiloid bağlayıcı merkezi alan (NAC) ve C-terminalinde asidik kuyruğu olmak üzere üç alana sahip küçük bir asidik proteindir. α -Syn, α -sarmal yapısını fosfolipidlere bağlanarak ya da sitozoldaki katlanmamış konformasyonunu sergileyerek gösterebilir; bu da, dinamik yapısına dayanan farklı hücrel konumlarda belirli roller oynadığını düşündürmektedir. α -syn'nin N-terminal bölgesi (1-87 no'lu kalıntılar), yedi seri 11-AA tekrar içeren pozitif yüklü bir bölgedir. α -syn'nin lipit çift tabakalarını bozma kabiliyeti, bu tekrar dizileri sayesinde. Bu tekrarlar; α -syn sarmal yapıyı indükleme ve ardından α -syn'nin β -yapıları oluşturma eğilimini azaltması sayesinde α -syn-lipid etkileşiminde önemlidir. α -syn'nin çekirdek bölgesi (61-95 no'lu kalıntılar) - aynı zamanda NAC olarak da bilinir- fibril oluşumu ve agregasyon sürecine katılır. α -syn'nin C-terminal bölgesi (96-140 no'lu kalıntılar), 10 Glu ve 5 Asp kalıntısı içeren 43-AA kalıntılarının asidik bir kuyruğudur. Yapısal olarak α -syn'nin C-terminal bölgesi, düşük hidrofobik özelliğe yüksek net negatif yüke sahiptir. In vitro çalışmalar, α -syn agregasyonunun, bu negatif yükleri nötralize eden pH düşüşü ile indüklenebileceğini ortaya koymuştur. α -syn'in C-terminal bölgesi ile NAC bölgesi arasındaki bir etkileşimin α -syn agregasyonunun inhibisyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Dahası, Al^{3+} 'ün varlığında, α -syn'nin C-terminal bölgesi bu metal iyonuna bağlanır ve bu nedenle C-terminal bölgesinin NAC ile birlikte sağladığı α -syn agregasyonunun inhibe edilmesi zarara uğrar. Serin 129'un fosforilasyonu C-terminal bölgesinin inhibe edici özelliğinden ötürü önemlidir, çünkü serin 129'un defosforilasyonu α -syn agregasyonuna neden olur (**Sode ve ark. 2007; Emamzadeh 2016**). α -sinüklein'nin metabolizmadaki fonksiyonu tam olarak anlaşılmamakla

birlikte, aşağıda bahsedilen fonksiyonlarla bu proteinin ilişkili olduğuna dair çalışmalar vardır.

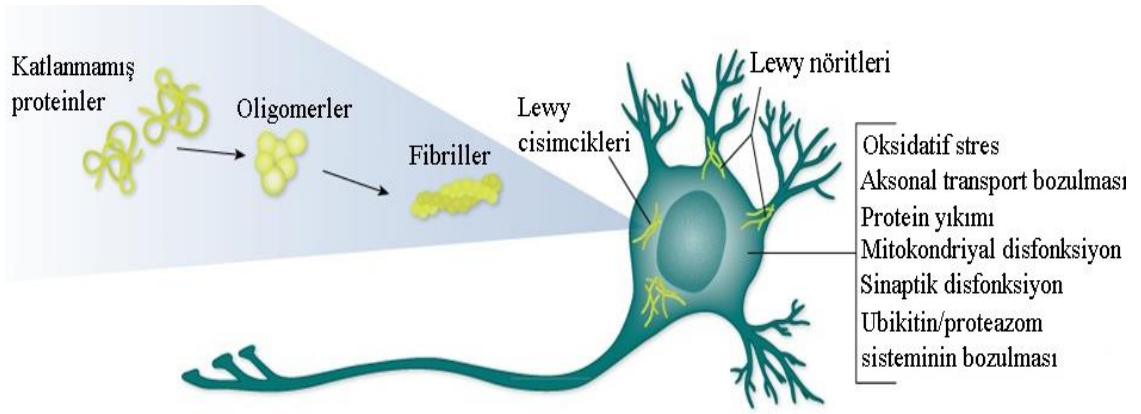
- Protein kinaz C aktivitesini azaltarak dopaminerjik nöronlarda apoptozun bastırılması (**Jin ve ark. 2011**)
- Glukoz seviyelerinin düzenlenmesi (**Geng ve ark. 2011**)
- Kalmodulin aktivitesinin modülasyonu (**Martinez ve ark. 2003**)
- Moleküler şaperon olarak davranmak (**Park ve ark. 2002**)
- Çoklu doymamış yağ asitlerinin seviyelerinin korunması (**Ruipérez ve ark. 2010**)
- Antioksidan gibi hareket ederek veziküllerdeki doymamış lipidlerin oksidasyonunu önlemek (**Zhu ve ark. 2006**)
- Nöronal farklılaşma (**Ostrerova ve ark. 1999**)
- Dopamin biyosentezinin düzenlenmesi (**Peng ve ark. 2005**)
- Vezikül trafiğini modüle etme (**Scott ve Roy 2012**)

Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri, PH'deki nöronlar içerisinde biriken anormal inklüzyonlardır. Lewy cismi ve Lewy nörit patolojisi, Lewy cisimciği demansı (LBD) ve çoklu sistem atrofisi (MSA) dahil olmak üzere çeşitli diğer nörodejeneratif hastalıklarda tanımlanmıştır, ancak bu protein agregalarının önemi henüz belirlenmemiştir. Bu Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritlerinin en önemli bileşeni çözünmez halde bulunan α -sinüklein fibrilleridir ve bu duruma en sık olarak PH'li hastaların amigdalalarında ve striyatumlarında karşılaşılmıştır (**Rocha ve ark. 2018**).

PH patogenezinde α -synuclein'in önemi göz önüne alındığında, pek çok çalışma bu proteinin potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır (**Stefanis 2012**). α -synuclein'in çözünmeyen fibril formundan ziyade çözünür oligomerik formunun yüksek seviyelerinin PH'de patojen bir tür olabileceği varsayılmaktadır. Çözünür α -synuclein oligomerlerinin hem in vitro hem de hayvan modellerinde membranları bozduğu ve akabinde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (**Rocha ve ark. 2018**). Yapılan pek çok çalışmada, PH'li hastalarının BOSTaki toplam synuclein alfa konsantrasyonları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında azalmış görülmektedir (**Stefanis 2012; Gao ve ark. 2015**). Bununla birlikte oligomerik sinüklein miktarı ise sağlıklı kontrollere nispeten azalmıştır

(Tokuda ve ark. 2010). Bu çalışmalarda kullanılan teknikler ELISA (Mollenhauer ve ark. 2011; Kang ve ark. 2013; Parnetti ve ark. 2014), Luminex assays (Hong ve ark. 2010; Hall ve ark. 2012; Wang ve ark. 2012) veya kütle spektrometresidir (Hall ve ark. 2012; Wang ve ark. 2012).

α -synuclein sadece beyinde değil aynı zamanda deri, enterik mukoza ve submveibular tükürük bezleri gibi periferik dokularda da bulunduğu göz önüne alındığında, doku biyopsisi son birkaç yıl içinde potansiyel biyolojik belirteç olarak değerlendirilmeye başlanılmıştır. PH hastalarının gastrointestinal sisteminde bir α -synuclein birikiminin, motor semptomların başlamasından 7 ila 8 yıl önce bile tespit edilebileceği öne sürülmüştür (Le ve ark. 2017).

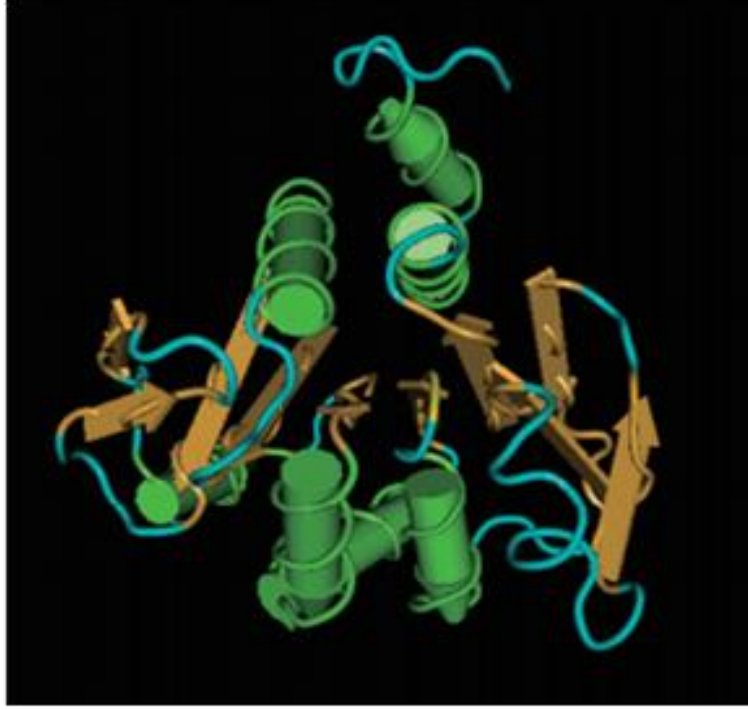


Şekil 2. 6. Parkinson hastalığına sebep olan metabolik durumlar (Lee ve Trojanowski 2006)

2.8. PARK-7 (DJ-1)

DJ-1, Parkinson hastalığının (PD) genetik formunun sorumlu genidir ve hücreleri oksidatif stresten korumak için antioksidan savunmada önemli bir rol oynamaktadır. İnsvea DJ-1 geni genomik seviyede 24 kb'dir ve sekiz ekson içermektedir. DJ-1 189 amino asitten oluşan homodimerik bir proteindir (Lev ve ark. 2006; Saito 2014). DJ-1 proteini esas olarak kortekste glial hücrelerde ve substantia nigra ve striatumun nöronlarında eksprese edilir (An ve ark. 2018). Bu hücreler içinde DJ-1, bir onkogen (Nagakubo ve ark. 1997), bir şaperon (Zhou ve ark. 2006) ve bir proteaz (Abou- Sleiman ve ark. 2003) görevi görür. Ek olarak, DJ-1 transkripsiyonel regülasyonda ve oksidatif stresin azaltılmasında rol oynar (Taira ve ark. 2004).

DJ-1 monomer flavodoksin benzeri bir Rossmann kıvrımına sahiptir ve bu kıvrımda yedi kordonlu bir β -tabakası çekirdek olarak bulunur. Bu β -tabaka α -heliks tarafından sveiç benzeri sarılmıştır; Bu nedenle, DJ-1 monomerinin üç tabakalı bir yapısı vardır. DJ-1'in üçüncül yapısı, PfpI süper ailesinin üyesi olan bakteri sistein proteaz PH1704'üne benzer ve DJ-1 bu süper aileye aittir (Şekil 2.7.).



Şekil 2. 7. DJ-1 monomerinin moleküler modeli (Saito 2014)

Yapılan çalışmalar, DJ-1 proteinin fonksiyonunu kaybetmesinin Parkinson hastalığına yol açan sebeplerden biri olduğunu, bununla birlikte fonksiyonunu kazanmasının ise kanserin tedavisinde kullanıldığını göstermiştir. Bu durum ortak bir paydada DJ-1'in oksidatif strese oynadığı rol ile açıklanabilmektedir (Saito 2014).

Pek çok çalışma DJ-1'deki mutasyonların, otozomal resesif erken başlangıçlı PH ile ilişkili olduğunu göstermiştir (An ve ark. 2018). DJ-1'in nasıl PH'ye neden olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında görevli olan önemli bir protein olduğundan mitokondriyal disfonksiyonla ilişkisi kurulmuştur. DJ-1 aynı zamanda Parkinson'nun sporadik formuyla da ilintilidir. Choi ve arkadaşları, sporadik PH hastalarının beyindeki DJ-1 proteininin oksidatif hasar gördüğünü bulmuşlardır (Choi ve ark. 2006). Aynı şekilde Waragai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçları, sporadik PH hastalarının

BOS'undaki DJ-1 seviyelerinin PH kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ve erken evre PH hastalarının BOS' undaki DJ-1 seviyelerinin, daha geç evrelerdeki PH hastalarına göre yüksek olduğunu göstermiştir (**Waragai ve ark. 2006**). Bahsedilen çalışmalar birlikte ele alındığında, DJ-1 proteininin PH ile yakından ilişkili olduğu söylenebilir. Bununla birlikte yakın zamanda yapılan çalışmalar sadece BOS' ta değil tükürükte bulunan ve konsantrasyonu PH durumunda artan DJ-1'in de bir potansiyel belirteç olabileceğini göstermektedir (**Devic ve ark. 2011; Kang ve ark. 2014; Masters ve ark. 2015**).

2.9. Erken Tanıda Etkin Bir Araç: Nörobiyosensörler

Biyosensörler, biyolojik kökenli yüksek afiniteli bir tanıma probu ve kimyasal sinyalleri elektriksel veya optik çıktılara dönüştüren bir dönüştürücüden oluşan analitik cihazlardır. Genel olarak, tüm sensörler sıralanan hedeflerden bir veya daha fazlasını gerçekleştirebilmek üzere tasarlanmıştır: Algılama sınırlarını düşürme, çoklu analitlerin veya sinyallerin paralel algılanması (çoğullama) ve sinyal amplifikasyonu (**Bhalla ve ark. 2016**).

Nörodejeneratif hastalıklara ait analit algılaması için kullanılan çeşitli platformlar da dahil olmak üzere mevcut hastalık nöro-biyosensörleri, tükürük, idrar, kan, BOS veya ilgili doku için genetik hedefleri veya biyokimyasal analitleri bağlayabilir (**Bell ve Kornguth 2007; Evtugyn ve ark. 2017**).

Hastalığa ait biyolojik belirteçlerin imzalarını oluşturma kavramı, spesifik hastalıklar için yüksek korelasyona sahip olanlar ile sadece merkezi sinir sistemindeki bir bozukluğu tespit edip spesifik bir hastalığı işaret etmeyenleri de içermektedir (**Bell ve Kornguth 2007**).

Geleneksel olarak AH ve PH benzeri hastalıklarda hali hazırda kullanılan teknikler; kütle spektrometresi, manyetik rezonans görüntüleme, ELISA, western –blot immünohistokimya, Pozitron emisyon tomografi (PET), LCMS/MS gibi teknikler iken son zamanlarda nöro-biyosensörlere duyulan ilginin temelinde bu tekniğin yüksek hassasiyet, kolay kullanım, hızlı yanıt verme, minyatürizasyon ile uyum gibi vaatler sunması vardır (**Shui ve ark. 2018**). Çizelge 2.3 Alzheimer hastalığının diagnosunda kullanılan teknikleri ve bu tekniklerin kısıtlamalarını göstermektedir.

Çizelge 2. 4. AH' nin teşhisinde kullanılan bazı teknikler ve kısıtlamaları

Teknik	Kısıtlamalar
MS	Pahalı Düşük basınç gereksinimi Yüksek enerjiye, kolison gazına, basınca ve diğer faktörlere bağlıdır
MRI	Pahalı Tarama hızı düşük Hareket kaynaklı artefakt Kireçlenmelere karşı duyarsız
ELISA	Uzun sürede sonuçlanma Düşük seviyedeki belirteçlere duyarsız Yanlış pozitif sonuç
Western-blot	Stabilitesi düşük Prosedürün herhangi bir aşamasındaki bir dengesizlik sonucu değiştirebilir
İmmünohistokimya	Çapraz reaksiyon gözlenebilir Sonuçlar subjektif yorumlanabilir
xMAP	Pahalı Görüntü çözünürlüğü düşük Heterozigot belirsizlikler vardır
PET	Pahalı Zayıf çözünürlük Hareket kaynaklı artefakt

NH için nöro-biyosensörlerin işlevi çift yönlüdür; biyolojik belirteçlerin keşfi ve tanı araçları olarak kullanılması. Daha önce de belirtildiği gibi bir nöro-biyosensör biyoreseptörden ve bir dönüştürücünden oluşur. Biyoreseptörlerin temel noktası, diğer biyolojik varlıkların bulunduğu bir matriks içerisinde analitine karşı yüksek seçicilik

göstermesidir. Farklı biyoreseptör tipleri arasında, AH ve PH sensörlerinin geliştirilmesinde en sık kullanılanlar aptamerler ve antikordur. Aptamerlerin antikordura karşı ucuz olmaları, daha küçük boyutta olmaları, afinitelerinin yüksek olması gibi avantajları olmakla birlikte; antikordur sadece yüksek immunojenite gösterdikleri hedeflerle afinite sağlamaktadır (**Qu ve ark. 2017; Shui ve ark. 2018**).

Günümüzde, antikordur bilimsel olarak uygulanması, temel araştırmalardan uygulamalı araştırmalara kadar uzanmaktadır. mAb, 1970'lerin ortalarında Kohler ve Milstein tarafından geliştirildi ve günümüzde mAb'lar çoklu araştırmalarda kullanılmaktadır (**Köhler ve Milstein 1975**). Antikordur spesifitesi, hassasiyeti ve homojenliği araştırmacıların ilgisini çekmiştir. John Hardy ve ark. transgenik AH'li farelere anti-Ab antikordur enjekte ettiklerinde ve Ab'nin önemli ölçüde azaldığını ve amiloid plaklarının giderildiğini bulmuşlardı (**Hardy ve Selkoe 2002**). Antikordur kullanımda iki önemli sınırlama vardır: termal veya fiziksel instabilitesi ve in vitro ve in vivo üretim modellerinde yaşanabilen karmaşadır (**Shui ve ark. 2018**).

Bir biyosensör, analitin dedektör elemanı ile olan etkileşimini, kolayca ölçülebilen ve nicelenebilen bir sinyale dönüştürür. Transdüser veya biyolojik element, fiziko-kimyasal, optik, piezoelektrik veya elektrokimyasal gibi tekniklerle çalışan biyosensör elemanıdır. Nörodejeneratif hastalıkların özellikle AH ve PH'nin erken tanısı için geliştirilen nöro-biyosensörlerde kullanılan teknikler çoğunlukla optik ve elektrokimyasal tekniklerdir. Bu kısımda kısaca bu iki temel biyodönüştürücünün üzerinde durulacaktır.

Optik biyodönüştürücüler sinyal iletimi için optik biyosensörlere uygulanır ve fotonları kullanarak analit hakkında bilgi toplar. Nanoparçacıklar, biyoyumlu ortamlarda fotostabil sentezli ve gürültüden bağımsız bir floresan sinyali sağlar. Yüzey Plasmon rezonansı (SPR) biyo-transdüserleri, hızlı, hassas ve etiketsiz (label-free) olmalarından ötürü biyomoleküler etkileşimin gerçek zamanlı tespitinde kullanılmaktadır (**Shui, Tao ve ark. 2018**). Örneğin SPR, serumdaki A β 42 seviyelerini algılamak ve ölçmek için kullanılmıştır. Bu sensör, altın kaplamalı cam çipler üzerine Alzheimer hastalığı peptonlarını (ADP3) kullanarak üretilmiştir (**Zhao ve ark. 2015**). Min Kyung Kang ve ark. lokalize yüzey plazmon rezonansına (LSPR) dayanan ve tek bir altın nanopartikül kullanılarak fizyolojik koşullarda APOE4 aracılı Ab agregasyonunu saptamak için etkili bir teknoloji geliştirmiştir (**Kang ve ark. 2015**).

Ma ve ark. tarafından quantum dots tabanlı PH ile ilişkili mitokondrial kompleks I anormalliklerinin saptanması için yeni bir biyosensör geliştirilmiştir. Yazarlar, bu biyosensörün Parkinson hastalığının intraselüler olarak tespiti için heyecan verici bir olasılık sunduğunu belirtmişlerdir (**Ma ve ark. 2013**). Son zamanlardaki araştırmalar ayrıca, PH'nin tespitinin güvenilirliğini artırmak için çoklu biyobelirteçlerin aynı anda tespitine odaklanmıştır. Örneğin, bir elektrokemilüminesans (ECL) tabanlı çoklu test Kruse ve meslektaşları (**Kruse ve ark. 2012**) tarafından geliştirilmiş olup, PH hastalarının BOS' larından α -synuclein de dahil olmak üzere çoklu biyolojik belirteçlerin aynı ve miktar tayini yapabilmektedir. Ayrıca, BOS'da α -synuclein ve diğer biyobelirteçlerin birlikte belirlenmesinin PH'nin spesifik kalıplarını sergilediğini ortaya çıkaran yeni çalışmalar, çoklu PH biyolojik belirteçlerini hedefleyen çok katlı test stratejileri geliştirmenin önemini üzerinde durmaktadır (**Ganesh ve ark. 2016**).

Elektrokimyasal biyosensörler uzun zamandır kullanılan tekniklerdendir. Yüksek duyarlılık, özgüllük, kullanım kolaylığı ve ölçümlenecek analit için hızlı yanıtlar vermesi gibi sebeplerden ötürü AH ve PH'nin erken tanısında kullanımı mevcuttur. Elektrokimyasal biyosensörler, potansiyometrik, amperometrik ve impedimetrik transdüserler kullanarak kimyasal sinyalleri ölçülebilir amperometrik bir sinyal haline dönüştürürler. AH ve PH biyobelirteçlerinin tayininde en yaygın kullanılan elektrokimyasal teknikler döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) 'dir. EIS, elektron transfer direnci (Rct) üzerindeki etkisi sayesinde moleküler arası etkileşimleri anlama imkanı sunan etkili bir tekniktir ve yüzey - ara yüzey karakterizasyonu ile biyosensör yüzeyinde meydana gelen çok ufak değişikliklerin bile tespiti için kullanılan güçlü bir araçtır (**He ve Zha 2017; Shui ve ark. 2018**).

BOS ve kanda A β 40 / A β 42, tau, ApoE, miRNA gibi AH biyo belirteçlerini saptamak için elektrokimyasal teknikler üzerine kurulu çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir. Örneğin, Yu ve ark. A β 40 ve A β 42 monomerlerine yüksek özgüllükle bağlandığı tespit edilen bir salgı proteini olan gelsolin kullanarak, A β seviyelerini saptamak için yeni bir elektrokimyasal biyosensör bildirmiştir (**Yu, Zhang ve ark. 2014**). Esteves-Villanueva ve meslektaşları, tau'yu tespit etmek için protein tabanlı bir elektrokimyasal sensör geliştirmişleridir. Tau proteini altın yüzeye immobilize edilmiş ve tau bağlanması (tau-tau etkileşimleri) elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak izlenmiştir (**Esteves-Villanueva ve ark. 2014**).

Yue ve çalışma ekibi, PH için bir elektrokimyasal biyolojik belirteç algılama sisteminin geliştirildiğini bildirdiler. Grup, 3D grafen köpük üzerinde dikey olarak hizalanan ZnO nanotellerini üretmek suretiyle diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanarak bir PH biyolojik belirteci olan dopamini başarılı bir şekilde tespit ederek 1 nM'lik bir tayin limiti elde ettiğini gösterdiler.

Elektrokimyasal temelli nörosensörler, ayırma ve yıkama adımları içermemelerinden ötürü zaman tasarrufu sağlar. Birçok nörobiyosensör, asit içine (örneğin HCl, H₂SO₄), baza (ör. Tetraetilamin), denatüre edici maddelere (örneğin üreye) veya yüksek tuzdan sonra rejenere edilebilmektedir. Bu özellik ciddi bir maliyet tasarrufu sağlamaktadır (**Bhalla ve ark. 2016**).

Biyolojik belirteçlerin geleneksel yöntemlerle belirlenememesinin önündeki en büyük engel, biyolojik sıvılardaki konsantrasyonlarının düşük olmasıdır. Nörodejeneratif hastalıklara ait erken tanı biyobelirteçlerinin tanılanmasına yönelik geliştirilen biyosensörlerin çoğu oldukça hassas, seçici ve etkileyici algılama seviyelerine sahiptir (nano-femtomolar). Bu da, hastalığın çok erken evrede yakalanıp teşhis edilmesine çok büyük katkı sağlamaktadır. Geliştirilebilecek yeni ve etkili amplifikasyon stratejileri ile sensörün algılama seviyesini daha alt sınırlara ve hassasiyeti daha yüksek değerlere çıkarmak mümkün olabilecektir (**Bell ve Kornguth 2007**).

Sensör teknolojisi ile ilgili endişelerden biri, numunenin alınması ile veri çıkışı arasındaki zaman kaybıdır. Burada bahsedilen platformların çoğu, numuneden sensör cihazına yaklaşık 1 saat içinde veri çıkışı sağlayabilir. Genel olarak, en çok zaman harcanan adım, cihaz için numune hazırlama, gen dizilerinin çoğaltılması veya numuneden tespit edilecek ligandın serbest bırakılmasıdır. Yine geliştirilen teknolojilerle bu süreyi aşağı çekmek mümkün olacaktır (**Bell ve Kornguth 2007**).

Nörobiyosensörler ve tek kullanımlık sensörler, (i) klinik durumun hızlı göstergesi, (ii) hastalığın ilerlemesinin belirlenmesi, (iii) hastanın zayıflığının / hastalığa karşı dayanıklılığının saptanması ve (iv) bir hasta tarafından kendi kendine değerlendirme yapılması gibi üstünlüklere sahiptir. Ayrıca, nörodejeneratif hastalık sensörleri, diyet, egzersiz ve ilaç etkilerini izleyerek hastalık yönetiminin tamamlayıcı bir unsuru olabilir. İdeal olarak, sensör testleri sadece mikrolitre kan veya küçük idrar örneğini gerektirir, bu manadaki

rahatsızlığa sınırlama getirir. Nörodejeneratif hastalıkların analitlerinin saptanması için bir BOS örneğinin gerekli olduğu durumlarda dahi, süreç geleneksel testlerden daha hızlı ve daha hassas olabilmektedir (**Bell ve Kornguth 2007; Ganesh ve ark. 2016; Shui ve ark. 2018**).

2. 10. Nörobiyosensör Sistemleri Geliştirilirken Kullanılan Yenilikçi Materyaller

Transdüserler yüzeyinde biyoreseptörlerin seçimi ve doğru immobilizasyonu, geliştirilen biyosensör hassasiyetinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, sinyal amplifikasyon stratejileri de analizlerde düşük algılama limitleri elde etmek için büyük önem taşır. Biyosensör verimliliğini arttırmak için çeşitli sinyal amplifikasyon stratejileri kullanılır: nanomalzemeler (NM), redoks mediatörler ve enzimler yaygın olarak sinyal amplifikasyonu için kullanılır (**Luo ve ark. 2006**).

Çeşitli yarı iletken elektrotlar arasında, indiyum-tin oksit elektrotlar (ITO) biyolojik sistemlerin karakterizasyonu için umut vericidir. ITO yüzeyler, polarize edilebilir özelliklerinden dolayı fizyolojik koşullar altında stabilitelelerini korurlar. Ayrıca, ITO substratlar, yüksek elektrik iletkenliği, düşük kapasitif akım, geniş bir potansiyel aralığı içinde elektrokimyasal etkinlik ve istikrarlı fiziksel ve elektrokimyasal özellikler sunar (**Grochowska ve ark. 2015**). ITO transparan yapısından ötürü optik ve elektrik teknikler kullanılarak çoklu parametre ölçümlerini mümkün kılmaktadır. Bu özelliklerden dolayı, ITO filmler elektrokromizm, fotovoltaiçler, sensörler, plasmonik cihazlar ve ışık yayan diyotlar gibi birçok cihazda başarıyla uygulanmaktadır. Bu tekniklerin hepsinin ortak özelliği ITO yüzeyinin modifiye edilebilir olmasıdır. Bu amaçla, literatürde, kendi kendine oluşan tek tabakalar, spin kaplama, elektrokimyasal polimerizasyon ve diazonyum türevlerinin indirgenmesi yoluyla elektrokimyasal greftleme gibi teknikler de dahil olmak üzere çok sayıda strateji bildirilmiştir. Bu modifikasyon yöntemleri, kolayca ayarlanabilecek çeşitli özelliklere sahip yeni bir arayüz oluşturarak ITO'nun çeşitli cihazlara entegrasyonunu sağlar. Yukarıda bahsedilen uygulamaların çoğu, ara yüzeydeki elektron transfer işleminin yorumlanmasına dayanmaktadır (**Bouden ve ark. 2016**). Cam ya da PET kaplı olsun, ITO elektrotların biyosensör uygulamalarındaki en göze çarpan özelliği, tek kullanımlık olup düşük maliyet sergilemesidir.

Biyomalzemeler ve katılar arasında biyoyumlu ve işlevsel ara katmanlar yapmak için, kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM'ler) kullanmak; ileri modifikasyonlar için yüzeyi

hidrofobik hale getirmek ve kaçak akımları, spesifik olmayan adsorpsiyonu ve sulu elektrolitlerde yüzeyin bozulmasını önlemek için çok ince bir yalıtkan tabaka sunması açısından oldukça uygundur (**Ulman 2013**).

Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) genellikle katı yüzeyin fiziksel ve kimyasal özelliklerini kontrol etmek için kullanılır. Elektrokimyayı göz önüne aldığımızda, SAM elektroanalitik uygulamalar için seçici elektrot tasarımı konusunda çok yaygındır. Metal yüzeylerdeki organik ve biyolojik moleküllerin SAM'i, sensörlerden nano-yapılandırılmış cihazlara kadar birçok alvanda önem arz eder. SAM tabanlı teknikler, işlevsel özellikleri sayesinde ara yüzeylerdeki spesifik etkileşimlerin anlaşılmasını sağlayarak elektrot yüzeyindeki moleküler tanıma sistemleri için özellikle önem arz eder (**Khan 2016**). SAM'ların heterojen elektron transferi ve iyon penetrasyonuna karşı bloke edici etkinliklerinin araştırılması, yüzey kaplamasının nicel olarak belirlenmesine olanak tanır (**Janek ve ark. 1998; Hillebrvet ve Tanaka 2001**).


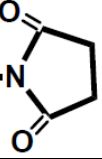
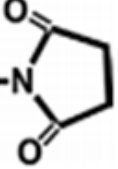

Biyomoleküllerin immobilizasyonunda, ITO yüzeyi genellikle bir silan reaktifi ile modifiye edilmektedir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş ITO elektrot, biyomoleküllerin tespiti için çalışma elektrodu olarak kullanılmaktadır. 3-Aminopropiltrietoksisilan (APTES), ITO yüzeyi üzerinde amin ile işlevselleştirilmiş SAM hazırlamak için yaygın olarak kullanılan alkil silanlardan biridir. Silan molekülünün uç kısmı biyo-moleküllerin veya ligandlarının immobilizasyonu için bir kimyasal bağlanma reaksiyonu ile etkinleştirilmelidir (**Khan 2016**).

Geçtiğimiz 50 yıl boyunca, organik ve silikon kimyaları arasındaki sinerjizm bugün gerekli olan birçok organo-fonksiyonel silanı geliştirmek üzere incelenmiştir. Organo-fonksiyonel silanlar, silikon atomu üzerinde iki farklı reaktif gruptan oluşurlar, böylece hem reaksiyona girebilir hem çok farklı malzemelerle çift oluşturabilirler. Organo-fonksiyonel silanlar yüzey modifikasyonu için sıklıkla kullanılır (**Plueddemann 1978; Marsden ve Ziemianski 1979; Witucki 1993**). Hem organik hem inorganik özelliklere sahip olan bu hibrit kimyasallar, polimer ve mineral bileşenlerle reaksiyona girerek, arayüzde kalıcı kovalent bağlar oluştururlar (**Witucki 1993**).

Siyanopropilsiloksanlar, hem düşük sıcaklıklarda hem de yüksek sıcaklıklarda polarlaşabilir özelliklere sahip oldukları için en kullanışlı organosilanlardandır. Nitril azot

üzerinde paylaşılmamış elektron çiftine sahip olan siyano grubunun özelliği, fenoller, alkoller, ketonlar, esterler ve π -elektronları taşıyan analitler gibi uygun hidrojen verici numune molekülleri ile moleküller arası hidrojen-bağları oluşturup afinitenin artmasının sağlamaktır. Üstelik, organo-fonksiyonel silanlar, düşük yüzey gerilimlerine sahiptir bu durum farklı yüzeylere karşı gösterdikleri reaktiviteden ötürü farklı malzemeler arasında yüksek adezyon sağlar. Oluşan tek tabaka ile substrat arasında gerekli etkileşimleri ve geçiş fazını oluşturabilirler (Woo ve ark. 1993; Comyn ve ark. 2002; Miskam ve ark. 2013).

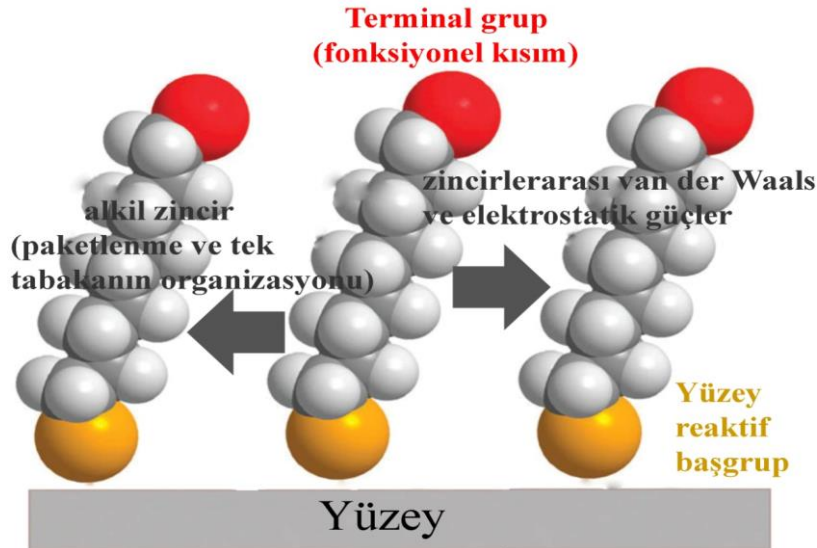
Çizelge 2. 5. Biyomoleküllerin immobilizasyonu için ITO elektrot yüzey fonksiyonelleştirilmesinde kullanılan fonksiyonel gruplar

Fonksiyonel grup	Yüzey özelliği	Biyomoleküller arası interaksiyon veya reaksiyon
$R-(CH_2)_n-NH_3^+$	(+) yük	<ul style="list-style-type: none"> yük-yük etkileşimi Biyomoleküllerin karboksil grubu arasında EDC aracılı bağlanma biyomoleküllerin amin grubu arasında gluteraldehit aracılı kimyasal bağlanma
$R-(CH_2)_n-COO^-$	(-) yük	<ul style="list-style-type: none"> yük-yük etkileşimi biyomoleküllerin amin grupları arasında EDC aracılı kimyasal bağlanma
$R-(CH_2)_n-$ 	Hidrofobik	<ul style="list-style-type: none"> Hidrofobik etkileşim
$R-(CH_2)_n-CH_3$		
$R-(CH_2)_n-CHO$ 	Aldehit NHS	<ul style="list-style-type: none"> Biyomoleküllerin amin grupları arasında kimyasal bağlanma
$R-(CH_2)_n-O-N$ 	Maleimid	<ul style="list-style-type: none"> Biyomoleküllerin sülfidril grupları arasında kimyasal bağlanma
$R-(CH_2)_n-O-CH_2-CH-CH_2$ 	Epoksi	<ul style="list-style-type: none"> Biyomoleküllerin hidroksil, amin ve sülfidril grupları arasında kimyasal bağlanma

Devam **Çizelge 2. 6.** Biyomoleküllerin immobilizasyonu için ITO elektrot yüzey fonksiyonelleştirilmesinde kullanılan fonksiyonel gruplar

$\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$	Biotin	<ul style="list-style-type: none"> Avidin ve streptavidine spesifik bağlanma
$\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$	Etilen glikol	<ul style="list-style-type: none"> Biyomoleküller arası non-spesifik bağlanmaları önleme

Alkilsiloksan mono tabakaları, genellikle, katı substrat üzerine trikloro-, trimetoksi- veya trietoksisilanlar gibi SAM oluşturmak üzere kovalent bir işlem ile hazırlanır. Bu şekilde hazırlanan SAM molekülleri genellikle üç bölümden oluşur: baş grubu, alkil zinciri ve uç grubu. Baş grubu, yani, trikloro-, trimetoksi- veya trietoksisilan, moleküllerin alt tabaka üzerine demirlenmesinden sorumludur (Şekil 2.8.). Alkil zincir, van der Waals etkileşimlerinden ötürü tek tabakanın stabilitesini sağlar ve SAM'ın düzenlenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir; son uç grup ise, tek tabaka sistemine kimyasal işlevsellik getirir ve yüzeylerin genel özellikleri için önemlidir (**Haensch ve ark. 2010**).



Şekil 2. 8. Kendiliğinden oluşan tek tabaka yapısının ideal gösterimi (**Gooding ve Ciampi 2011**)

Nanopartiküller, küçük boyutlarından dolayı (genellikle 1- 100 nm aralığında), kütleli malzemelerden farklı benzersiz özelliklere sahip materyallerdendir. Nanomalzemelerin biyosensör alanındaki kullanımı; kimyasal veya biyolojik belirteçlerin

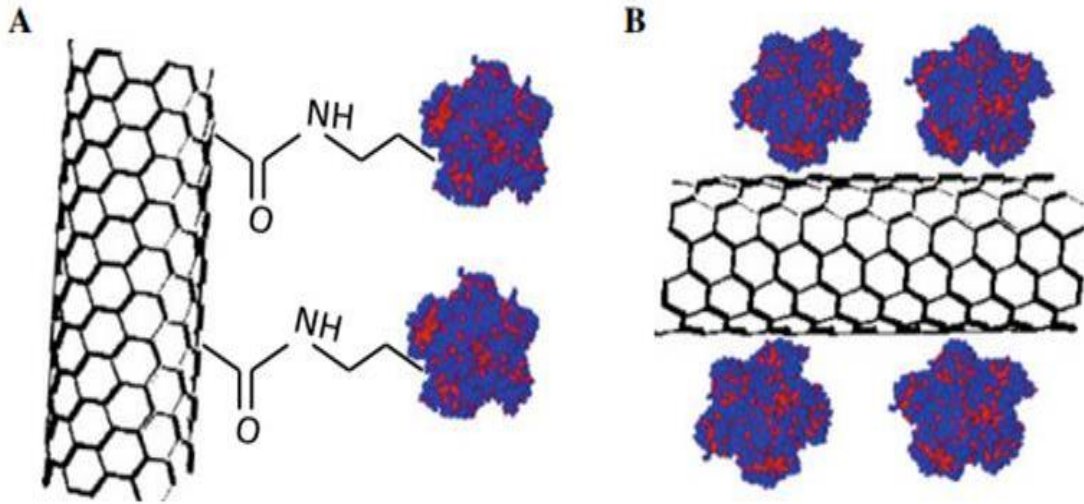
saptanması amacıyla sinyal ileten elemanlar olarak, akım akışına aracılık etmek için ya da analitin algılanmasını belirtmek için tanıma elemanlarındaki etiketlere entegre edildiğinde büyük vaatler sunmaktadır (**Zhang ve ark. 2017**). Nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan çok sayıda aktif bölge ve çeşitli fonksiyonel gruplar adsorpsiyon ve kataliz için yüksek aktivite sağlarlar. Bu nedenle nanomalzemeler yeni ve gelişmiş algılama cihazları, özellikle elektrokimyasal sensörler ve biyosensörler geliştirmek için kullanılabilir. Nanomalzemeler organik veya inorganik olmak üzere kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılabilir. En çok kullanılan NM'lerin bazıları altın nanopartiküller (AuNP'ler), çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) ve grafendir (**Marín ve Merkoçi 2012**).

Nanoyapılı elektrotların, - özellikle karbon nanotüp ve grafene dayalı malzemeler kullanıldığında- iletkenliği son derece yüksek olduğu için daha hızlı elektron transfer kinetiği gösterirler. Nanoyapılı materyaller, benzersiz elektronik veya plasmonik yapılarından dolayı son derece seçici ve ayarlanabilir katalizörler olarak işlev görebilirler. Bu durum, özellikle elektrokataliz kullanan algılama sistemleri için yararlıdır. Nanoyapılı sistemlerin yüzey kimyası, analit türüne özgü olarak ayarlanabilir (**Sanghavi ve ark. 2013; Sanghavi ve ark. 2015**).

AuNP'ler, kuantum elektroniklerinden biyotıp alanlarına kadar değişen potansiyel uygulamalarla birlikte, eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. AuNP'ler inerttir, biyolojik olarak uyumludur ve hedef analit için kolayca modifiye edilebilirler. Tiyoller veya aminler gibi çeşitli fonksiyonel grupları içeren moleküller ile reaksiyona girebilirler ve bu fonksiyonel grupların biyolojik hedefleri spesifik olarak tanıyabilmeleri için farklı ligandlarla (peptidler, proteinler ve aptamerler) biyolojik işlevselleştirilmelerine izin verirler (**Varna ve ark. 2018**).

Karbon nanotüpler (CNT'ler), 1.000.000'dan daha büyük bir çap / uzunluk oranına sahip olabilen bir nanoyapılı karbon allotroplarıdır. sp^2 karbon-karbon bağlarının gücü, karbon nanotüplere inanılmaz mekanik özellikler verir. Onlara atfedilen bu üstün mekanik, termal ve elektronik özelliklerin kombinasyonunu gösteren hiçbir materyal bulunmamaktadır. Karbon nanotüpler şimdiye kadar insanlığın keşfettiği en güçlü malzemelerdendir. Bir karbon nanotüp için ölçülen en yüksek gerilme mukavemeti veya kırılma gerginliği 63 GPa'ya kadar çıkmıştır ve bu da çelikten yaklaşık 50 kat daha yüksek bir değerdir (**Saifuddin ve ark. 2012**). Duvar sayısına bağlı olarak, CNT'ler tek duvarlı (SWNT) veya çok duvarlı (MWNT)

olarak adlandırılır. Bu tüplerin yan duvarları, grafenin atomik düzlemlerine benzer şekilde karbon atomlarının altıgen kafesinden oluşur ve genellikle her iki ucunda fullerene benzeri bir molekülün yarısı ile kaplıdır. MWCNT'ler 100 nm'ye kadar olan çaplara ulaşabilir ve iki duvar arasındaki mesafe, grafitteki iki grafen tabakası arasındaki mesafeye çok yakındır. Karbon nanotüpleri, enzim immobilizasyonu için alternatif matrisler olarak büyük bir ilgi görmektedir (**Tilmaciu ve Morris 2015**). Elektrokimyasal biyosensörlere entegrasyon için onları uygun hale getiren, elektrik ve elektrokimyasal özellikleri sayesinde, elektron transferini arttıran CNT'ler umut verici malzemeler olarak kabul edilmiştir. Küçük boyutları, geniş yüzey alanları, yüksek iletkenlik, yüksek kimyasal kararlılık ve hassasiyet, yüksek elektrokatalitik etki ve hızlı elektron transfer hızı, karbon nanotüpleri enzimatik reaksiyonlara ve / veya elektro-aktif türler üreten biyolojik algılama uygulamaları için son derece uygun hale getirmektedir. İyonları, metabolitleri ve protein biyolojik belirteçleri tespit etmek için çok çeşitli elektrokimyasal CNT-biyosensörler geliştirilmiştir (**Tilmaciu ve Morris 2015; Wang ve Dai 2015**).



Şekil 2. 9. Enzim immobilizasyonunun kovalent (A) ve nonkovalent (B) etkileşimi (**Taurino, De Micheli ve ark. 2012**)

Dendrimerler, iyi tanımlanmış, tek dağılımlı, üç boyutlu uzaysal konformasyonları olan ve geniş spektrumlu kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip, aşırı dallı globüler makromoleküllerdir. Bu özellikler, klasik polimerik molekülardan dendrimerleri ayırmaktadır. Yapısal olarak, bu makromoleküller üç bölgeye ayrılırlar: merkezi çekirdek tekrarlayan radyal dallanma birimleri ve terminal fonksiyonel gruplar (**Tomalia ve ark.**

1985). Yüksek hassasiyet ve yapısal düzen elde etmek için, dendrimerler kademeli olarak sentezlenir. Sentez sırasında kullanılan tekrar dallanma moleküllerinin sayısı, aynı zamanda dendrimerlerin şeklini ve boyutuna işaret etmektedir. Genellikle, dendrimerlerin sentezi için kullanılan yöntemler farklı "jenerasyonlar" halinde sınıflandırılmıştır. Dendrimer merkezinden çevreye doğru molekülün aşırı paralelleştirilmesi, odak noktaları arasında homojen yapıli tabakaları (dallanma noktaları) oluşması ile sonuçlanır. Çekirdeğin dış yüzeye doğru odak noktalarının sayısı jenerasyon numarasıdır. Böylece jenerasyon, sentez sırasında gerçekleştirilen tekrarlanan dallanma çevrimlerinin sayısına karşılık gelir. Etilen diamin, 1,4-diaminobutan, 1,12-diaminododekan, sisteamin, 1,6 diaminoheksan ve amonyak dendrimerlerdeki en yaygın çekirdek molekülleridir. Farklı çekirdek ve dallanma monomerleri iç kimyasal ortamını, üç boyutlu yapıları ve dendrimerdeki iç boşlukların boyutunu etkiler (**Nigam ve ark. 2015**).

PAMAM dendrimerler sentezlenip, karakterize edilen ve akabinde ticari hale getirilen ilk dendrimer ailesidir. Dendrimerlerin gözlemlenen nano ölçekli olağanüstü yapısal özelliklerine ilaveten, göze çarpan başka bir karakteri ise, globüler proteinlerin bir nevi taklidi olmasıdır. Sistematik, boyutsal uzunluk ölçekleme, elektroforetik ve diğer biyomimetik özelliklerine dayanarak, PAMAM dendrimerler genellikle 'yapay proteinler' olarak adlandırılır (**Esfve ve Tomalia 2001**). PAMAM dendrimer ailesinin pek çok üyesi birçok önemli proteinin ve biyolojik yapının boyut ve konturları ile yakından eşleşir. Örneğin, insülin ($\approx 30\text{\AA}$), sitokrom C ($\approx 40\text{\AA}$) ve hemoglobin ($\approx 55\text{\AA}$) sırasıyla amonyum çekirdekli PAMAM dendrimerlerin 3, 4 ve 5 no'lu jenerasyonlarıyla aynı boyut ve şekildedir. Bu temel özellikler, PAMAM dendrimerlerin immunodiagnostik amaçlı kullanılmasına yol açmıştır (**Hecht ve Fréchet 2001**). PAMAM dendrimerlerde bulunan işlevsel gruplar bioalgılama moleküllerini immobilizasyonu amacıyla da kullanılmaktadır. Biyo-konjuge reaktifler gibi davranan PAMAM molekülleri; kimyasal ve biyokimyasal biyosensör alanlarında çeşitli uygulamalara sahiptirler. PAMAM dendrimerler, yüksek stabilite, iyi tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik ve algılama limitinin düşük olduğu biyosensörlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca ekstrem koşullarda çalışan biyosensörlerin geliştirilmesine de yardımcı olmaktadır (**Hasanzadeh ve ark. 2014**).

2.11. Kaynak Araştırması

Bryan ve ark.'ları 2013 yılında yaptıkları çalışmada kan serumunda CRP tespitine yönelik bir impedimetrik biyosensör sistemi geliştirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmanın temeli antikorun polikristalin altın elektroda immobilizasyonuna dayanmaktadır. Araştırmacılar geliştirilen biyosensör sisteminin 0,5-50 nM aralığında ve 176pM tayin sınırında hassas, tekrar kullanılabilir, ucuz ve taşınabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir (**Bryan ve ark. 2013**).

Gupta ve ark.'ları 2014 yılında yaptıkları çalışmada karbon nanofiber temelli bir biyosensör platformu kullanarak CRP tayini yaptıklarını rapor etmişlerdir. CRP ölçümleri CV ve EIS ile gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen sistemin tayin sınırı 90 pMdir ve spesifikliğin yüksekliği miyoglobinle yapılan kontrol testleriyle gösterilmiştir (**Gupta ve ark. 2014**).

Choi ve ark.'ları 2015 yılında yaptıkları çalışmada parilen-n-film kullanarak SPR temelli bir biyosensör sistemi geliştirmeyi ve bu sistemle CRP tayininin hasas bir şekilde yapabilmeyi hedeflemişlerdir. Geliştirdikleri sistemle CRP'yi 1 ng/mL-1 µg/mL aralığında tayin etmeyi başarmışlardır. Yaptıkları optimizasyon çalışmalarıyla SPR biyosensörünün duyarlılığının parylene-N filmi kullanarak etkili bir şekilde geliştirilebileceğini öne sürmüşlerdir (**Choi ve ark. 2015**).

Yagati ve ark.'ları 2016 yılında yaptıkları çalışmada ITO temelli mikroelektrotlar üzerine fonksiyonel rGO nanopartikül hibriti geliştirip, bu sistemle CRP tayini yapmayı hedeflemişlerdir. rGO-NP ile modifiye edilmiş ITO mikroelektrodlarının özelliklerini incelemek ve antikor immobilizasyonu için modifiye nanoyapıların değerlendirilmesi için analitik ölçümler geliştirilmiştir. İmpedans sonuçlarının 1-1000 ng/mL tayin aralığında hassas olduğu ve insan serumunda da ölçüm alınabildiği vurgulanmıştır (**Yagati ve ark. 2016**).

Lee ve ark.'ları 2017 yılında yaptıkları çalışmada, insan tükürüğünde bulunan CRP'yi ölçümlemek üzere fototermal tabanlı bir biyosensör sistemi oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, geliştirilen fototermal temelli sensörün hızlı, basit ve minimal invazivdir olduğunu ve insan tükürüğündeki CRP konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanılabileceğini iddia etmektedir. CRP (0.1-100 ng / mL) sensör üzerindeki sandviç immünoassay ile yakalanır ve antikorlar ile konjuge edilmiş altın nanopartiküller (GNP'ler) bir lazer ile

ışınlandığında (90 s, dalga boyu = 532 nm) fototermal bir etkiye neden olur. Bu etkinin neden olduğu sıcaklık değişiklikleri CRP konsantrasyonları ile bir korelasyon göstermektedir. Çalışmanın tayin limiti 0,1 ng/mL CRP'dir (**Lee ve ark. 2017**).

Kerman ve ark.'ları 2008 yılında yaptıkları çalışmada, çok noktalı lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) tabanlı immünoçip kullanarak oda sıcaklığında tau proteininin tespitine yönelik bir yöntem sunmuşlardır. Algılama yöntemi, altın kaplamalı bir nanopartikül LSPR çipinin üretilmesi, kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) oluşturulması ve işlevselleştirilmesi, uygun bir bağlayıcının immobilizasyonu, spesifik olmayan adsorpsiyonun etkili bir şekilde bloke edilmesi, monoklonal anti-tau antikörünün immobilizasyonu (tau-mAb) ve nihayet, tau-mAb ile antijen arasındaki etkileşimin tespiti için optimizasyon şartlarının belirlenmesi şeklinde ilerlemiştir. Yöntemin yüksek performansa sahip olduğu ve CSF'de 10 pg / mL'deki tau'yu tespit edebildiklerini iddia etmişlerdir (**Kerman ve ark. 2008**).

Esteves-Villanueva ve ark.'ları, tau'yu tespit etmek için protein tabanlı bir elektrokimyasal sensör geliştirmiştir. Tau proteini altın bir yüzeye immobilize edilmiş ve tau bağlanması (tau tau etkileşimleri) elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak izlenmiştir. Rct ve tau konsantrasyonu arasında 0.2 ila 1.0 uM arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir (**Esteves-Villanueva ve ark. 2014**).

Scarlet ve ark.'ları, tau-441'i saptamak için çok hassas bir elektrokimyasal biyosensör geliştirdiler ve tau-441 için tayin sınırını 0.03 pM olarak belirlediler. Biyosensör, kendiliğinden oluşan tek tabakalar ve protein G'den oluşan bir tabaka ile kaplanmış altın mikrobve elektrotlar üzerinde kararlı antikör-antijen komplekslerinin oluşumuna dayanmaktadır. Antikörler, altın elektrot yüzeyinde protein G etkileşimi ile optimal bir oryantasyonda immobilize edilmiştir (**Wang ve ark. 2017**).

An ve ark.'ları α -synucleini saptamak için Au katkılı TiO₂ nanotüp esaslı fotoelektrokimyasal bir immünosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada Au katkılı TiO₂ nanotüpleri bir Ti folyosunun her iki yanında biriktirilmiştir. Algılayıcı sensör, hastalık tespitinde fotoelektrokimyasal açıdan ilginç bir uygulama olmanın yanı sıra, 50 pg / mL ila 100 ng / mL arasında doğrusal bir algılama ve 34 pg / mL algılama limiti ile α -sinüklein için yüksek özgüllük göstermiştir (**An ve ark. 2010**).

An ve ark'ları yaptıkları çalışmayla α -synuclein için hassas bir biyosensör geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. G4-poli-amidoamin dendrimer ile kapşülenmiş Au nanopartikülleri (PAMAM-Au nanokompozitleri), yüzeyde artmış miktarda karboksil grupları gerçekleştirmek için elektrot yüzeyinde başlangıçta elektropolimerize edilmiş poli-o-aminobenzoik asitte (poli-o-ABA) kovalent olarak bağlanmıştır. Oluşturulan immünosensör platformu; PAMAM-Au'nın, antijenin yüksek derecede yoğun immobilizasyonuna izin vermek ve elektrokimyasal tepkilerin geliştirilmesini kolaylaştırmak için çok sayıda amino grubu içerdiği öne sürülmüştür **(An ve ark. 2012)**.

Khatril ve ark.'ları Parkinson hastalığı ile ilişkili alfa-Synuclein proteinini, kompakt, etiketsiz, lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) tabanlı optik sensör kullanarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Altın nanopartiküller ile hareketsiz hale getirilmiş ve daha sonra kitosan bir film kullanılarak işlevselleştirilen U-şekilli fiber optik prob, algılama platformu olarak kullanılmıştır. Kitosan film alfa-Synuclein'in tespiti için hassas ve seçici bir polisakarit biyoreseptör görevi görür. Sensörün, bağımsız olarak 70 nM'ye kadar monomer ve amiloid fibrillerinin varlığını algılayabildiği ve onları karışımlardan ayırt edebildiği öne sürülmüştür **(Khatri ve ark. 2018)**.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Nöro-biyosensörlerin Dizaynında Kullanılan Materyaller

CRP tayinine yönelik nöro biyosensör geliştirilirken kullanılan kimyasal ve materyaller aşağıda sıralanmıştır.

- ITO kaplı PET (polietilenteraftalat) kullan-at filmler (İletkenlik ve yüzey direnci, sırasıyla 550 nm (>% 79) ve 60 Ω) . Çalışma elektrodu ölçüleri: 2×0,5 cm. (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- KCl ile doygunlaşmış 3 M Ag/AgCl referans elektrot (Tedarik edilen Firma: iBAS, Warwickshire, UK)
- 10 cm uzunluğunda platin yardımcı elektrot (Tedarik edilen Firma: iBAS, Warwickshire, UK)
- 3-siyanopropiltrimetoksisilan (Tedarik edilen firma: Flourochem Ltd Graphite Way, Hadfield, Englve.
- 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (Tedarik edilen Firma: abcr GmbH&Co. Karlsruhe, Germany)
- Amino yüzeyli PAMAM (Jenerasyon:1), (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Gold (III) chloride trihydate (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 11-merkaptoundekanoik asit (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysuccinimide (NHS) (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glutamik asit (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İndirgenmiş grafen oksit (Graphene Laboratories Inc, USA)
- İnsan plazmasından elde edilmiş C-reaktif protein (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Fareden üretilen Monoklonal Anti-C-Reaktif Protein antikoru. (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İnsan plazmasından elde edilmiş Synuclein alfa (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fareden üretilen Monoklonal Anti-Synuclein alfa antikoru. (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İnsan plazmasından elde edilmiş Tau-441 (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tavşandan üretilen Monoklonal Anti-Tau antikoru. (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tavşandan üretilen Monoklonal Anti-PARK-7 antikoru. (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İnsan plazmasından elde edilmiş PARK-7 (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bovine serum albümin (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Potasyum mono bazik/dibazik (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Çeşitli çözücüler: toluen, etanol (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DMF (Dimetilformamid) (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- SDS (sodyumdodesilsülfat) (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amonyum hidroksit, hidrojen peroksit (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat (Tedarik edilen Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kullanılan tüm sarf malzemeler Interlab Lab. Ürün. San ve Tic. A.ş'den tedarik edilmiştir. İmmobilizasyon ve ölçüm esnasında kullanılan tüm çözeltiler, deneyler esnasında taze olarak hazırlanmıştır. Biyobelirteçler ve antikolar belirlenen konsantrasyonlarda porsiyonlara ayrılarak çalışılana dek -20°Cde muhafaza edilmiştir.

3.2. Nöro-biyosensörlerin Dizaynında Kullanılan Cihazlar

Nöro - biyosensör geliştirilirken kullanılan cihazlar aşağıda sıralanmıştır.

- Döngüsel voltametri (CV), Elektrokimyasal İmpedans spektroskopisi (EIS) ve Kare Dalga Voltametrisi (SWV) yazılımları ve analiz programı (Echem Analyst) içeren Gamry Potentiostat/Galvanostat, Interface 1000 (Tedarik edilen Firma: Gamry Instruments, Warminster, USA)
- Ultrasonik banyo (JEIOTECH)
- Ultra saf su (18.2 MΩ/cm) cihazı (Elga LC134, Veolia Water Technologies, USA)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı
- pH metre (HANNA INSTRUMENT)
- Hassas Terazî (RADWAG)
- Mikropipetler (ISOLAB)

3.3. CRP (1) Nöro-biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu

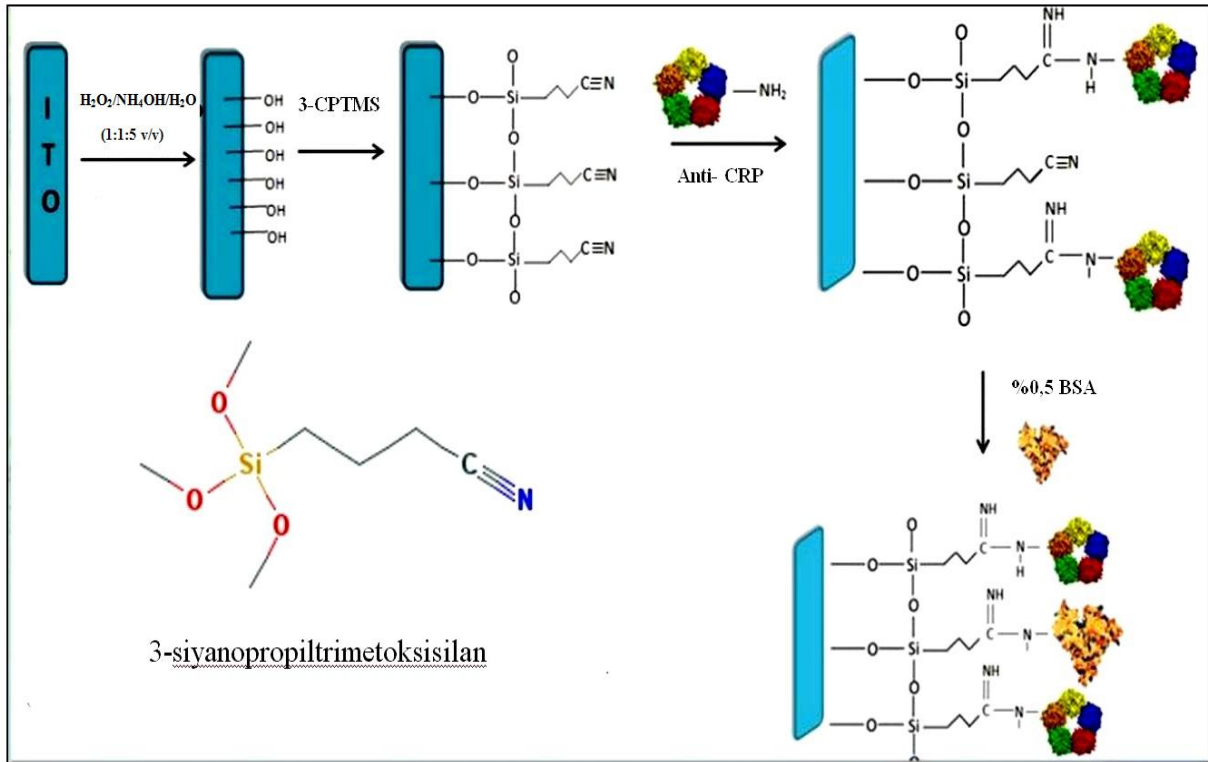
3.3.1. Elektrotların hazırlanması ve CPTMS ile SAMs oluşumu

Biyosensörün hazırlanmasının ilk adımı ITO-PET elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Bu amaçla ITO elektrotlar sırasıyla aseton/sabun çözeltisi ve ultra saf su içerisinde 10 dakika sonike edilip ardından ultra saf argon gazıyla kurutuldu. Temizlenmiş ITO elektrotların yüzeyinde 3-siyanopropiltrimetoksisilan (CPTMS) tabakasının oluşturulabilmesi için öncelikle yüzeyde aktif –hidroksil grupları biriktirmek gerekir. Bu noktada elektrotlar hidrojen peroksit, amonyum hidroksit ve ultra saf su (1: 1: 5) içeren bir çözelti içerisinde oda sıcaklığında, 90 dakika inkübe edilerek aktif –OH gruplarının oluşması sağlandı (**Demirbakan ve Sezgintürk 2017**). Daha sonra elektrotlar, ultra saf su ile nazikçe yıkanıp, ultra saf argon gazıyla kurutuldu. Yüzeyde aktif –OH grupları içeren elektrotlar, Toluen/etanol karışımı içerisinde hazırlanmış CPTMS çözeltisinde SAMs oluşturmak amacıyla gece boyu karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında elektrotlar fiziksel şekilde bağlanmış olabilecek CPTMS moleküllerini uzaklaştırmak için önce Toluen/etanol karışımı ile daha sonra da ultra saf suyla nazikçe yıkanıp kurutuldu.

3.3.2. CRP (1) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi

CPTMS ile oluşturulan SAMs tabakası, anti-CRP'nin kovalent immobilizasyonunu sağlayacak fonksiyonel –siyano gruplarına sahiptir.

3-CPTMS ile modifiye edilmiş ITO substratlar mümkün olduğunca hızlı bir şekilde 100 µL anti-CRP çözeltisine daldırıldı ve immobilizasyonun gerçekleşebilmesi için karanlık ortamda oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Anti-CRP antikoru ile inkübasyondan sonra elektrotlar bağlanmamış antikor moleküllerini uzaklaştırmak ultra saf su ile yıkandı ve akabinde argon gazı ile kurutuldu. Son olarak anti-CRP ile modifiye edilmiş elektrotlar, reaktif olmayan CPTMS uçlarını bloklamak ve non-spesifik etkileşimleri önlemek amacıyla %0,5 BSA çözeltisinde 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu son adımla, hazırlanan biyosensör, CRP ölçümleri gerçekleştirilene dek + 4 ° C'de muhafaza edilir. Temiz ve modifiye edilmiş ITO yüzeyler: ITO, ITO-OH, ITO-OH-CPTMS, ITO/CPTMS/antiCRP, ITO/CPTMS/anti-CRP/BSA şeklinde ifadelendirilmiştir. Biyosensörün dizayn stratejisi Şekil 3.1' de şematize edilmiştir.



Şekil 3. 1. Nöro-biyosensör tasarım aşamalarının şematik gösterimi

3.3.3. Elektrokimyasal Ölçümler

Geliştirilen biyosensörün immobilizasyon adımları, optimizasyon testleri ve analitik özellikleri elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltametri (CV) ve kare dalga voltametri (SWV) ile gerçekleştirildi. Tüm elektrokimyasal deneyler, redoks probu olarak 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) içeren çözelti içerisinde gerçekleştirildi. Redoks prob çözeltisi, prob solüsyonunun direncini azaltmak için 0,1 M KCl içermektedir.

CV için potansiyel -500 mV - 1 V aralığında uygulanmış olup adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s'dir. CV ölçümlerinde yukarıda belirtilen redoks probu kullanılmıştır.

Elektrokimyasal impedans ölçümleri, çalışma elektroduna 5 mV'luk alternatif bir potansiyel uygulayarak gerçekleştirilmiştir. İmpedans çalışmalarında uygulanan formal potansiyel 0 V'dır. İmpedans deneylerinde diğer önemli parametre, 50.000 ve 0.05 Hz aralığında olan frekans değeridir.

Kare dalga voltametrisi (SWV) 0-1,2 V potansiyel tarama aralığında ve puls boyutu 25 mV'da gerçekleştirildi.

3.3.4. C-reaktif proteinin ölçüm prensibi

Biyosensör, yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlandıktan sonra, EIS ve CV ölçümleri gerçekleştirildi ve elde edilen değerler EChem Analyst yazılım programı vasıtasıyla kaydedildi. Daha sonra, CPTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotların her biri değişen konsantrasyonlardaki 100 uL standart CRP çözeltilerine (50 Mm pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış) daldırılarak karanlık ortamda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinden sonra, biyosensör, fiziksel olarak adsorbe edilmiş CRP moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla nazikçe ultra saf suya yıkanmıştır. Son olarak, ITO çalışma elektrodu tekrar $Fe(CN)_6^{4-} / 3-$ redoks prob çözeltisi içeren hücrenin içine yerleştirildi ve her bir elektrodun elektrokimyasal ölçümleri daha önce tarif edildiği gibi alınarak ayrı ayrı kaydedildi.

3.3.5. CRP (1) Nöro-biyosensörünün optimizasyon çalışmaları

3.3.5.1. CPTMS konsantrasyon optimizasyonu

3-siyanopropiltrimetoksisilan ilk defa kullanılan çok yeni bir silanizasyon ajanı olduğundan ve kullanılacak olan konsantrasyonu bioalgılama elementinin bağlanmasını kiritik derecede etkileyeceğinden dolayı CPTMS ile kaplı SAMs yüzeyine elektrotların cevabı EIS ve CV ile dikkatlice izlenmiştir. Bu amaçla, yüzeyinde –OH grupları oluşturulmuş ITO elektrotlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış CPTMS çözeltileri ile (% 0.5,% 1,% 1.5,% 2,% 2.5) gece boyu karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra elektrotlar önce etanol/toluen karışımı daha sonra da ultra saf suyla yıkanıp kurutulmuştur. Konsantrasyonun yüzey istiflenmesine impedimetrik ve voltametrik etkisi EIS ve CV ölçümleriyle belirlenmiştir.

3.3.5.2. Anti-CRP'nin konsantrasyon optimizasyonu

CRP tayinine yönelik geliştirilen CPTMS temelli biyosensörün farklı anti-CRP (biyoalgılama elementi) konsantrasyonlarına verdiği yanıt EIS ve CV teknikleriyle takip edilerek belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar sırasıyla, 3,17, 15,85 ng mL⁻¹, 0,317, 1,585, 3,17, 6,34, 12,56, 25,34 µg mL⁻¹ 'dir. Elde edilen EIS ve CV verileri ışığında, optimum anti-CRP konsantrasyonu belirlenmiş ve ileriki çalışmalara bu konsantrasyon ile devam edilmiştir.

3.3.5.3 Anti-CRP'nin inkübasyon süresinin optimizasyonu

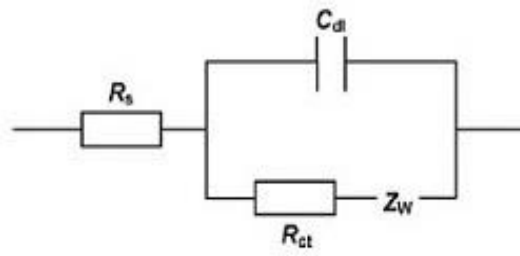
Hassas bir immünosensör için bir başka önemli parametre, antijen-antikor biyo-afinite komplekslerinin oluşumu için gerekli olan inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla, CPTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotları, 30, 45 ve 60 dakika olmak üzere 3 farklı sürede anti-CRP çözeltileri içinde inkübe edilmiştir. Süre sonunda elektrotlar yıkanıp dikkatlice kurutulmuştur. Farklı periyotlar sonunda elde edilen EIS ve CV verileri ışığında, optimum anti-CRP inkübasyon süresi belirlenmiş ve ileri ki çalışmalara bu süre ile devam edilmiştir.

3.3.6. CRP (1) Nöro-biyosensörünün Analitik Performansı

CRP tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum çalışma şartları belirlendikten sonra, nöro-biyosensöre ait bazı analitik karakteristikler aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu özellikler aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

3.3.6.1. CRP (1) Nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tasarlanan biyosensörün analitik özellikleri, optimum koşullar altında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart CRP çözeltilerinin EIS ölçümleri yardımıyla belirlenmiştir. Biyobelirteç konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki “eşdeğer devre modeli” ile belirlenmiştir. (Şekil 3.2)



Şekil 3. 2. Nöro-biyosensör sisteminde kullanılan eşdeğer devre modeli

İmpedimetrik immünosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu eşdeğer devre modeli, Warburg elementinin yanı sıra direnç ve kapasitif elemanlardan oluşmaktadır. R_{ct} yük transfer direncidir, R_s sistemin çalışma çözeltilisinin direncini gösterir, CPE biyoaktif tabakanın sabit faz elemanını gösterir ve Z_w Warburg elementidir. Bu unsurlar arasındaki en dikkat çekici değişim, yük transfer direncine (R_{ct}) aittir. Bu devre, elektron transferinin elektrolitten elektroda doğru olan akışını tanımlamak için uygulanmıştır (Macdonald ve Barsoukov 2005).

Bu bilgiye dayanarak, CRP nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{CRP}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (3.1)$$

burada Rct (CRP), anti-CRP ve CRP arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. Rct (BSA), BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarım daire çapının değeridir.

Lineerlik (Doğrusallık) ölçülen yanıtın doğruluğunu (farklı analit konsantrasyonları ile bir dizi ölçüm için) düz bir çizgi üzerinde gösteren matematiksel olarak, $y = mc$ olarak temsil edilen göstergedir. Burada c analitin konsantrasyonu, y çıkış sinyalıdır ve m , biyosensörün duyarlılığıdır (Bhalla, Jolly ve ark. 2016). Analitin (CRP) 'nin değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak optimize biyosensörün verdiği yanıt kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmiştir.

3.3.6.2. CRP (1) nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Bir biyosensör sistemi için ölçümlerin tekrarlanabilirliği, aynı koşullar altında belli bir konsantrasyon üzerinde yapılan tekrar ölçümlerindeki varyasyon anlamına gelir. Bu, ölçümlerin aynı enstrüman veya yöntemle yapıldığı, insan girişinin gerekli olduğu durumlarda aynı gözlemcinin yer aldığı ve ölçümlerin, temel değer sabit olarak kabul edilebileceği kısa bir süre boyunca yapıldığı anlamına gelir (Bartlett ve Frost 2008).

Tekrarlanabilirlik çalışmaları, optimum şartlar altında hazırlanmış 20 bağımsız ITO elektrodun aynı konsantrasyondaki CRP çözeltileri (52 fg/mL) ile muamele edilmesi ve akabinde EIS ve CV ölçümlerinin alınıp istatistiksel değerlendirilmelerinin yapılmasıyla belirlenmiştir.

3.3.6.3. CRP (1) Nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirlik çalışmaları

Tekrar üretilebilirlik, değişen koşullar altında bir konuda yapılan ölçümlerdeki değişimi ifade eder. Değişen koşullar, kullanılan farklı ölçüm metotları ya da enstrümanlar, farklı gözlemciler ya da değerlendiriciler tarafından yapılan ölçümler tekrar üretilebilirlik çalışmasının içerisinde değerlendirilebilir (Bartlett ve Frost 2008).

ITO esaslı CRP biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle fakat farklı zamanlarda ve farklı araştırmacılar tarafından hazırlanan 10 biyosensör sisteminin belirli CRP tayin aralığındaki cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir.

3.3.6.4. CRP (1) nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (tekrar kullanılabilirlik)

Bir biyosensör için analitik açıdan bir diğer önemli parametre sistemin rejenerasyona verdiği yanıt bir diğer değişle tekrar-kullanılabilirliğinin derecesidir. Tekrar-kullanılabilirlik biyosensörün maliyetine ciddi katkılar sağlayan analitik parametrelerden biridir. Rejenerasyon için farklı teknikler ve reaktifler kullanılabilir. Her durumda, biyoreseptör ve analit arasındaki çekici kuvvetlerin üstesinden gelmek suretiyle rejenerasyon sağlanır (**Goode ve ark. 2014**).

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, CRP antikor-antijen immüno-kompleksini ayrıştırmak için, CPTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotların 5 dakika boyunca 10 mM HCl içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar daha sonrasında ultra saf suyla iyice yıkanıp, argon gazı altında nazikçe kurutulmuştur. İmmunokompleksin ayrışması EIS ile takip edilmiştir. Yüzeyden antijeni iyonik kuvvet yoluyla kopartılmış olan elektrotlar CRP'nin aynı konsantrasyonuyla (52 fg/mL) tekrar muamele edilmiş ve akabinde EIS ölçümü alınmıştır. Tekrar eden bu proses süresince yüzeyin tamamen denatüre olduğu ve biyosensörün çalışma aktivitesini kritik anlamda kaybettiği nokta belirlene dek, biyosensörün rejenerasyon çözeltisiyle muamele edilmesine devam edilmiştir.

3.3.6.5. Sabit Frekansta impedans (SFI) analizi

Antikor / antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi için etkili elektrokimyasal yöntemlerden biri sabit frekanslı impedans analizidir.

Bu amaçla, potansiyostat, Bode eğrilerinin yardımıyla tanımlanan sabit bir frekansa (45 Hz) ayarlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi non-faradaik prosedürle; CRP içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisine daldırılmış ve belirlenen frekansta impedimetrik ölçüm alınmıştır. Zamana bağlı olarak impedimetrik değerde ve faz açısında meydana gelen değişim, antikor-antijen bağlanmasının kinetiksel değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.3.6.6. Kare dalga voltametri

Geliştirilen nöro-biyosensörün karakterizasyon aşamaları sadece EIS ve CV teknikleri ile değil, aynı zamanda EIS gibi bir frekansa bağlı olarak başka bir elektrokimyasal teknik olan SWV tarafından da izlenmiştir.

SWV, katodik PULS ve aynı genlikte anodik puls arasındaki bir dizi potansiyel sinyalin birleşiminden oluşmaktadır.

Bu amaçla, optimal koşullarda hazırlanan CPTMS temelli biyosensör, lineer aralıkta hazırlanan farklı CRP konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. İnkübasyon neticesinde elektrotlar yıkanıp kurutulmuş akabinde ferri-ferro redoks probu içerisinde kare dalga voltametriyle ölçümlenmiştir.

3.3.6.7. CRP (1) nöro-biyosensörünün seçicilik çalışmaları

Seçicilik, bir biyo-reseptörün, diğer katkı maddelerini ve kirlenici maddeleri içeren bir örnekte spesifik bir analit tespit etme kabiliyetidir. Seçiciliğin en iyi örneği, bir antijenin antikora etkileşimi ile tasvir edilir.

CRP tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sisteminin seçiciliği, non spesifik etkileşimlere ΔR_{ct} değerlerindeki değişimlerin takip edilmesiyle belirlenmiştir. Aynı konsantrasyon aralığında hazırlanan; HER-3, haptoglobin, HSP-70 proteinleriyle CPTMS modifiyeli ITO elektrotlar muamele edilmiş ve biyoreseptörün bu proteinlere olan afinitesi değerlendirilmiştir.

3.3.6.8. CRP (1) nöro-biyosensörünün depo ömrü

Geliştirilen CPTMS modifiyeli- ITO tabanlı tek kullanımlık biyosensörün depo ömrü belirli zamanların sonunda immünosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan nöro-biyosensörler +4°C'de muhafaza edilmiş ve 7 günlük periyotta sabit konsantrasyonda (52 fg/mL) CRP ölçümü EIS ile yapılmıştır. İlk gün edilen değer temel alınarak, biyosensörün aktivitesindeki zaman içerisindeki kayıp grafiksel olarak gösterilmiştir.

3.3.6.9. CRP (1) nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması

Geliştirilen biyosensör, farklı konsantrasyonlarda CRP içeren sekiz insan serum örneğinde CRP'nin saptanması için kullanılmıştır. Serum örnekleri Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2013/86/07/05 araştırma etik kurul onayı ile rastgele seçilerek alınmıştır. Biyosensörden elde edilen sonuçlar, referans bir teknikle hastanede belirlenen serum CRP seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. Namık Kemal Üniversitesi Araştırma hastanesinde CRP ölçümleri, immünoturbidimetrik yöntem kullanılarak Roche Diagnostics model no: cobas c 501 otoanalizörü ile gerçekleştirilmektedir. Serum numunelerinin CRP ölçümleri belirtilen referans yöntemle hastanede gerçekleştirildikten sonra serumlar, zaman kaybetmeden araştırma laboratuvarımıza getirilmiştir. Serumlar ölçümler gerçekleştirilene dek belirli porsiyonlar halinde -20° C'de muhafaza edilmiştir. Sağlıklı kişilerden alınan serum CRP içeriği, geliştirilen biyosensörün tayin aralığından daha yüksek konsantrasyona sahip olduğundan ötürü, serum numuneleri 10^7 kez seyreltilmiştir.

3.3.6.10. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Namık Kemal Üniversitesi (NABİLTEM) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde biyosensör üretim prosesinin her bir adımına, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FEI-Quanta FEG 250) işlemi uygulanarak farklı yüzeylerin morfolojik olarak incelenmesi sağlanmıştır. SEM görüntülerini elde etmek için 5 kV bir hızlanma gerilimi kullanılmıştır.

3.3.6.11. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Biyosensör geliştirilirken yüzeyde oluşan bağların doğasını araştırmak amacıyla Namık Kemal Üniversitesi (NABİLTEM) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde $4000-400\text{ cm}^{-1}$ aralığında işletilen Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) spektrumları kaydedilmiştir.

3.4. CRP (2) Nöro-biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu

3.4.1. Elektrotların hazırlanması ve CUTMS ile SAMs oluşumu

Biyosensörün hazırlanmasının ilk adımı ITO-PET elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Bu amaçla ITO elektrotlar başlık 3.3.1.'de anlatıldığı şekilde temizlenmiştir.

Temizlenmiş ITO elektrotların yüzeyinde 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (CUTMS) tabakasının oluşturulabilmesi için öncelikle yüzeyde aktif –hidroksil grupları biriktirmek gerekir. Aktif –OH grupları başlık 3.3.1.'de anlatılan çözelti ile inkübasyon neticesinde oluşturulmuştur.

Temizleme prosedürü ve yüzeyde hidroksil grubu oluşumu tamamlandıktan sonra, ITO elektrotlar saf toluen-etanol karışımında hazırlanan % 0,5 11-CUTMS çözeltisine daldırılmış ve gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, fiziksel olarak adsorbe olmuş 11-CUTMS moleküllerini uzaklaştırmak için, elektrotlar sırasıyla ultra saf su ile yıkanmış ve ultra saf argon gazı ile yavaşça kurutulmuştur.

3.4.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi

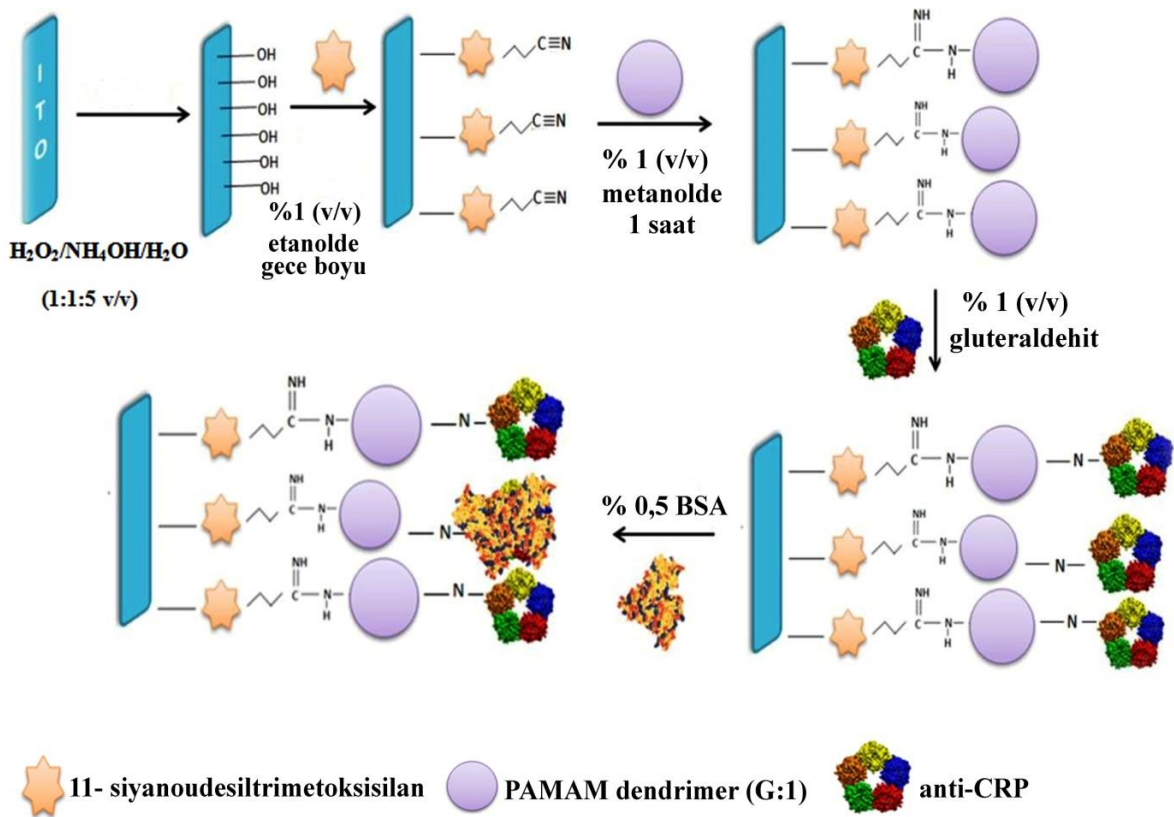
11-CUTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotlar vakit kaybetmeden metanol içinde belirli bir konsantrasyonda hazırlanan PAMAM çözeltisine daldırılmış ve oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda elektrotlar önce ultra saf suyla yıkanıp ardından ultra saf argon gazı ile nazikçe kurutulmuştur.

Daha sonra PAMAM ile modifiye edilmiş elektrotlar, amino gruplarının aktivasyonunda yaygın olarak çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan % 1 glutaraldehit (pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış) çözeltisine daldırılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

11-CUTMS ve PAMAM ile modifiye edilen ITO substratlar, ultra saf suyla yıkanıp argon gazı ile nazikçe kurutulduktan sonra zaman kaybetmeden 100 uL anti-CRP çözeltisine daldırılmıştır. 60 dakikalık inkübasyon sonrasında elektrotlar, bağlanmamış anti-CRP

moleküllerini uzaklaştırmak için yıkanıp ultra saf argon gazıyla kurutulmuştur. Son olarak, anti-CRP antikorunu immobilize edilmiş ITO elektrotları aktif uçların bloke edilmesi için 60 dakika süreyle BSA (% 0.5) ile muamele edildi. Bu işlemin sonunda, elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp ultra saf argon gazı ile yavaşça kurutulmuştur. Bu son adımla birlikte hazır hâle gelen biyosensör CRP ölçümleri yapılabildiği kadar + 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Temiz ve modifiye edilmiş ITO yüzeyler: ITO, ITO-OH, ITO-OH-CUTMS, ITO/CUTMS/PAMAM, ITO/CUTMS/PAMAM /anti-CRP, ITO/CUTMS/PAMAM/anti-CRP/BSA şeklinde ifade edilmiştir. Biyosensörün dizayn stratejisi Şekil 3.3'te şematize edilmiştir.



Şekil 3. 3. Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi

3.4.3. Elektrokimyasal ölçümler

CRP tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün immobilizasyon adımları, optimizasyon testleri ve analitik özellikleri başlık 3.3.3.'de anlatıldığı şekliyle EIS, CV ve SWV teknikleriyle analizlenmiştir.

3.4.4. C-reaktif proteinin ölçüm prensibi

11-CUTMS ve PAMAM ile dekore edilmiş ITO bazlı biyosensörlerin her biri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart CRP çözeltileri ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, biyosensör, fiziksel olarak adsorbe edilmiş CRP moleküllerini uzaklaştırmak için yavaşça ultra saf suya daldırılmıştır. Her bir CRP konsantrasyonunun elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ölçümleri, çalışma elektrotlarını redoks probunda ölçümlemek suretiyle gerçekleştirilmiştir. EIS ve CV ölçümleri EChem Analyst yazılım programı ile kaydedilmiştir.

3.4.5. CRP (2) nöro-biyosensörünün optimizasyon çalışmaları

3.4.5.1. PAMAM dendrimerinin konsantrasyonun optimizasyonu

PAMAM dendrimerler, algılama yüzeyi üzerinde daha fazla anti-CRP'nin immobilize olmasını destekleyen birçok birincil amino gruptan oluşmaktadır. PAMAM konsantrasyonunun optimize edilmesi daha iyi anti-CRP immobilizasyonu ve CRP'nin en uygun şekilde tanınmasını sağlayacaktır. Bu amaçla, 11-CUTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PAMAM (etanol içinde % 0,5, %1, % 1,5 %2) elektrotları ile 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elektrotlar, önce etanol ile daha sonra da ultra saf suyla yıkanıp ultra argon gazıyla nazikçe kurutulmuştur. Farklı PAMAM konsantrasyonlarının sergilediği impedimetrik ve voltametrik davranışlar EIS ve CV ile takip edilmiştir.

3.4.5.2. Anti-CRP'nin konsantrasyon optimizasyonu

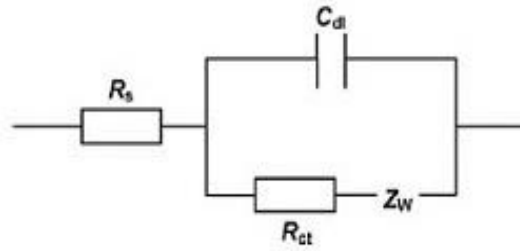
Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında, farklı anti-CRP konsantrasyonlarının biyosensör sistemi cevabı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, farklı konsantrasyonlarda anti-CRP (63,4 ng / mL, 634 ng / mL ve 6,34 ug / mL) çözeltileri ile biyosensörler hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında elektrotlar ultra saf suyla yıkanıp argon gazıyla kurutulmuştur. Farklı anti-CRP konsantrasyonlarından elde edilen EIS ve CV verileri ışığında, optimum anti-CRP konsantrasyonu belirlenmiş ve ileriki çalışmalara bu konsantrasyon ile devam edilmiştir.

3.4.6. CRP (2) nöro-biyosensörünün analitik performansı

CRP tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum çalışma şartları belirlendikten sonra, nöro-biyosensöre ait bazı analitik karakteristikler aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu özellikler aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

3.4.6.1. CRP (2) nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tasarlanan biyosensörün analitik özellikleri, optimum koşullar altında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart CRP çözeltilerinin EIS ölçümleri yardımıyla belirlenmiştir. Biyobelirteç konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki “eşdeğer devre modeli” ile belirlenmiştir. (Şekil 3.4)



Şekil 3. 4. Nöro-biyosensör sisteminde kullanılan eşdeğer devre modeli

İmpedimetrik immünoensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu eşdeğer devre modeli, Warburg elementinin yanı sıra direnç ve kapasitif elemanlardan oluşmaktadır. R_{ct} yük transfer direncidir, R_s sistemin çalışma çözeltilisinin direncini gösterir, CPE biyoaktif tabakanın sabit faz elemanını gösterir ve Z_w Warburg elementidir. Bu unsurlar arasındaki en dikkat çekici değişim, yük transfer direncine (R_{ct}) aittir. Bu devre, elektron transferinin elektrolitten elektroda doğru olan akışını tanımlamak için uygulanmıştır (Macdonald ve Barsoukov 2005).

Bu bilgiye dayanarak, CRP nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{CRP}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (3.2)$$

burada Rct (CRP), anti-CRP ve CRP arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. Rct (BSA), BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarım daire çapının değeridir.

Lineerlik (Doğrusallık) ölçülen yanıtın doğruluğunu (farklı analit konsantrasyonları ile bir dizi ölçüm için) düz bir çizgi üzerinde gösteren matematiksel olarak, $y = mc$ olarak temsil edilen göstergedir. Burada c analitin konsantrasyonu, y çıkış sinyalıdır ve m , biyosensörün duyarlılığıdır (Bhalla, Jolly ve ark. 2016). Analitin (CRP) 'nin değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak optimize biyosensörün verdiği yanıt kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmiştir.

3.4.6.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

CRP tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirlik performansı optimum şartlar altında hazırlanan 18 bağımsız ITO elektrodun aynı CRP konsantrasyonu (1,7 pg/mL) ile muamele edilmesiyle ve akabinde EIS ve CV verilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesiyle belirlenmiştir.

3.4.6.3 CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirlik çalışmaları

ITO esaslı CRP biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle fakat farklı zamanlarda hazırlanan 10 biyosensör sisteminin belirli CRP tayin aralığındaki cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir.

3.4.6.4. CRP nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (Tekrar kullanılabilirlik)

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, CRP antikor-antijen immüno-kompleksini ayrıştırmak için, CUTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotların 5 dakika boyunca 10 mM HCl içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar daha sonrasında ultra saf suyla iyice yıkanıp, argon gazı altında nazıkçe kurutulmuştur. İmmunokompleksin ayrışması EIS ile takip edilmiştir. Yüzeyden antijeni iyonik kuvvet yoluyla kopartılmış olan elektrotlar CRP aynı konsantrasyonu (1,7 pg/mL) tekrar muamele edilmiş ve akabinde EIS ölçümü alınmıştır. Tekrar eden bu proses süresince yüzeyin tamamen denatüre olduğu ve

biyosensörün çalışma aktivitesini kritik anlamda kaybettiği nokta belirlene dek, biyosensörün rejenerasyon çözeltisiyle muamele edilmesine devam edilmiştir.

3.4.6.5. Sabit frekansta impedans (SFI) analizi

Antikor / antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi için etkili elektrokimyasal yöntemlerden biri sabit frekanslı impedans analizidir.

Bu amaçla, potansiyostat, Bode eğrilerinin yardımıyla tanımlanan sabit bir frekansa (10 Hz) ayarlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi non-faradaik prosedürle; CRP içeren 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisine daldırılmış ve belirlenen frekansta impedimetrik ölçüm alınmıştır. Zamana bağlı olarak impedimetrik değerde ve faz açısında meydana gelen değişim, antikor-antijen bağlanmasının kinetiksel değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.4.6.6. Kare dalga voltametri

Geliştirilen nöro-biyosensörün karakterizasyon aşamaları sadece EIS ve CV teknikleri ile değil, aynı zamanda EIS gibi bir frekansa bağlı olarak başka bir elektrokimyasal teknik olan SWV tarafından da izlenmiştir. 11-CUTMS ve PAMAM ile dekore edilmiş elektrotların belirli tayin aralığındaki CRP ölçümleri başlık 3.3.6.6 anlatıldığı prensiple gerçekleştirilmiştir.

3.4.6.7. CRP (2) nöro-biyosensörünün seçicilik çalışmaları

CRP tayinine yönelik geliştirilen 11-CUTMS/PAMAM modifiyeli nöro-biyosensörün başka proteinlere karşı oluşabilecek afinitesi başlık 3.3.6.7. 'de anlatılan tekniklerle araştırılmıştır. Seçicilik araştırması yapılırken kullanılan proteinler; HSP70, haptoglobin, HER-3'dür.

3.4.6.8. CRP (2) nöro-biyosensörünün depo ömrü

Geliştirilen 11-CUTMS/PAMAM modifiyeli- ITO tabanlı tek kullanımlık biyosensörün depo ömrü belirli zamanların sonunda immünosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan nöro-biyosensörler +4°C'de muhafaza edilmiş ve 7 günlük periyotta sabit konsantrasyonda CRP'nin (1,7 pg/mL) EIS ile

ölçümlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk gün edilen değer temel alınarak, biyosensörün aktivitesindeki zaman içerisindeki kayıp grafiksel olarak gösterilmiştir.

3.4.6.9. CRP (2) nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması

Geliştirilen 11-CUTMS/PAMAM modiyeli biyosensör sisteminin gerçek örneklerde uygulanabilirliği başlık 3.3.6.9'da anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilmiştir. Serumlar ölçümler gerçekleştirilene dek belirli porsiyonlar halinde -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Sağlıklı bir kişiden alınan serum CRP içeriği, geliştirilen biyosensörün tayin aralığından daha yüksek konsantrasyona sahip olduğundan ötürü, serum numuneleri 10^6 kat seyreltilmiştir.

3.4.6.10. Taramalı Elektron mikroskopu (SEM)

Biyosensör geliştirilirken yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler başlık 3.3.6.10'da anlatıldığı gibi SEM ile takip edilmiştir.

3.4.6.11. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Biyosensör geliştirilirken oluşan bağlar FTIR ile başlık 3.3.6.11'de anlatıldığı gibi değerlendirilmiştir.

3.5. Synuclein alfa nöro-biyosensörünün Dizayını ve Fabrikasyonu

3.5.1. Elektrotların hazırlanması ve altın nanopartikülün biriktirilmesi

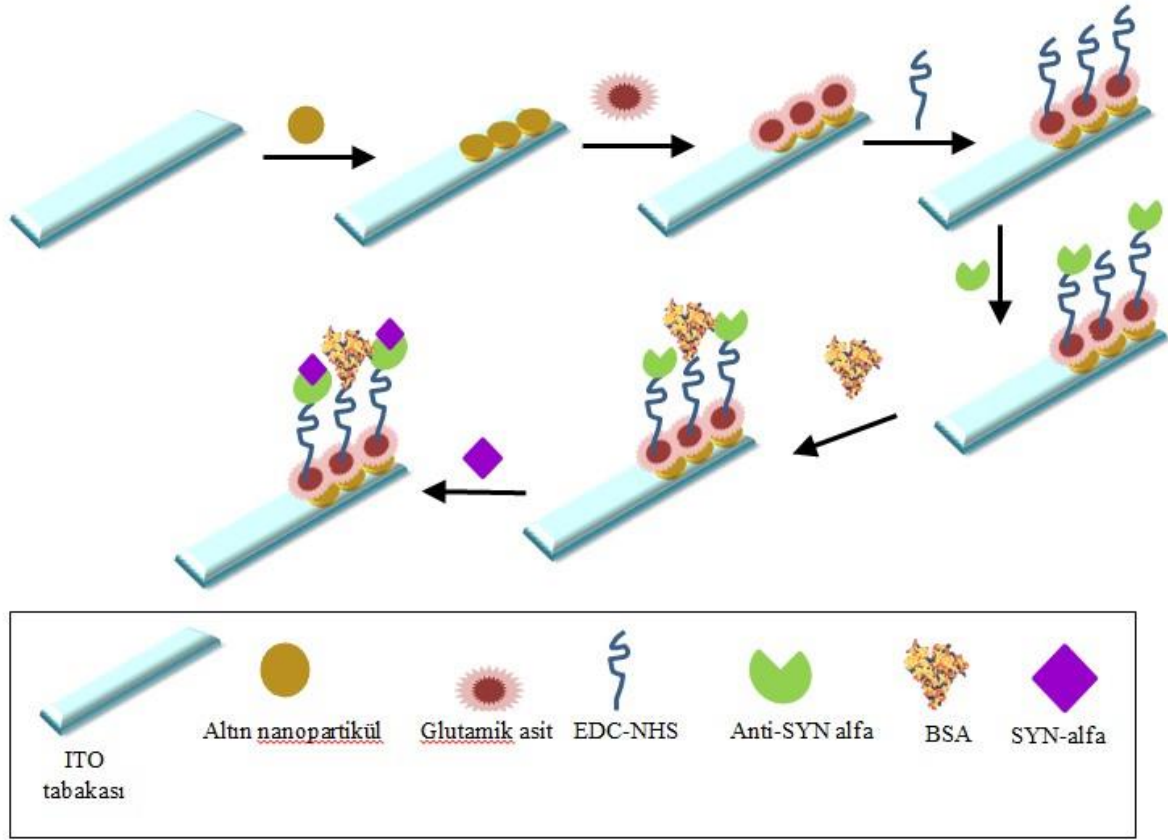
Nöro-biyosensörün hazırlanmasının ilk adımı ITO-PET elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Bu amaçla ITO elektrotlar sırasıyla aseton, sabun çözeltisi ve ultra saf su içerisinde 10 dakika sonike edilip ardından ultra saf argon gazıyla kurutulmuştur. Temizlenen elektrotlar yüzeylerinde aktif $-\text{OH}$ grupları başlık 3.3.1'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur. Daha sonra ultra saf suyla yıkanıp, argon gazı ile kurutulan elektrotlar, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 mM) çözeltisi içeren elektrokimyasal hücreye daldırılmıştır. ITO yüzeyinde altın nanopartiküllerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi $-0,2\text{ V} - (-) 1,3\text{ V}$ potansiyel arasında 50 mV/s tarama hızında ard arda 10 döngü ile gerçekleştirilmiştir (Ma, Di ve ark. 2009). Ardından elektrotlar ultra saf suyla yıkanıp, argon gazıyla kurutulup karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.5.2. Synuclein alfa (SYN-alfa) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi

Yüzeyde altın nanopartiküller biriktirilmiş ITO elektrotlar, glutamik asit monomerinin elektropolimerizasyonu ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla elektrotlar 50 mM Ph 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış glutamik asit çözeltisine daldırılmış ve -0,8 V- +2,0 V potansiyel aralığında (100 mV/s , 10 döngü) elektropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Santos, Zanoni ve ark. 2008). Daha sonra elektrotlar, ultra saf suyla yıkanıp, argon gazıyla nazikçe kurutulmuştur. Ardından elektrotlar, Poli-glutamik asitte (PGA) bulunan karboksilik asit terminal gruplarının aktivasyonu ve bu grupların anti-SYN alfa antikoruandaki amino gruplarıyla kovalent etkileşimi için 0,4 mM EDC ve 0,1 mM NHS içeren sulu çözeltiye daldırılarak oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir. Ultra saf suyla yıkanıp ultra argon gazıyla kurutulmuş elektrotlar akabinde 100 µL anti-SYN alfa içeren çözeltiye daldırılmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Anti-SYN alfa antikoru ile inkübasyondan sonra elektrotlar bağlanmamış antikor moleküllerini uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkanmış ve ardından argon gazı ile kurutulmuştur. Son olarak anti-SYN alfa'nın immobilize edildiği altın nanopartikül katkılı poli-glutamik asit modifiyeli elektrotlar, reaktif olmayan uçları bloklamak ve non-spesifik etkileşimleri önlemek amacıyla %0,5 BSA çözeltisinde 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu son adımla birlikte, hazırlanan nöro -biyosensör, SYN-alfa ölçümleri gerçekleştirilene dek + 4 ° C'de muhafaza edilmiştir. Temiz ve modifiye edilmiş ITO yüzeyler: ITO, ITO-OH, ITO-OH-AuNP, ITO/AuNP/PGA, ITO/AuNP/PGA/anti-SYN alfa ve ITO/AuNP/PGA/anti-SYN alfa/BSA şeklinde ifadelendirilmiştir. Biyosensörün dizayn stratejisi Şekil 3.5' te şematize edilmiştir.

3.5.3. Elektrokimyasal Ölçümler

SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün immobilizasyon adımları, optimizasyon testleri ve analitik özellikleri başlık 3.3.3.'te anlatıldığı şekliyle EIS, CV ve SWV teknikleriyle analizlenmiştir.



Şekil 3. 5. Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi

3.5.4. SYN-alfanın ölçüm prensibi

Altın nanopartikül katkılı, glutamik asit modifiyeli ITO bazlı elektrotların her biri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart SYN-alfa çözeltileri ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, nöro-biyosensör, fiziksel olarak adsorbe olmuş SYN alfa moleküllerini uzaklaştırmak için yavaşça ultra saf suya yıkanmıştır. Her bir SYN alfa konsantrasyonunun elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ölçümleri, çalışma elektrotlarını redoks probunda ölçümlenmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. EIS ve CV ölçümleri EChem Analyst yazılım programı ile kaydedilmiştir.

3.5.5. SYN alfa Nöro-biyosensörünün Optimizasyon Çalışmaları

3.5.5.1. Monomer Konsantrasyonunun Etkisi

Glutamik asit konsantrasyonu, anti-SYN alfa immobilizasyonunu etkileyen önemli bir faktördür. Dolayısıyla bu adımın optimize edilmesi amacıyla glutamik asidin altın nanopartikül katkılı ITO substratların yüzeyinde elektropolimerizasyonu farklı monomer konsantrasyonlarında test edilmiştir. Bu amaçla 10, 20 ve 50 mM glutamik asit monomerleri başlık 3.5.2’de anlatıldığı gibi elektropolimerize edilmiş ve akabinde elektrotların sergilediği impedimetrik ve voltametrik davranışlar kaydedilmiştir.

3.5.5.2. Elektropolimerizasyon Döngü sayısının etkisi

Elektro-polimerizasyon döngüsü, anti-SYN alfa immobilizasyonunu etkileyecek şekilde PGA'nın morfolojisini ve performansını etkileyen bir başka önemli faktördür. Bu adımın optimizasyonu için, glutamik asit monomerinin polimerizasyonu 6, 10 ve 15 döngü sayılarında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar EIS ve CV ile takip edilmiştir. Elde edilen EIS ve CV verileri ışığında, optimum döngü sayısı belirlenmiş ve ileriki çalışmalara bu parametre ile devam edilmiştir.

3.5.5.3. Anti-SYN alfa konsantrasyon optimizasyonu

Anti-SYN konsantrasyonunun tasarlanmış nöro-biyosensör sistemi yanıtı üzerindeki etkisi farklı konsantrasyonlarda anti SYN ile hazırlanmış biyosensör sistemlerinin farklı konsantrasyonlardaki SYN alfa çözeltilerinin ölçümlerinin değerlendirilmesiyle tespit edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan 11, 50, ve 110 ng/mL anti-SYN alfa çözeltileri oda sıcaklığına 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra başlık 3.5.4’de anlatıldığı üzere SYN alfa ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen EIS ve CV verileri ışığından optimum anti-SYN alfa konsantrasyonuna karar verilmiş ve ileriki çalışmalara bu konsantrasyonla devam edilmiştir.

3.5.6. SYN-alfa nöro-biyosensörünün analitik performansı

SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum çalışma şartları belirlendikten sonra, nöro-biyosensöre ait bazı analitik karakteristikler aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu özellikler aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

3.5.6.1. SYN-alfa nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tasarlanan biyosensörün analitik özellikleri, optimum koşullar altında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart SYN-alfa çözeltilerinin EIS ölçümleri yardımıyla belirlenmiştir. Biyobelirteç konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki başlık 3.4.6.1’de anlatılan ve açıklaması yapılan “eşdeğer devre modeli” ile belirlenmiştir.

Başlık 3.3.6.1.’de bahsedilen bilgiler ışığında Bu bilgiye dayanarak, SYN-alfa nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(SYN\alpha) - R_{ct}(BSA) \quad (3.3)$$

burada $R_{ct}(SYN\alpha)$, anti- $SYN\alpha$ ve $SYN\alpha$ arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. $R_{ct}(BSA)$, BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarımları çapının değeridir.

Analitin ($SYN\alpha$) ‘nin değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak optimize biyosensörün verdiği yanıt kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmiştir.

3.5.6.2. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirlik performansı optimum şartlar altında hazırlanan 20 bağımsız ITO elektrodun aynı SYN alfa konsantrasyonu (100 pg/mL) ile muamele edilmesiyle ve akabinde EIS ve CV verilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesiyle belirlenmiştir.

3.5.6.3. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirlik çalışmaları

ITO esaslı SYN alfa biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle fakat farklı zamanlarda hazırlanan 8 nöro- biyosensör sisteminin belirli konsantrasyonlardaki SYN-alfa tayin aralığındaki cevapların izlenmesi ile değerlendirilmiştir.

3.5.6.4. SYN alfa nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (Tekrar kullanılabilirlik)

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, SYN alfa antikor-antijen immüno-kompleksini ayrıştırmak için, AuNP katkılı PGA modifiyeli ITO elektrotların 8 dakika boyunca 0,2 M pH 2,8 glisin-HCl tamponu içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar daha sonrasında ultra saf suyla iyice yıkanıp, argon gazı altında nazikçe kurutulmuştur. İmmunokompleksin ayrışması EIS ile takip edilmiştir. Yüzeyden antijeni iyonik kuvvet yoluyla kopartılmış olan elektrotlar SYN alfa'nın aynı konsantrasyonu (100 pg/mL) tekrar muamele edilmiş ve akabinde EIS ölçümü alınmıştır. Tekrar eden bu proses süresince yüzeyin tamamen denatüre olduğu ve biyosensörün çalışma aktivitesini kritik anlamda kaybettiği nokta belirlene dek, biyosensörün rejenerasyon çözeltisiyle muamele edilmesine devam edilmiştir (Sha, Guo ve ark. 2015).

3.5.6.5. Sabit frekansta impedans (SFI) analizi

Antikor / antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi için etkili elektrokimyasal yöntemlerden biri sabit frekanslı impedans analizidir.

Bu amaçla, potansiyostat, Bode eğrilerinin yardımıyla tanımlanan sabit bir frekansa (7 Hz) ayarlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi non-faradaik prosedürle; SYN alfa içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisine daldırılmış ve belirlenen frekansta impedimetrik ölçüm alınmıştır. Zamana bağlı olarak impedimetrik değerlerde ve faz açısında meydana gelen değişim, antikor-antijen bağlanmasının kinetiksel değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.5.6.6. Kare dalga voltametri

Geliştirilen nöro-biyosensörün karakterizasyon aşamaları sadece EIS ve CV teknikleri ile değil, aynı zamanda EIS gibi frekansa bağımlı başka bir elektrokimyasal teknik olan SWV tarafından da izlenmiştir. Altın nanopartikül katkılı poli glutamik asit ile dekore edilmiş

elektrotların belirli tayin aralığındaki SYN alfa ölçümleri başlık 3.3.6.6 anlatıldığı prensible gerçekleştirilmiştir.

3.5.6.7. SYN alfa nöro-biyosensörünün seçicilik çalışmaları

SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen AuNP/PGA modifiyeli nöro-biyosensörün başka proteinlere karşı oluşabilecek afinitesi başlık 3.3.6.7. 'de anlatılan teknikle araştırılmıştır. Seçicilik araştırması yapılırken kullanılan proteinler; RACK-1, Tau-441, ve HSP-70'dir.

3.5.6.8. SYN alfa nöro-biyosensörünün depo ömrü

Geliştirilen AuNP/PGA modifiyeli- ITO tabanlı tek kullanımlık biyosensörün depo ömrü belirli zamanların sonunda immünosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan nöro-biyosensörler +4°C'de muhafaza edilmiş ve 7 günlük periyotta sabit konsantrasyonda SYN alfa'nin (100 pg/mL) EIS ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk gün edilen değer temel alınarak, biyosensörün aktivitesindeki zaman içerisindeki kayıp grafiksel olarak gösterilmiştir.

3.5.6.9. SYN-alfa nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması

Üretilen nöro-biyosensörün fizibilite ve analitik güvenilirliğini değerlendirmek için insan serebrospinal (beyin omurilik-BOS) sıvısındaki SYN alfa miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Standart ekleme için kullanılan SYN alfa konsantrasyonları 25 pg / mL ve 500 pg / mL'dir. BOS örnekleri Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2013/86/07/05 araştırma etik kurul onayı ile rastgele seçilerek toplanmıştır. BOS örnekleri ölçümler gerçekleştirilene dek belirli porsiyonlar halinde -20° C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.6.10. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Biyosensör geliştirilirken yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler başlık 3.3.6.10'da anlatıldığı gibi SEM ile takip edilmiştir.

3.5.6.11. Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Biyosensör geliştirilirken oluşan bağlar FTIR ile başlık 3.3.6.11’de anlatıldığı gibi değerlendirilmiştir.

3.6. Tau-441 nöro-biyosensörünün dizaynı ve fabrikasyonu

3.6.1. Elektrotların hazırlanması ve rGO ile modifikasyon

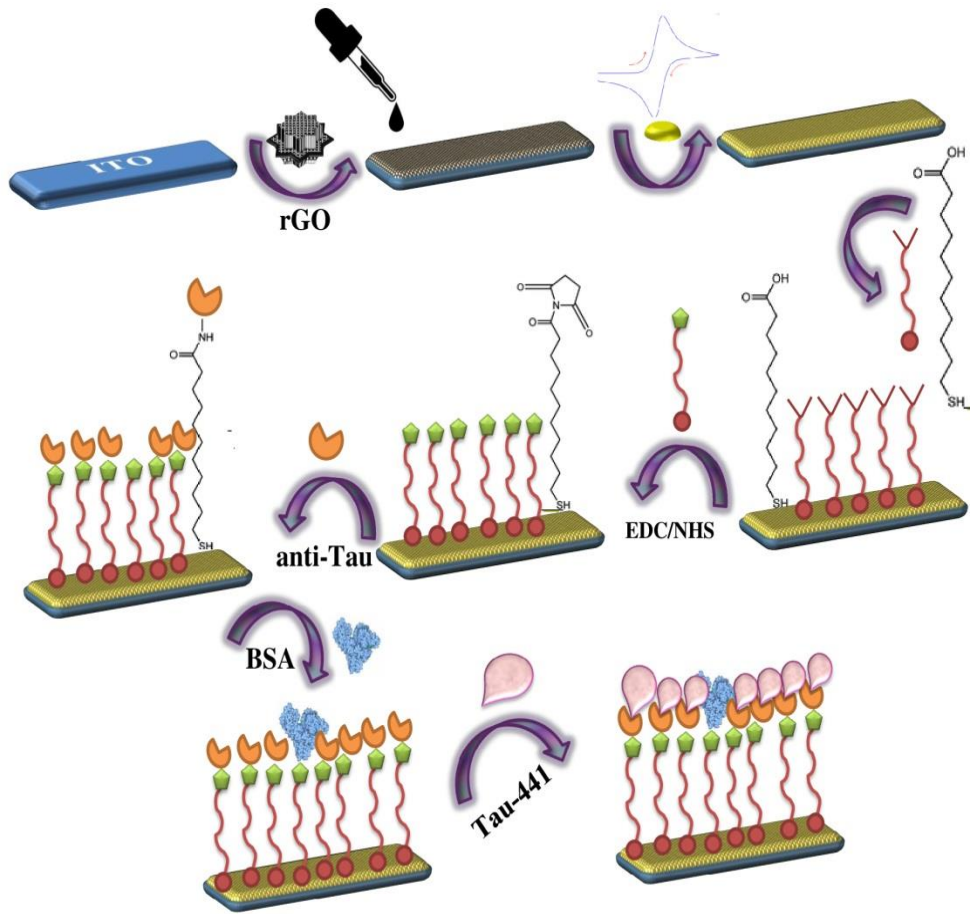
Nöro-biyosensörün hazırlanmasının ilk adımı ITO-PET elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Bu amaçla ITO elektrotlar sırasıyla aseton, sabun çözeltisi ve ultra saf su içerisinde 10 dakika sonike edilip ardından ultra saf argon gazıyla iyice kurutulmuştur. DMF içerisinde disperse edilmiş İndirgenmiş grafen oksit (rGO) çözeltisi ultrasonikasyonda 60 dakika sonike edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan rGO dispersiyon çözeltisinden 15 µL, temiz ITO-PET elektrotların üzerine damlatılmış ve elektrotlar gece boyu kurumaya bırakılmıştır.

3.6.2. Tau-441 nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi

rGO ile modifiye edilen ITO elektrotlar, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 mM) çözeltisi içeren elektrokimyasal hücreye daldırılarak ITO yüzeyinde altın nanopartiküllerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi -0,2 V- (-)1,3 V potansiyel arasında 50 mV/s tarama hızında ard arda 10 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Oluşan rGO-GNP nanokompozit, önce ultra saf suyla yıkanıp, ardından ultra saf argon gazıyla kurutulmuştur. Yüzeyinde Rgo-GNP nanokompozit oluşturulan elektrotlar etanol içerisinde hazırlanan 11-merkaptoundekanoik asit çözeltisi içerisinde daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında elektrotlar önce etanol daha sonra ultra saf suyla yıkanarak kurutulmuştur. Nanokompozit katkılı, 11-MUA ile SAMs oluşturulmuş elektrotlar 11-MUA’da bulunan karboksilik asit terminal gruplarının aktivasyonu ve bu grupların anti-Tau antikorundaki amino gruplarıyla kovalent etkileşimi için 0,4 mM EDC ve 0,1 mM NHS içeren sulu çözeltiye daldırılarak oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir.

Ultra saf suyla yıkanıp ultra argon gazıyla kurutulan elektrotlar akabinde 100 µL anti-Tau içeren çözeltiye daldırılmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Anti-Tau antikoru ile inkübasyondan sonra elektrotlar bağlanmamış antikor moleküllerini uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkanmış ve ardından argon gazı ile

kurutulmuştur. Son olarak anti-Tau'nun immobilize edildiği Rgo-GNP nanokompozit katkılı, 11-mua modifiyeli elektrotlar, reaktif olmayan uçları bloklamak ve non-spesifik etkileşimleri önlemek amacıyla %0,5 BSA çözeltisinde 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu son adımla birlikte, hazırlanan nöro -biyosensör, Tau-441 ölçümleri gerçekleştirilene dek + 4 ° C'de muhafaza edilmiştir. Temiz ve modifiye edilmiş ITO yüzeyler: ITO, ITO-rGO, ITO/rGO/AuNP, ITO/rGO/AuNP/11-MUA ve ITO/Rgo/GNP, ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau, ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau/BSA, ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau/BSA/Tau şeklinde ifadelendirilmiştir. Biyosensörün dizayn stratejisi Şekil 3.6 şematize edilmiştir.



Şekil 3. 6. Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi

3.6.3. Elektrokimyasal ölçümler

Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün immobilizasyon adımları, optimizasyon testleri ve analitik özellikleri başlık 3.3.3.'de anlatıldığı şekliyle EIS, CV ve SWV teknikleriyle analizlenmiştir.

3.6.4. Tau-441'in ölçüm prensibi

Nanokompozit katkılı (rGO-AuNP), 11-MUA modifiyeli ITO bazlı elektrotların her biri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart Tau-441 çözeltileri ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, nöro-biyosensör, fiziksel olarak adsorbe olmuş Tau-441 moleküllerini uzaklaştırmak için yavaşça ultra saf suya yıkanmıştır. Her bir Tau-441 konsantrasyonunun elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ölçümleri, çalışma elektrotlarını redoks probunda ölçümlemek suretiyle gerçekleştirilmiştir. EIS ve CV ölçümleri EChem Analyst yazılım programı ile kaydedilmiştir.

3.6.5. Tau-441 Nöro-biyosensörünün Optimizasyon Çalışmaları

3.6.5.1. Optimum rGO konsantrasyonunun belirlenmesi

İndirgenmiş grafen oksit (rGO) anti-Tau immobilizasyonuna etkisini araştırmak ve optimal konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, dizayn edilen nöro-biyosensör sistemi farklı konsantrasyonlarda rGO dispersiyon çözeltileri ile hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar; 0,5 mg/mL, 1,5 mg/mL ve 2,5 mg/mL'dir (DMF içerisinde). Daha sonra elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp ardından ultra saf argon gazı ile kurutulularak başlık 3.6.2'de anlatılan stratejiyle dizayn edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardan elde edilen EIS ve CV değerleri kaydedilmiştir.

3.6.5.2. 11-MUA konsantrasyon optimizasyonu

rGO ve GNP ile ITO elektrot yüzeyinde oluşturulan nanokompozit film üzerine 11-MUA ile SAMs oluşturulması aşamasına 11-MUA konsantrasyonunun etkisi, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 11-MUA (5, 20, 50, 100 mM) çözeltileri ile nöro-biyosensörün geliştirilmesi ve akabinde Tau-441'in ölçülmesi ile belirlenmiştir. Farklı

konsantrasyonlardaki 11-MUA çözeltileri ile gece boyu inkübe edilen elektrotların, başlık 3.6.2.'de bahsedildiği stratejiyle dizayn edilmesi neticesinde elde edilen EIS ve CV değerleri kaydedilmiştir.

3.6.5.3. Anti-Tau konsantrasyon optimizasyonu

Anti-Tau konsantrasyonunun tasarlanmış nöro-biyosensör sistemi yanıtı üzerindeki etkisi farklı konsantrasyonlarda anti-Tau ile hazırlanmış biyosensör sistemlerinin farklı konsantrasyonlardaki Tau-441 çözeltilerinin ölçümlerinin değerlendirilmesiyle tespit edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan 10, 50, ve 100 ng/mL anti-Tau çözeltileri oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra başlık 3.6.4'de anlatıldığı üzere Tau-441 ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen EIS ve CV verileri ışığında optimum anti-Tau konsantrasyonuna karar verilmiş ve ileri ki çalışmalara bu konsantrasyonla devam edilmiştir.

3.6.6. Tau-441 nöro-biyosensörünün analitik performansı

Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum çalışma şartları belirlendikten sonra, nöro-biyosensöre ait bazı analitik karakteristikler aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu özellikler aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

3.6.6.1. Tau-441 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tasarlanan biyosensörün analitik özellikleri, optimum koşullar altında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart Tau-441 çözeltilerinin EIS ölçümleri yardımıyla belirlenmiştir. Biyobelirteç konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki başlık 3.3.6.1'de anlatılan ve açıklaması yapılan “eşdeğer devre modeli” ile belirlenmiştir.

Başlık 3.3.6.1.'de bahsedilen bilgiler ışığında, Tau-441 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{Tau-441}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (3.4)$$

burada $R_{ct}(\text{Tau-441})$, anti- Tau ve Tau-441 arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. $R_{ct}(\text{BSA})$, BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarımlaştırma çapının değeridir.

Analitin (Tau-441) 'nin değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak optimize nöro-biyosensörün verdiği yanıt kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmiştir.

3.6.6.2. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirlik performansı optimum şartlar altında hazırlanan 20 bağımsız ITO elektrodun aynı Tau-441 konsantrasyonu (100 pg/mL) ile muamele edilmesiyle ve akabinde EIS ve CV verilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesiyle belirlenmiştir.

3.6.6.3. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirlik çalışmaları

ITO esaslı Tau-441 biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle fakat farklı zamanlarda hazırlanan 6 nöro- biyosensör sisteminin belirli konsantrasyon aralığındaki Tau-441 cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir.

3.6.6.4. Tau-441 nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (tekrar-kullanılabilirlik)

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, Tau-441 antikor-antijen immüno-kompleksini ayırştırmak için, Nanokompozit katkılı 11-MUA modifiyeli ITO elektrotların 5 dakika boyunca 0,05 M pH 3,5 glisin-HCl tamponu içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar daha sonrasında ultra saf suyla iyice yıkanıp, argon gazı altında nazikçe kurutulmuştur. İmmunokompleksin ayrışması EIS ile takip edilmiştir. Yüzeyden antijeni iyonik kuvvet yoluyla kopartılmış olan elektrotlar Tau-441'in aynı konsantrasyonu (100 pg/mL) tekrar muamele edilmiş ve akabinde EIS ölçümü alınmıştır. Tekrar eden bu proses süresince yüzeyin tamamen denatüre olduğu ve biyosensörün çalışma aktivitesini kritik anlamda kaybettiği nokta belirlene dek, biyosensörün rejenerasyon çözeltisiyle muamele edilmesine devam edilmiştir.

3.6.6.5. Sabit frekansta impedans analizi

Antikor / antijen bağlanması kinetik davranışının izlenmesi için etkili elektrokimyasal yöntemlerden biri sabit frekanslı impedans analizidir.

Bu amaçla, potansiyostat, Bode eğrilerinin yardımıyla tanımlanan sabit bir frekansa (10 Hz) ayarlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi non-faradaik prosedürle; Tau-441 içeren 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisine daldırılmış ve belirlenen frekansta impedimetrik ölçüm alınmıştır. Zamana bağlı olarak impedimetrik değerde ve faz açısında meydana gelen değişim, antikor-antijen bağlanmasının kinetiksel değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.6.6.6. Tau-441 nörobiyosensörünün seçicilik çalışmaları

Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün başka proteinlere karşı oluşabilecek afinitesi başlık 3.3.6.7. 'de anlatılan teknikle araştırılmıştır. Seçicilik araştırması yapılırken kullanılan proteinler; aynı konsantrasyon aralığında RACK-HSP-70 ve synuclein alfadır.

3.6.6.7. Tau-441 nöro-biyosensörünün depo ömrü

Geliştirilen Nanokompozit/11-MUA modifiyeli- ITO tabanlı tek kullanımlık biyosensörün depo ömrü belirli zamanların sonunda immünosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan nöro-biyosensörler +4°C'de muhafaza edilmiş ve 7 günlük periyotta sabit konsantrasyonda Tau-441'in (100 pg/mL) EIS ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk gün edilen değer temel alınarak, biyosensörün aktivitesindeki zaman içerisindeki kayıp grafiksel olarak gösterilmiştir.

3.6.6.8. Tau-441 nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması

Üretilen nöro-biyosensörün fizibilite ve analitik güvenilirliğini değerlendirmek için insan serebrospinal (beyin omurilik-BOS) sıvısındaki ve insan serumundaki Tau-441 miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Standart ekleme için kullanılan Tau-441 konsantrasyonları 100 pg / mL ve 400 pg / mL'dir. Her bir BOS ve serum örneği için ölçümler 3 kere tekrarlanmıştır. BOS ve serum örnekleri Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2013/86/07/05 araştırma etik kurul onayı ile rastgele seçilerek toplanmıştır. BOS ve serum örnekleri ölçümler gerçekleştirilene dek belirli porsiyonlar halinde -20° C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.6.9. Taramalı elektron mikroskobu

Biyosensör geliştirilirken yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler başlık 3.3.6.10'da anlatıldığı gibi SEM ile takip edilmiştir.

3.6.6.10. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Biyosensör geliştirilirken oluşan bağlar FTIR ile başlık 3.3.6.11'de anlatıldığı gibi değerlendirilmiştir.

3.6.6.11. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)

AFM yüzey topografisini angstrom seviyesinden 100 microns kadar ölçebilen bir metodur. Çok duyarlı cantilever yüzeyi taramasıyla Atomik seviyedeki kuvvetleri (nN)ölçebilir. Geliştirilen nöro-biyosensörün yüzey topografisindeki değişimler AFM ile değerlendirilmiştir. AFM analizi, AFM PLUS +, NanoMagnetic Instruments kullanılarak NKÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (NABİLTEM) yapılmıştır Görüntüler AFM' nin tapping modu kullanılarak elde edilmiştir.

3.7. PARK-7 (DJ-1) Nöro-Biyosensörünün Dizaynı ve Fabrikasyonu

3.7.1. Elektrotların hazırlanması ve altın nanopartiküllerin amino tiyol ile fonksiyonelleştirilmesi

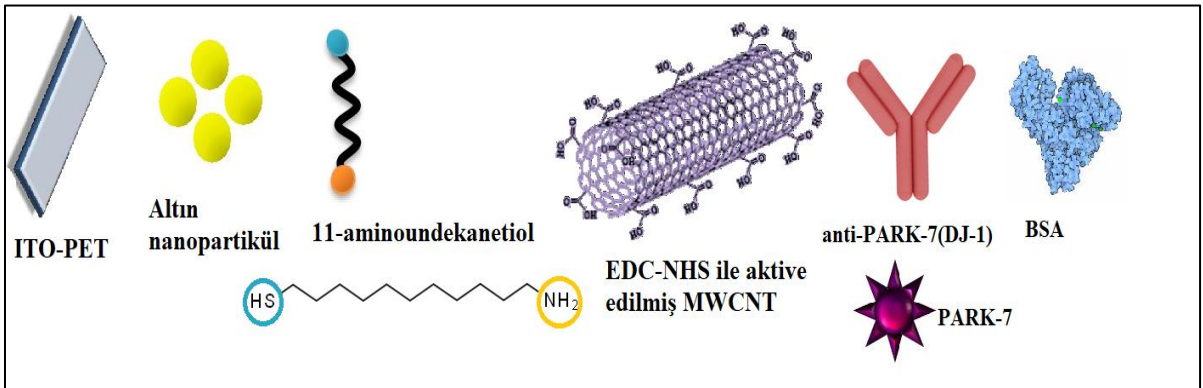
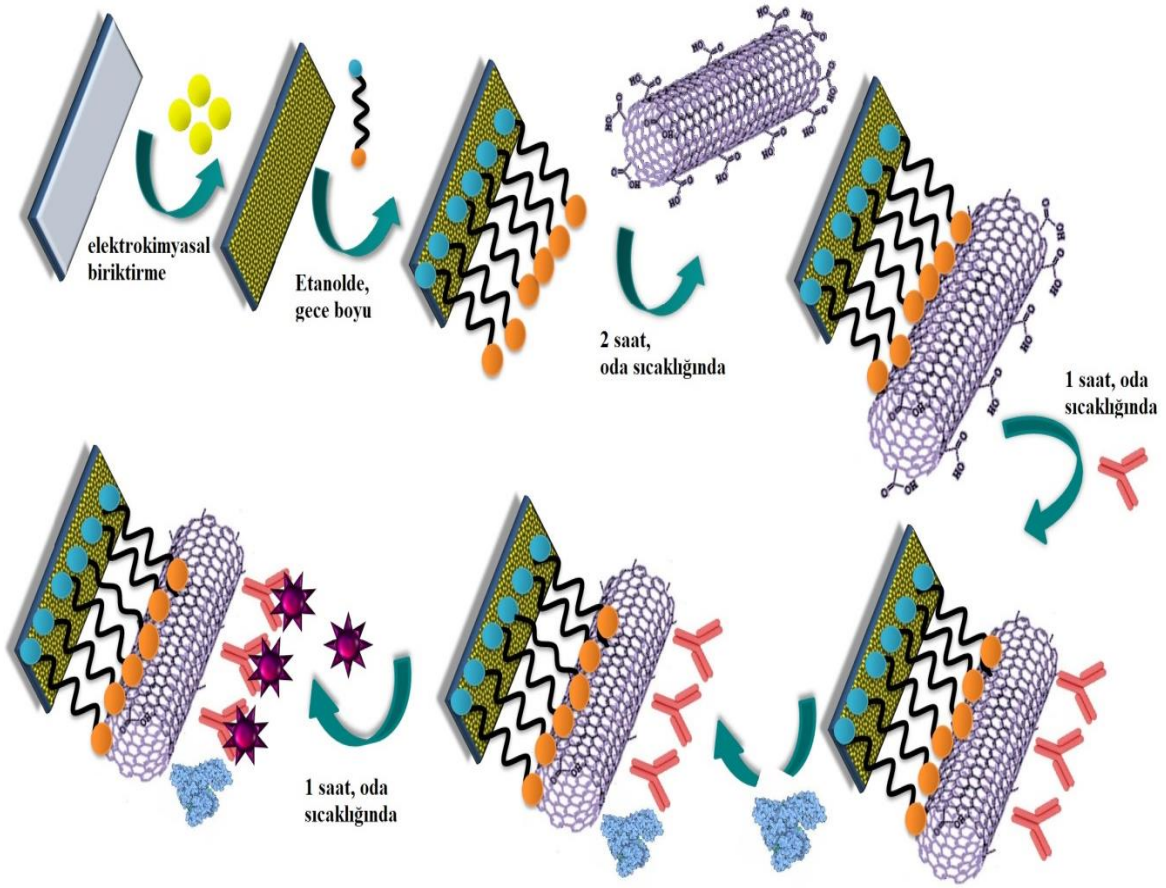
Nöro-biyosensörün hazırlanmasının ilk adımı ITO-PET elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Bu amaçla ITO elektrotlar sırasıyla aseton,sabun çözeltisi ve ultra saf su içerisinde 10 dakika sonike edilip ardından ultra saf argon gazıyla kurutulmuştur. Temizlenen elektrotlar yüzeylerinde aktif –OH grupları başlık 3.3.1'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur. Daha sonra ultra saf suyla yıkanıp, argon gazı ile kurutulan elektrotlar, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan H_{Au}Cl₄.3H₂O (1 mM) çözeltisi içeren elektrokimyasal hücreye daldırılmıştır. ITO yüzeyinde altın nanopartiküllerin (GNP) elektrokimyasal olarak biriktirilmesi -0,2 V- (-)1,3 V potansiyel arasında 50 mV/s tarama hızında ard arda 10 döngü ile gerçekleştirilmiştir.

Altın nanopartikül katkılı ITO elektrotlar, yüzeyde SAMs oluşturmak için etanol çözeltisi içinde hazırlanan 11-amino-1-undekanetiol (11-AUT; amino tiyol) çözeltisine daldırılmış ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında, bağlanmamış tiyolleri uzaklaştırmak için elektrotlar etanol ile yıkanmıştır.

3.7.2. PARK-7 (DJ-1) nöro-biyosensörünün dizayn stratejisi

Nöro-biyosensörün dizayn stratejisi içerisinde, altın nanopartikül katkılı, 11-AUT modifiyeli ITO temelli elektrotlar yüzeyinde çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT) kovalent bağlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Karbon nanotüp immobilizasyonundan önce, MWCNT-COOH materyali 0,1 mol / L SDS çözeltisi içinde disperse edilmiştir (30 dakika sonikasyon ile) (**Zhao, Ren ve ark. 2015**). Daha sonra çok Duvarlı Karbon Nanotüpler (MWCNT-COOH), yapılarında bulunan terminal karboksilik grupları aktif bir NHS esterine dönüştürmek için fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 1 mM NHS ve 4 mM EDC çözeltisi ile 45 dakika aktive edilmiş ve akabinde amino-tiyol ile fonksiyonel hale getirilmiş altın nanopartikül katkılı ITO elektrotlar ile 2 saat inkübasyona bırakılmıştır (**Bourigua, Hnaïen ve ark. 2010**).

EDC/NHS ile aktive edilen elektrotlar, ultra saf suyla yıkanıp ultra saf argon gazıyla kurutulmuş ve akabinde 100 µL anti-PARK-7 içeren çözeltilere daldırılıp karanlık ortamda oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Anti-PARK-7 antikoruna ile inkübasyondan sonra elektrotlar bağlanmamış antikor moleküllerini uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkanmış ve ardından argon gazı ile kurutulmuştur. Son olarak anti-PARK-7'nin immobilize edildiği MWCNT-GNP katkılı, 11-AUT modifiyeli elektrotlar, reaktif olmayan uçları bloklamak ve non-spesifik etkileşimleri önlemek amacıyla %0,5 BSA çözeltisinde 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu son adımla birlikte, hazırlanan nöro -biyosensör, PARK-7 ölçümleri gerçekleştirilene dek + 4 ° C'de muhafaza edilmiştir. Temiz ve modifiye edilmiş ITO yüzeyler: ITO, ITO-OH, ITO-OH/AuNP ITO/OH/ AuNP /11-AUT, ITO/OH/ AuNP /11-AUT/MWCNT, ITO/OH/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK-7, ITO/OH/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK-7/BSA, ITO/OH/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK-7/BSA/PARK-7 şeklinde ifadelendirilmiştir. Biyosensörün dizayn stratejisi Şekil 3.7 şematize edilmiştir.



Şekil 3. 7. Nöro-biyosensör tasarımının şematik gösterimi

3.7.3. Elektrokimyasal ölçümler

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün immobilizasyon adımları, optimizasyon testleri ve analitik özellikleri başlık 3.3.3.'de anlatıldığı şekliyle EIS, CV ve SWV teknikleriyle analizlenmiştir.

3.7.4. PARK-7'nin ölçüm prensibi

MWCNT-AuNP katkılı, 11-AUT modifiyeli ITO bazlı elektrotların her biri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart PARK-7 çözeltileri ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, nöro-biyosensör, fiziksel olarak adsorbe olmuş PARK-7 moleküllerini uzaklaştırmak için yavaşça ultra saf suyla yıkanmıştır. Her bir PARK-7 konsantrasyonunun elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ölçümleri, çalışma elektrotlarını redoks probunda ölçümlemek suretiyle gerçekleştirilmiştir. EIS ve CV ölçümleri EChem Analyst yazılım programı ile kaydedilmiştir.

3.7.5. PARK-7 Nöro-biyosensörünün Optimizasyon Çalışmaları

3.7.5.1. 11-AUT konsantrasyon optimizasyonu

11-aminoundekanetiol ile hazırlanan SAM tabakasının nöro-biyosensörün yanıtına etkisi, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 11-AUT ile belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar: 1, 5, 10, 50 mM'dır (saf etanol içerisinde). Daha sonra elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp ardından ultra saf argon gazı ile kurutularak başlık 3.7.2'de anlatılan stratejiyle dizayn edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardan elde edilen EIS ve CV değerleri kaydedilmiştir.

3.7.5.2. Optimum MWCNT konsantrasyonunun belirlenmesi

Çok duvarlı karbon nanotüpün, anti-PARK-7 immobilizasyonuna etkisini araştırmak ve optimal konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, dizayn edilen nöro-biyosensör sistemi farklı konsantrasyonlarda MWCNT dispersiyon çözeltileri ile hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar; 0,085; 0,17 ve 0,255 mg/mL'dir (SDS çözeltisi içerisinde). Daha sonra elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp ardından ultra saf argon gazı ile kurutularak başlık 3.7.2'de anlatılan stratejiyle dizayn edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardan elde edilen EIS ve CV değerleri kaydedilmiştir.

3.7.5.3. anti-PARK-7 (DJ-1) konsantrasyon optimizasyonu

Anti-PARK-7 konsantrasyonunun tasarlanmış nöro-biyosensör sistemi yanıtı üzerindeki etkisi farklı konsantrasyonlarda anti-PARK-7 ile hazırlanmış biyosensör sistemlerinin farklı konsantrasyonlardaki PARK-7 çözeltilerinin ölçümlerinin

değerlendirilmesiyle tespit edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan 1, 5, 20, ve 100 ng/mL anti-PARK-7 çözeltileri oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra başlık 3.7.4’de anlatıldığı üzere PARK-7 ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen EIS ve CV verileri ışığında optimum anti-PARK-7 konsantrasyonuna karar verilmiş ve ileri ki çalışmalara bu konsantrasyonla devam edilmiştir.

3.7.6. PARK-7 nöro-biyosensörünün analitik performansı

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum çalışma şartları belirlendikten sonra, nöro-biyosensöre ait bazı analitik karakteristikler aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu özellikler aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

3.3.6.1. PARK-7 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tasarlanan biyosensörün analitik özellikleri, optimum koşullar altında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart PARK-7 çözeltilerinin EIS ölçümleri yardımıyla belirlenmiştir. Biyobelirteç konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki başlık 3.3.6.1’de anlatılan ve açıklaması yapılan “eşdeğer devre modeli” ile belirlenmiştir.

Başlık 3.3.6.1.’de bahsedilen bilgiler ışığında, PARK-7 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{PARK-7}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (3.5)$$

burada $R_{ct}(\text{PARK-7})$, anti- PARK-7 ve PARK-7 arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. $R_{ct}(\text{BSA})$, BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarım daire çapının değeridir.

Analitin (PARK-7) ‘nin değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak optimize nöro-biyosensörün verdiği yanıt kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmiştir.

3.7.6.2. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirlik performansı optimum şartlar altında hazırlanan 15 bağımsız ITO elektrodun aynı PARK-7 konsantrasyonu (470 fg/mL) ile muamele edilmesiyle ve akabinde EIS ve CV verilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesiyle belirlenmiştir.

3.7.6.3. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirlik çalışmaları

ITO esaslı PARK-7 biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle fakat farklı zamanlarda hazırlanan 6 nöro- biyosensör sisteminin belirli konsantrasyon aralığındaki PARK-7 cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir.

3.7.6.4. PARK-7 nöro-biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları (tekrar-kullanılabilirlik)

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, PARK-7 antikor-antijen immüno-kompleksini ayıştırmak için, AuNP-MWCNT katkılı, 11-AUT modifiyeli ITO elektrotların 3 dakika boyunca 5 mM HCl içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar daha sonrasında ultra saf suyla iyice yıkanıp, argon gazı altında nazikçe kurutulmuştur. İmmunokompleksin ayrışması EIS ile takip edilmiştir. Yüzeyden antijeni iyonik kuvvet yoluyla kopartılmış olan elektrotlar PARK-7'nin aynı konsantrasyonu (470 fg/mL) tekrar muamele edilmiş ve akabinde EIS ölçümü alınmıştır. Tekrar eden bu proses süresince yüzeyin tamamen denatüre olduğu ve biyosensörün çalışma aktivitesini kritik anlamda kaybettiği nokta belirlene dek, biyosensörün rejenerasyon çözeltisiyle muamele edilmesine devam edilmiştir.

3.7.6.5. Sabit frekansta impedans analizi

Antikor / antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi için etkili elektrokimyasal yöntemlerden biri sabit frekanslı impedans analizidir.

Bu amaçla, potansiyostat, Bode eğrilerinin yardımıyla tanımlanan sabit bir frekansa (5 Hz) ayarlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi non-faradaik prosedürle; PARK-7 içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisine daldırılmış ve belirlenen frekansta impedimetrik ölçüm

alınmıştır. Zamana bağlı olarak impedimetrik değerde ve faz açısında meydana gelen değişim, antikor-antijen bağlanmasının kinetiksel değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.7.6.6. PARK-7 nörobiyosensörünün seçicilik çalışmaları

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün başka proteinlere karşı oluşabilecek afinitesi başlık 3.3.6.7. 'de anlatılan teknikle araştırılmıştır. Seçicilik araştırması yapılırken kullanılan proteinler; aynı konsantrasyon aralığında Tau-441, synuclein alfa ve HSP-70'dir.

3.7.6.7. PARK-7 nöro-biyosensörünün depo ömrü

Geliştirilen AuNP-MWCNT katkılı 11-AUT modifiyeli ITO tabanlı tek kullanımlık biyosensörün depo ömrü belirli zamanların sonunda nöro-biyosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan nöro-biyosensörler +4°C'de muhafaza edilmiş ve 7 günlük periyotta sabit konsantrasyonda PARK-7'nin (470 fg/mL) EIS ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk gün edilen değer temel alınarak, biyosensörün aktivitesindeki zaman içerisindeki kayıp grafiksel olarak gösterilmiştir.

3.7.6.8. PARK-7 nöro-biyosensörünün klinik örneklerde uygulanabilirliğinin araştırılması

Üretilen nöro-biyosensörün fizibilite ve analitik güvenilirliğini değerlendirmek için insan serebrospinal (beyin omurilik-BOS) sıvısı ve tükürük sıvısındaki PARK-7 miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Standart ekleme için kullanılan PARK-7 konsantrasyonları 235 fg / mL ve 3500 fg / mL'dir. Her bir BOS ve tükürük örneği için ölçümler 3 kere tekrarlanmıştır. BOS örnekleri Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2013/86/07/05 araştırma etik kurul onayı ile rastgele seçilerek toplanmıştır. BOS örnekleri ölçümler gerçekleştirilene dek belirli porsiyonlar halinde -20° C'de; tükürük örnekleri +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.6.9. Taramalı elektron mikroskobu

Biyosensör geliştirilirken yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler başlık 3.3.6.10'da anlatıldığı gibi SEM ile takip edilmiştir.

3.7.6.10. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Biyosensör geliştirilirken oluşan bağlar FTIR ile başlık 3.3.6.11’de anlatıldığı gibi değerlendirilmiştir.

3.7.6.11. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)

AFM yüzey topografisini angstrom seviyesinden 100 microns kadar ölçebilen bir metoddur. Çok duyarlı cantilever yüzeyi taramasıyla Atomik seviyedeki kuvvetleri (nN)ölçebilir. Geliştirilen nöro-biyosensörün yüzey topografisindeki değişimler AFM ile değerlendirilmiştir. AFM analizi, AFM PLUS +, NanoMagnetic Instruments kullanılarak NKÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (NABİLTEM) yapılmıştır Görüntüler AFM'nin tapping modu kullanılarak elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. CRP (1) Tayinine Yönelik Geliştirilen Nöro-Biyosensör

4.1.1. Nörobiyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı

CRP tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün ilk adımı, ITO kaplı PET elektrotların temizlenmesidir. Elektrotların temizliği (yalın elektrot) EIS ve CV adımları ile takip edilmiştir. Elektrotların yüzeylerinde 3-siyanopropiltrimetoksisilan (3-CPTMS) modifiyeli kendiliğinden oluşan tek tabakaların (SAM) oluşturulabilmesi için substrat yüzeylerinde fonksiyonel –OH gruplarının olması gerekir. Başlık 3.3.1’de anlatıldığı üzere yüzeylerinde –OH grupları oluşturulan elektrotlar, CPTMS ile inkübe edilmiştir.

CPTMS bir fonksiyonel terminal gruba (-CN) 3 tane de hidrolizlebilir süstitüentlere (-metoksi) sahiptir. SAM oluşması sırasında, yapıdaki metoksi grupları silanol içeren türler oluşturmak üzere hidrolize olur. Silanlı bileşiğin SAM oluşturma reaksiyonları 4 adımı içerir: Başlangıç adımında üç değişken grubun hidrolizlenmesi gerçekleşir, akabinde –Si-O-Si bağlarının oligomeriyle neticelenen kondensasyon tepkimesi meydana gelir. Daha sonra oligomerler, yüzeydeki OH grupları ile hidrojen bağı yapar. Son olarak ise yapıdan su ayrılmasına eş zamanlı olarak yüzeye kovalent etkileşim gerçekleşir. Her ne kadar sırayla anlatılmış olsa da bu reaksiyonlar, hidroliz adımından sonra eş zamanlı gerçekleşmektedir **(Plueddemann 1978)**.

Yüzey modifikasyonu, silanlar substrat yüzeyi ile reaksiyona girdiğinde ve uygun yüzey enerjileri ile erişilebilen maksimum alanların sayısına ulaşıldığında en üst düzeye çıkar. Ara faz bölgesinin fiziksel ve kimyasal özellikleri de yüzey modifikasyonunda önem arz eden bir diğer husustur. Ara faz, su / hidroksil içeriği gibi kimyasal özelliklere bağlı olarak sistemin toplam özelliklerine katkıda bulunabilir veya bunları azaltabilir. Nemli havada ve taze hazırlanmamış hidroksiller, önemli ölçüde adsorbe edilmiş su içerirler ve bu durum da yüzeyde silan bağlantısına sekte vurabilir. Birbirine komşu silanol grupları, silanın yüzeye bağlanması konusunda daha kolay reaksiyon verirken, izole ya da serbest hidroksiller isteksizce reaksiyon verebilmektedir **(Wang, Liechti ve ark. 2005)**. Bu durumu Stevens ve ark’ları yaptıkları çalışmayla şöyle açıklamışlardır; yüzey iyi bir şekilde hidroksillendiğinde,

her bir -OH grubu Si atomlarıyla reaksiyona girebilmekte ve çapraz bağlanmalara mahal vermeyen yoğun bir tek tabaka oluşabilmektedir. Fakat tersi bir durumda, silan türleri arasında, Si-O-Si bağları ile çapraz bağlanmaların oluşması ile silanların hidrokarbon zincirleri arasındaki sterik itmeler yoğun olarak paketlenmiş bir tek tabakanın oluşumunu engelleyecektir (Stevens 1999). Bu değerlendirmeler göz önüne alındığında, yüzeyde silanlar arasında bir çapraz bağlanmasının oluşmasını önlemenin en etkili yolu, hidroksil gruplarının maksimum sayıda oluşturulmasıdır. Dolayısıyla biyosensörün inşasında oldukça kritik olan bu adım, -hidroksil gruplarının her çalışmada taze hazırlanmasıyla aşılmıştır. Yüzeyde oluşturulan ve nemden uzak tutulan hidroksil grupları temelinde ilerleyen CPTMS SAM tabakası, anti-CRP'nin etkili immobilizasyonunda vazgeçilmez bir adım olmuştur.

Siyanopropil siloksanlar hem polar hem de polarize edilebilir özelliklere sahip olmalarından ötürü en kullanışlı organosilanlardır. Nitril nitrojen üzerindeki paylaşılmamış elektron çiftine sahip olan siyano grubu, biyo algılama birimi gibi p-elektronları taşıyan uygun hidrojen donörü moleküllerle moleküller arası hidrojen bağları oluşturabilmekte ve bu yapılara karşı yüksek afinite gösterebilmektedir (Marsden ve ark. 1979). Bu çalışmada, anti-CRP antikoru, siyano grubundaki paylaşılmamış elektron çiftiyle oluşturduğu bağ ile, yüzeye herhangi bir çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duyulmadan immobilize edilmiştir. CPTMSdeki terminal grup -CN- yapıya oldukça yüksek fonksiyonellik katmıştır. Buna ek olarak, CPTMS deki alkil zinciri Van der Waals etkileşimleri nedeniyle tek tabakanın stabilitesini ve akabinde anti-CRP'nin immobilizasyonu ile birlikte SAM'in regüle edilmesinde önemli bir role sahiptir. Stabil bir yapı elde edebilmek için elektrotlar CPTMS ile gece boyu inkübe edilmiş ve ertesi gün vakit kaybetmeden anti-CRP'nin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. CPTMS ile tek tabaka oluşturulan yüzeye anti-CRP'nin immobilizasyonunun ardından, reaktif türleri engellemek ve non-spesifik etkileşimleri önlemek adına elektrotlar BSA ile muamele edilmiştir. İnşa edilen biyosensörün adım adım oluşumu, EIS ve CV teknikleri ile izlenmiştir. K3 [Fe (CN) 6] / K4 [Fe (CN) 6], biyolojik element ve modifiye elektrot yüzeyi arasında bir elektrokimyasal aracı rolü gören, redoks reaksiyonunu gerçekleştiren bir redoks çiftidir.

Bir çok biyosensör cihaz, tek katmanlı veya ince bir filmdeki biyoalgıma materyali ile analit arasında bir tanıma kompleksinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. İletken veya yarı iletken yüzey üzerindeki biyosensör malzemenin adım adım büyümesi, yüzey elektrolit arayüzünde kapasitans ve direnç özelliklerinin değişmesine neden olur. Tüm bu değişiklikler elektrokimyasal impedans spektroskopisi sonuçlarına etkili bir şekilde yansımaktadır. Bu

nedenle, EIS yüzeysel değişiklikleri anlamak ve yüzeydeki biyoalgıma elemanına ait olaylar hakkında ayrıntılı bilgi almak amacıyla kullanılabilen güçlü bir yöntemdir.

Nöro-biyosensörün inşasına ait adımların EIS'dan alınan impedans spektralleri ve CV'den voltamogramları Şekil 4.1' de gösterilmiştir.

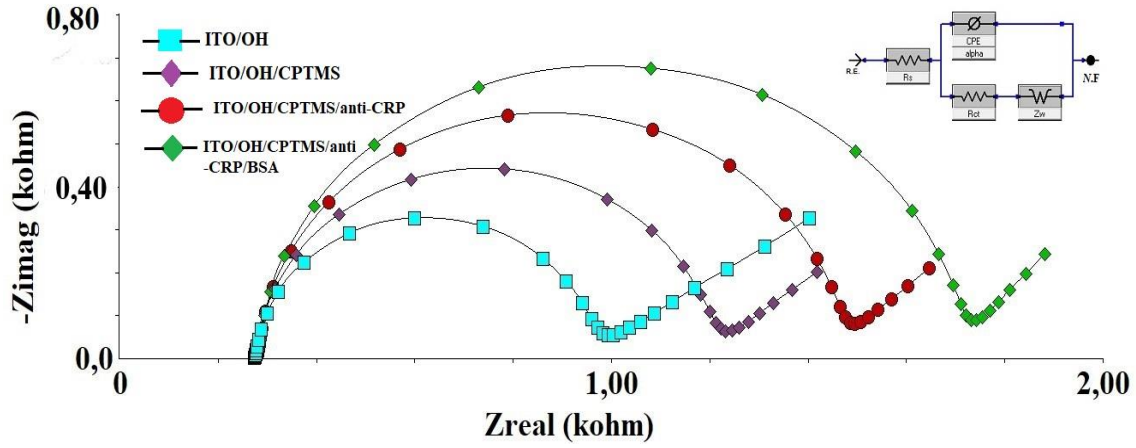
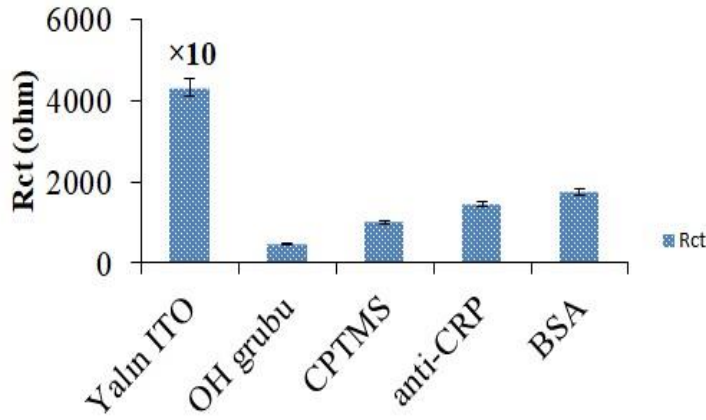
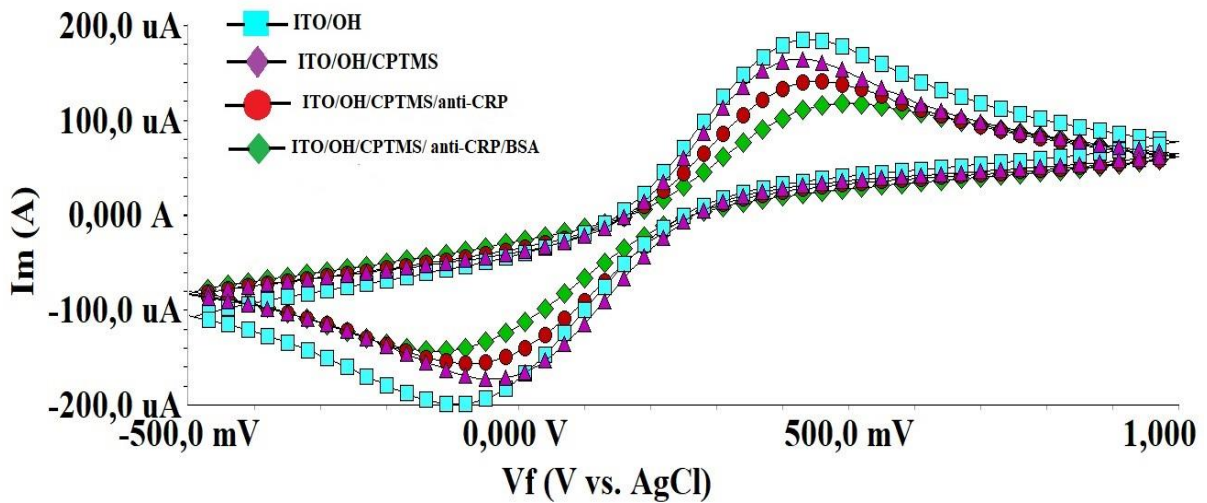
CRP tayinine yönelik bu nöro-biyosensör çalışmasında sensörün her bir aşamasının impedans ölçümleri, 0,05 -50.000 Hz frekans aralığında, pH 7,0 fosfat tamponuyla hazırlanmış 5 mM $K_4Fe(CN)_6 / K_3Fe(CN)_6$ (1: 1 oranında) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu spektrumlar, bir eşdeğer devreye (farklı frekanslarda direnç ve kapasitif süreçleri açıklayan EIS verilerini yorumlamada kullanışlı bir araç: bkz başlık 3.3.6.1.) monte edildiğinde teorik, yarı dairesel formun tipik özellikleri görülebilmektedir.

Nöro-biyosensörden ölçülen EIS verilerinin Nyquist grafikleri, Şekil 4.1.A'da gösterilmektedir. Verilerin eşdeğer devre modeli ile fitlenmesi, ara tabaka yük transfer direncinin (R_{ct}) her tabaka (Yalın elektrot, OH, CPTMS ile SAM, anti-CRP ve BSA) oluştuktan sonra değiştiğini Şekil 4.1.B' de göstermiştir.

Bir İmpedans spektrumundaki yarı daire çapı, elektron transfer direncini (R_{ct}) gösterir;. Elektrot-çözelti ara yüzündeki redoks probunun elektron transfer kinetiği elektron transfer direnci ile kontrol edilir. Şekil 4.1.B' de görüldüğü gibi temizlenmiş yalın elektrotun yük transfer direnci oldukça yüksektir (43130 Ω). İmpedans spektrumlarından görüldüğü gibi, ITO yüzeyindeki -OH gruplarının oluşumu, yük aktarma transferinde bir azalma ile kendini gösterir. Ek elektroda daha iletken bir davranış kazandırmıştır. CPTMS ile SAM oluşturulmasından sonra, pH 7,0'da negatif yüklü siyanür grupları, negatif redoks probunu iterek yüzeye kolayca difüze olmasına izin vermemiştir, bu durum impedans spektrumlarına yarı dairesel çapta önemli bir artış olarak yansımıştır.

Bir sonraki aşamada, anti-CRP, siyano grubu ve anti-CRP amino grubu arasındaki reaksiyon ile kimyasal kovalent bağlanma yoluyla modifiye edilmiş yüzey üzerinde immobilize edilmiştir, oluşan organik yapı muhtemel bir ikincil ketimindir ve immobilizasyon adımı yük transfer direncinde belirgin bir artış olarak EIS spektrumuna yansımıştır. (Şekil 4.1.A-B). Bu belirgin artış, tabakanın anti-CRP ile başarılı bir şekilde modifiye edildiği ve

ITO yüzeyinde bir yalıtkan protein tabakasının oluşmasına bağlı olarak redoks probunun difüzyonuna kısmen izin verdiğinin bir göstergesidir. Buna ek olarak, elde edilen EIS verisinden CPTMS ile oluşturulmuş mono katmanın yüzeyde iyi tanımlanan paketlenmiş ve yoğunluğa sahip bir tabakanın oluşmasını sağladığı ve anti-CRP ile moleküler ölçekte etkileşim kurduğu görülmüştür. Son adımda ise, aktif uçların ve non spesifik bağlantıların önüne geçilmesine adına yapılan BSA bloklaması yüzeyde ekstra bir bariyerin oluşmasına sebep olmuştur. Yüzeye bağlanan analitin yüzeyin kapasitans ve direncini artırarak, artan bir impedans sergilemesi, nöro-biyosensörün başarılı bir şekilde üretildiğinin göstergesidir.

A**B****C**

Şekil 4. 1. CRP nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) EIS spektrumu, (B) her adıma ait RCT değerleri (C) döngüsel voltamogramlar

Anti-CRP temelli nöro-biyosensörün elektrokimyasal davranışını araştırmak için döngüsel voltametriden de yararlanılmıştır. Döngüsel voltametri çalışmalarında, elektrokimyasal hücre sisteminin elektrot akım yoğunluğuna karşı potansiyel gözlemlenmektedir. Analit, elektrot yüzeyinde kaplanmış veya immobilize olmuş biyolojik bileşen ile reaksiyona girdiğinde, potansiyel dizisine karşı elektrik akımında bir değişim meydana gelir. Bu güncel değişiklik bize, biyosensör elektrodunun analit ve biyolojik bileşeni arasındaki reaksiyonu sırasında elektrokimyasal hücrede bir elektron transferi olduğunu söyler.

Şekil 4.1.A ve 4.1.C incelendiğinde CRP tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün fabrikasyon adımlarının impedans spektrumları ve döngüsel voltamogram sonuçları birbiriyle uyumludur. CPTMS'deki negatif yüklü siyanür grupları ile negatif yüklü redoks prob arasındaki elektrostatik itme kuvveti, ITO yüzeyinde CPTMS mono katmanının oluşturulmasından sonra katodik ve anodik pik akımlarında meydana gelen azalmanın sebebidir. Şekil 4.1.C' de görüldüğü gibi, anti-CRP'nin CPTMS modifiye edilmiş ITO yüzeyine kovalent immobilizasyonu sonrasında, immobilize yüzeyin redoks probu ve elektrot yüzeyi arasındaki bariyer etkisi nedeniyle hem anodik hem katodik piklerde bir azalma olmuştur.

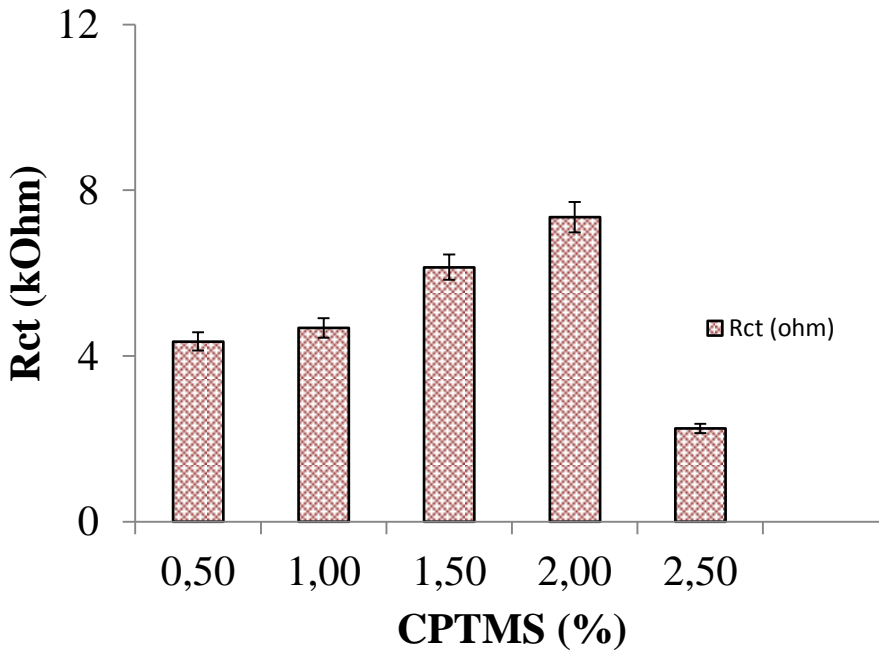
4.1.2. CRP (1) nöro-biyosensörünün optimizasyon parametreleri

4.1.2.1. CPTMS'nin optimum konsantrasyonu

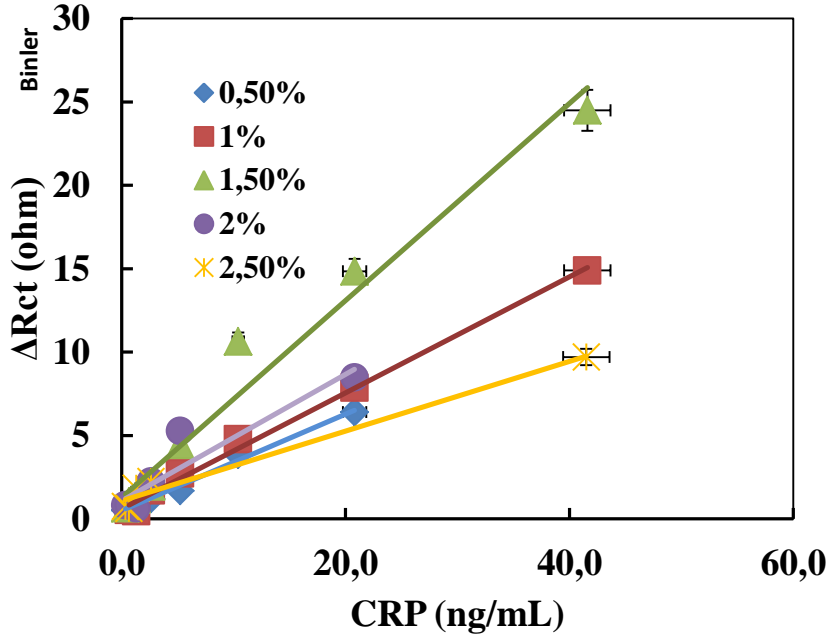
Antijenler ve antikorlar çoğunlukla yüklü protein yapıları olduğundan, birbirlerine olan afiniteleri, elektrot yüzeyindeki formasyon ve yükten etkilenir. Bu nedenle, en uygun koşulları belirleyerek biyo-afinite kompleks oluşumunun kapasitans varyasyonlarını anlamak mümkündür.

Yüzeyde kendiliğinden oluşan tek tabakalı ajanların konsantrasyonu, biyoalgılama elemanının bağlanmasını önemli ölçüde etkileyebileceğinden, nöro-biyosensör optimizasyonunda ilk adım, SAM konsantrasyonunu aydınlatmaktır. Ayrıca, 3-siyanopropiltrimetoksisilan ilk kez kullanılan çok yeni bir silanizasyon ajanı olduğundan, tek tabakalı elektrotların cevabı EIS ve CV ile dikkatle izlenmiştir.

Bu amaçla, hidroksilenmiş ITO elektrotlar oda sıcaklığında gece boyunca farklı konsantrasyonlarda CPTMS (% 0,5, % 1, % 1,5 % 2, % 2,5) ile inkübe edilmiştir. Yüzeydeki tabakanın istiflenmesi konsantrasyondan fazlaca etkilendiğinden, farklı CPTMS konsantrasyonları farklı impedimetrik davranışlar sergilemiştir. Farklı CPTMS konsantrasyonlarına ait yük transfer direnci değerleri Şekil 4.2' de gösterilmiştir. CPTMS konsantrasyonları farklılandırılıp diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki CRP konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir. Şekil 4.3' de görüldüğü gibi, % 1,5'lik CPTMS ile hazırlanan nöro-biyosensör sistemi nispeten yüksek bir yük transfer direncine ve regresyon eğrisi üzerinde düşük bir belirleme katsayısına ($R^2: 0,9685$) sahipken, % 2,5 CPTMS ile hazırlanan biyosensör düşük yük transfer direnci ve nispeten yüksek bir belirleme katsayısına ($R^2: 0,9803$) sahiptir. Bununla birlikte, % 1 ($R^2: 0,9903$) ve % 0,5'lik ($R^2: 0,9898$) CPTMS sonuçları, yüksek yük transfer direncine ve yüksek belirleme katsayısı sahiptir ve sonuçlar birbirine yakındır.



Şekil 4. 2. Farklı CPTMS konsantrasyonlarına ait yük transfer direnci



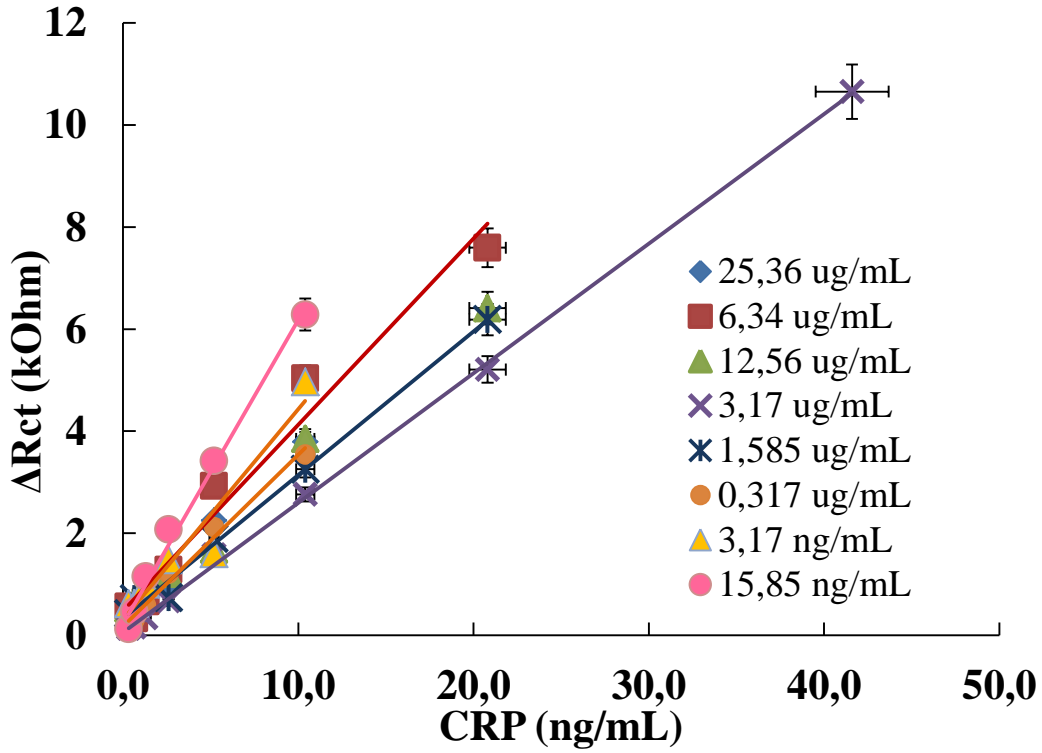
Şekil 4. 3. Farklı CPTMS konsantrasyonlarıyla hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, CPTMS konsantrasyonu arttıkça, anti-CRP'nin immobilizasyonunda düzensizlik meydana geldiği söylenebilir. Tasarlanan nöro-biyosensörün optimal immünolojik tanıma için ihtiyaç duyduğu CPTMS-SAM formasyon konsantrasyonu % 0,5 CPTMS olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. Anti-CRP'nin optimum konsantrasyonu

Nöro-biyosensörün biyo-algılama birimi olan anti-CRP'nin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi şüphesiz başarılı bir immobilizasyon adımı ve akabinde CRP ölçümü için elzemdir.

Antikor konsantrasyonu geniş bir aralıkta (3,17; 15,85 ng mL⁻¹, 0,317; 1,585; 3,17, 6,34, 12,56, 25,34 ug mL⁻¹) nöro-biyosensör cevabını optimize etmek için analiz edilmiştir. Anti-CRP konsantrasyonları farklılandırılıp diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki CRP konsantrasyonlarının değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.4).



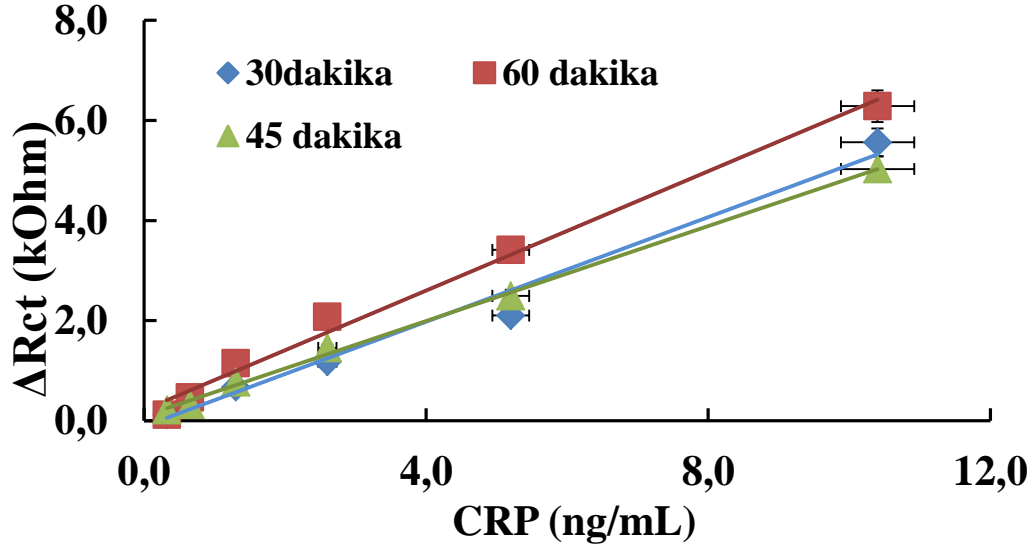
Şekil 4. 4. Farklı anti-CRP konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri

Şekil incelendiğinde yüksek antikor konsantrasyonlarında ($25,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-CRP $y = 359,24 R^2 = 0,978$ için), muhtemelen yüksek sterik bariyere ve protein-protein etkileşimlerinin inhibe edici etkisine bağlı olarak nöro-biyosensörün CRP'nin tanınması yönündeki duyarlılığında bir azalma gözlenmiştir. Anti-CRP çözeltisi $3,17 \text{ ng.mL}^{-1}$ kullanıldığında ise yine sensörün duyarlılıktaki bir azalma fark edilmiştir ki bu durumu kullanılan konsantrasyonunun CRP'nin anti-CRP immobilize yüzey üzerine etkili bir şekilde bağlanması için yeterli olmadığı yönünde açıklamak mümkündür. Tüm bu değerlendirmeler ışığında, $15,85 \text{ ng mL}^{-1}$ anti-CRP çözeltisi, ileri deneyler için optimize edilmiştir.

4.1.2.3. Anti-CRP'nin optimum immobilizasyon süresi

Hassas bir nöro-biyosensör için bir başka önemli parametre, antijen-antikor biyo-afinite komplekslerinin oluşumu için gerekli olan inkübasyon süresinin belirlenmesidir.

CPTMS ile modifiye edilmiş ITO temelli elektrotlar 30, 45 ve 60 dakikalık farklı periyotlar için anti-CRP çözeltileri içinde inkübe edilmiştir. Anti-CRP inkübasyon süreleri farklılıklarla diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki CRP konsantrasyonlarının değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4. 5. Farklı anti-CRP inkübasyon süreleriyle hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafiği

Nöro-biyosensörün cevabı, 30 ila 60 dakika arasında artan inkübasyon süresi ile hafifçe artmıştır. Bu sonuç, immüno kompleksinin oluşumu için 60 dakikalık anti-CRP inkübasyon süresinin gerekli olmadığını gösterirken, 30 dakika inkübasyon süresi, hassas immünosensör yanıtı elde etmek için yeterlidir. Literatürdeki pek çok çalışmanın da belirttiği antijen-antikor bağlanması 15-60 dakika içinde etkili bir şekilde tamamlanmaktadır (Goldblatt 2001; Reverberi ve Reverberi 2007). Bu adımda elde ettiğimiz sonuç, bu bilgiyle de örtüşmektedir.

4.1.3. CRP (1) nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri

4.1.3.1. CRP'nin geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi

Optimum koşulları belirlenen nöro-biyosensör sistemiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart CRP çözeltileri EIS ve CV teknikleriyle ölçümlenmiştir. CRP konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki, Şekil 4.1.A 'ya eklenen eşdeğer devre modeli ile belirlenmiştir.

CRP nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{CRP}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (4.1)$$

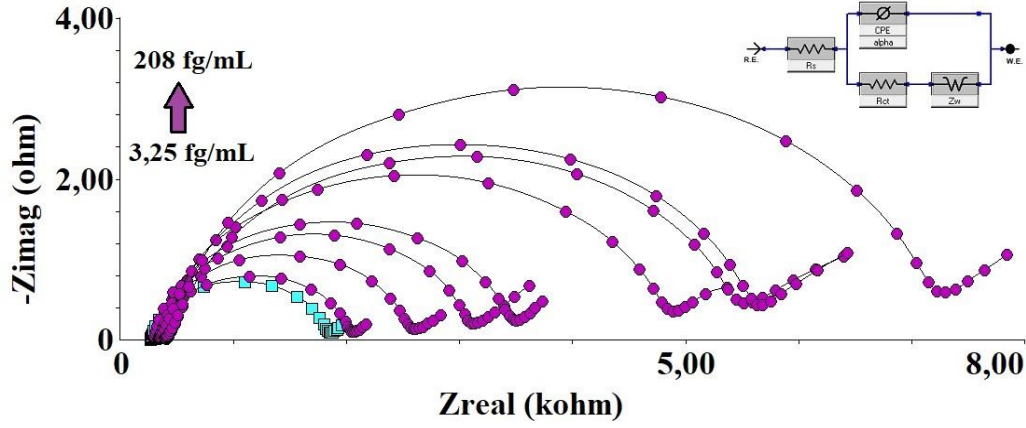
burada R_{ct} (CRP), anti-CRP ve CRP arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. R_{ct} (BSA), BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarım daire çapının değeridir.

Geliştirilen tek kullanımlık nöro-biyosensörünün artan konsantrasyonlarındaki CRP ile inkübe edilmesinden elde edilen Nyquist grafikleri ve döngüsel voltammogramları, Şekil 4.5.A-B 'de sunulmaktadır. Nöro-biyosensör uygulaması sadece analit tespitini değil aynı zamanda geniş bir çalışma aralığı boyunca analit konsantrasyonlarının ölçümünü gerektirdiğinden iyi bir ayırma duyarlılığı gereklidir. Lineerlik ile ilişkili bir başka terim, biyosensör cevabının konsantrasyon ile doğrusal olarak değiştiği analit konsantrasyonlarının aralığı olarak tanımlanan doğrusal aralıktır (**Bhalla ve ark. 2016**).

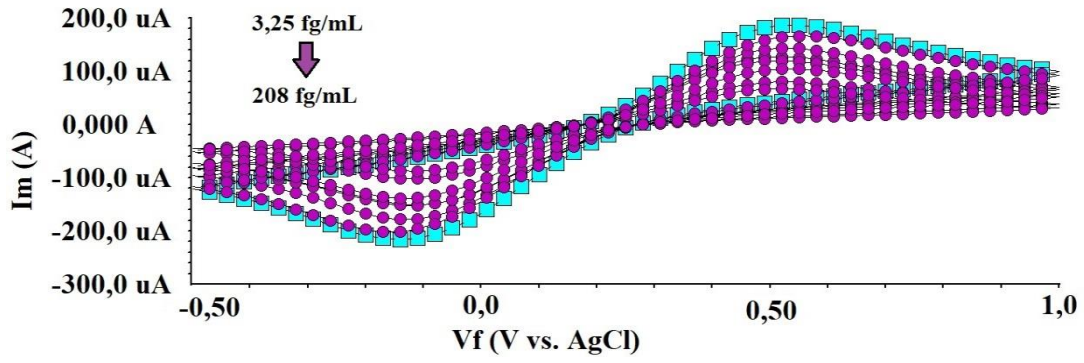
CRP konsantrasyonu arttıkça, Nyquist grafikleri üzerinde yarım daire çapındaki doğrusal bir artış gözlenmiştir. R_{ct} 'deki artış, elektrot yüzeyinin iletkenlik özelliklerinde azalmaya neden olan bir immüno-kompleks üretimine bağlı olabilir. Benzer şekilde, Şekil 4.5.B, CV tepe akımlarının artan CRP konsantrasyonları ile azaldığını göstermiştir. Bunun nedeni, yüzeydeki CRP konsantrasyonunun artmasıyla immüno-kompleksin büyümesinin, elektron transfer bariyerini önemli ölçüde arttırmasıdır. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.5.C) 3.25-208 fg mL⁻¹ aralığında lineer bir korelasyon göstermiştir. LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri IUPAC önerilerine göre (**McNaught 1997**) sırasıyla 0,455

fg mL⁻¹ ve 1,517 fg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen biyosensörün CRP analizinde yüksek duyarlılık gösterdiğini vurgulamaktadır.

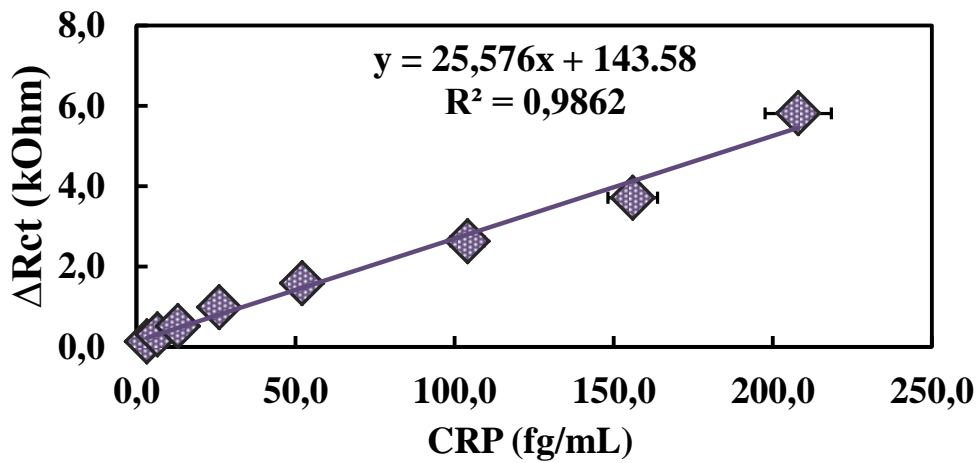
A



B



C



Şekil 4. 6. Optimum koşullarda hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda CRP' ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Kramers Kronig dönüşümleri (K.K.T.), geliştirilen biyosensörün doğrusal, kararlı ve nedensel devre spektrumunu hesaplamakta kullanılır. K.K.T. biyosensörün tasarım adımlarına ait verilerin gerçek ve hayali kısımları için göreceli hataların ($\Delta Z / Z$) bir grafiğini göstermektedir. Hesaplamalar Boukamp yöntemini (**Boukamp 1995**) takip edilerek yapılmıştır. Deneysel verilerin gerçek kısmı, Doğrusal, Kararlı ve Nedensel devrenin hayali kısmını hesaplamak için kullanılır. Benzer şekilde, deneysel verilerin hayali kısmı, Doğrusal, Kararlı ve Nedensel devrenin gerçek kısmını hesaplamak için kullanılır. K.K.T, Bode ve Nyquist grafiklerinde gösterilebilmektedir ve K.K.T. ile deneysel veriler uyuşmazsa, o zaman örnek doğrusal olmayan, istikrarsız ya da bilinmeyen değişkenlerin etkisi altındadır yorumu yapılmaktadır (**Agarwal ve ark. 1992**). Çizelge 4.1’ de CRP tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tasarım adımlarına ait K.K.T değerlerini göstermektedir.

Çizelge 4. 1. Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

Nöro-biyosensör adımı	Kramers Kronig Transform değeri (μ)
Yalın ITO	179,8
ITO/OH	50,02
ITO/OH/CPTMS	0,9981
ITO/OH/CPTMS/anti-CRP	9,304
ITO/OH/CPTMS/anti-CRP/BSA	11,22

K-K dönüşümünün en büyük handikapı, sıfırdan sonsuza kadar bir frekans aralığında entegrasyon gerektirmesidir. Bu aralıktaki spektral verileri hiç kimse ölçemediğinden, K-K ilişkilerini entegrasyon yoluyla değerlendirmek, her zaman ölçülmekte olan frekansın dışındaki bir spektrumun davranışı hakkında varsayımları içermektedir.

4.3.1.2. Nöro-biyosensörün tekrarlanabilirliği

Geliştirilen nöro-biyosensörün belirlenen optimum şartlar altında, belirli bir CRP konsantrasyonunu aynı doğrulukta ölçme kabiliyeti tekrarlanabilirlik olarak tanımlanabilmektedir. Bu çalışmada optimum şartlar altında hazırlanan 20 tane ITO tek kullanımlık elektrotların her biri, 52 fg/mL CRP standart çözeltisiyle muamele edilmiştir. Tekrarlanabilirlik deneyleri için korelasyon katsayısı, ortalama değer ve relatif standart sapma sırasıyla % 6, 64, 58,23 fg/mL ve %3,88 olarak hesaplanmıştır.

4.3.1.3. Nöro-biyosensörün tekrar üretilebilirliği

Tekrar-üretilebilirlik biyosensörün çoğaltılmış deney düzeneği için aynı yanıtları üretilme kabiliyetidir. Tekrar üretilebilirlik, geliştirilen nöro-biyosensördeki transdüserin ve elektroniklerin hassasiyeti ve doğruluğunu karakterize etmek için kullanılan önemli bir parametredir.

Kesinlik, sensörün bir örneğin her ölçülmesinde benzer sonuçlar verebilmesi iken doğruluk, bir numunenin bir kereden fazla ölçülmesi durumunda sensörün gerçek değere yakın bir ortalama değer sağlama kapasitesini gösterir (**Bhalla ve ark. 2016**).

ITO temelli CRP nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle farklı zamanlarda hazırlanan 10 biyosensör sisteminin 3,25-208 fg / mL tayin aralığındaki cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda 10 nöro-biyosensörün yanıtlarının CRP için 3,25-208 fg mL⁻¹ arasındaki benzer doğrusallığı gösterdiği bulunmuştur. Çizelge 4.2' de tekrar üretilebilirliğe ait eğimlerin ve interseptlerin relatif standart sapmaları sırasıyla %3,39 ve %2,21 olarak bulunmuştur. Tekrarüretilebilir sinyaller, nöro-biyosensörün yanıtı üzerine yapılan çıkarımda yüksek güvenilirlik ve sağlamlık değerlendirilmesinin yapılmasını sağlamaktadır.

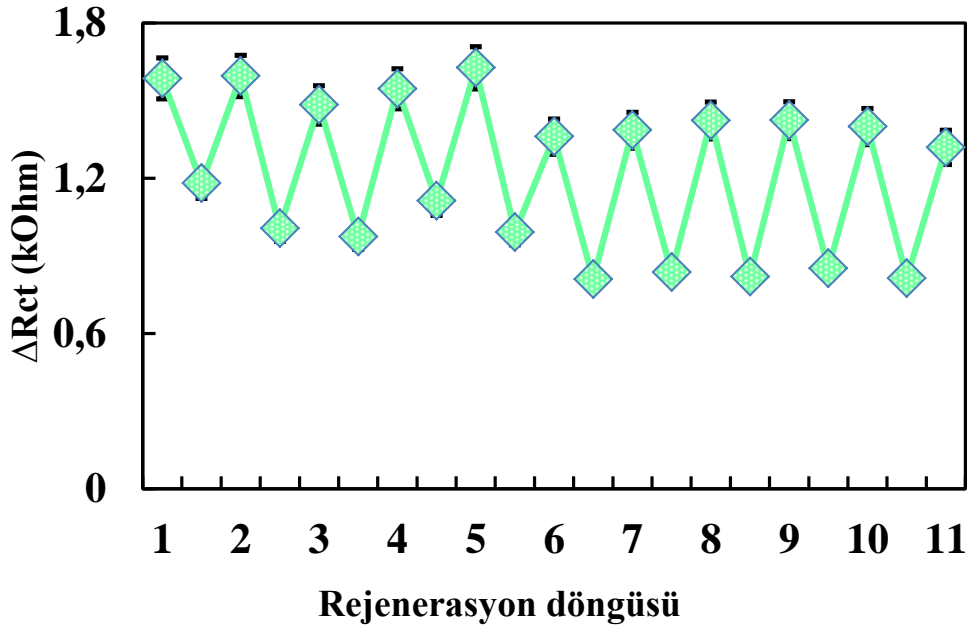
4.1.3.4. CRP nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi (tekrar-kullanılabilirlik)

CRP tayinine yönelik tasarlanan nöro-biyosensör sisteminin rejenerasyon karakteristiğini belirlemek adına yapılan denemelerde, nöro-biyosensörün, 11 rejenerasyon döngüsünden sonra orijinal yanıtının % 91,4' ünü koruduğu görülmüştür. (Şekil 4.7).

Yapılan birçok çalışmada, sisteme yüksek veya düşük pH'ların uygulanmasıyla rejenerasyon sağladığı görülmektedir. pH'taki değişiklik, -10 mM HCL ile muamele- analit (CRP) ve biyoreseptör (anti-CRP) arasındaki nispi yükleri değiştirerek sistemin entalpi durumunu etkiler. Yan gruplar iyonlaştıkça, biyoreseptörün tersiyer yapısını koruyan yük dağılımları da değişir. Bu denatürasyon, analitin biyoreseptörden ayrılmasına yardımcı olur. Geliştirilen biyosensör sisteminin 11 rejenerasyon döngüsü sonundaki aktivitedeki azalışının sebebi rejenerasyon çözeltisi ile ard arda muamele edilen antikorun geri dönüşsüz denatürasyonu veya CPTMS tek tabakasının tahrip edilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4. 2. Nöro-biyosensörün tekrar üretilebilirliğine ait doğru denklemleri

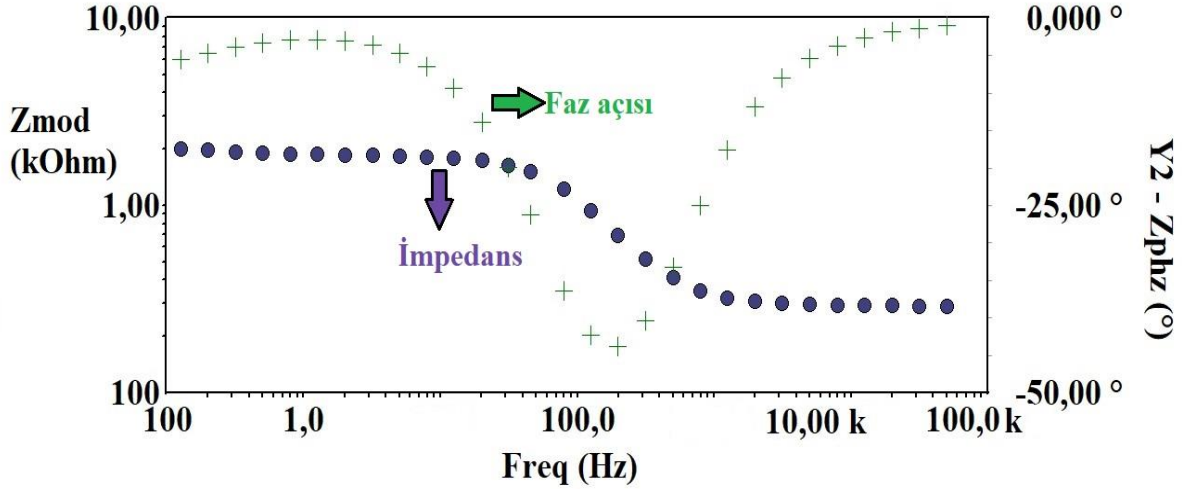
Biyosensör numarası	y	R ²	Lineer aralık (fg/mL)
Biyosensörün tekrar üretilebilirliği			
1	20602x + 451,06	0,9741	3,25 - 208
2	20898x + 349,05	0,9872	3,25 - 208
3	23211x + 298,64	0,9839	3,25 - 208
4	20769x + 346,81	0,9864	3,25 - 208
5	20489x + 334,51	0,9851	3,25 - 208
6	20646x + 333,44	0,9794	3,25 - 208
7	22992x + 264,45	0,9858	3,25 - 208
8	23262x + 335,44	0,9873	3,25 - 208
9	19711x + 521,77	0,9902	3,25 - 208
10	22927x + 261,52	0,9892	3,25 - 208



Şekil 4. 7. Nöro-biyosensör sisteminin rejenerasyon kapasitesi

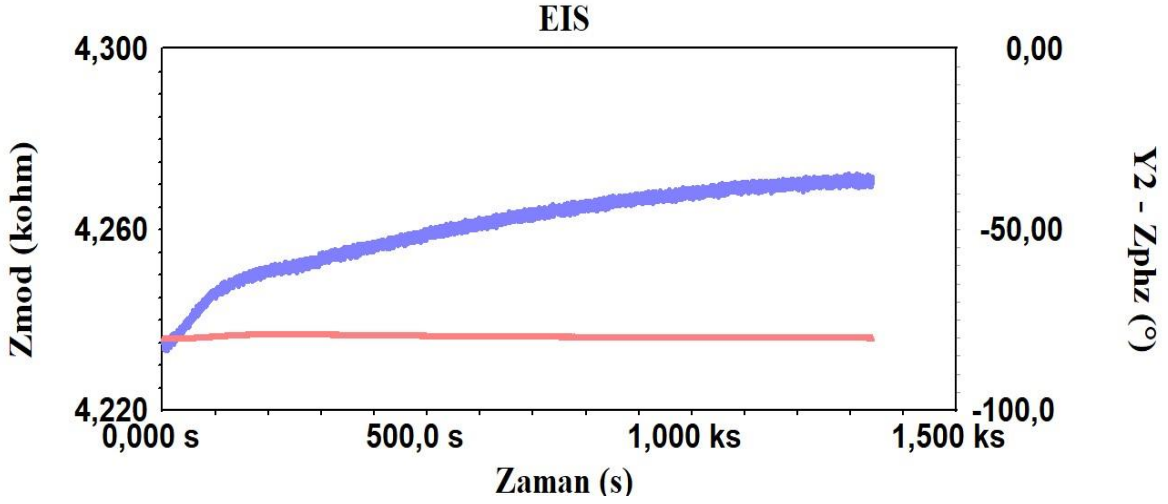
4.1.3.5. Sabit Frekansta impedans (SFI) analizi

Antikor / antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi için etkili elektrokimyasal yöntemlerden biri sabit frekanslı impedanstır. Bu yöntem, elektriksel yüzeydeki değişiklikleri anlamak adına oldukça kullanışlıdır. Bu amaçla, potentiostat, Bode plot yardımıyla tanımlanan sabit bir (45 Hz) frekansa ayarlanmıştır. Şekil 4.8 nörobiyosensörün BSA adımına ait bir Bode grafiğini göstermektedir.



Şekil 4. 8. Nöro-biyosensörün Bode grafiği

Bode eğrisinin Nyquist eğrisine göre bazı belirgin avantajları vardır. Frekans, eksenlerden biri olarak görüldüğünden, impedansın frekansa nasıl bağlı olduğunu anlamak kolaydır. Bode çiziminde aynı eksen eksenindeki geniş empedans aralıklarını kolaylıkla anlayabilmemiz için bir log eksen üzerindeki ($|Z|$) büyüklüğü de gösterilir. Bu, bir kapasitörde olduğu gibi, impedansın frekansa büyük ölçüde bağlı olduğu durumda avantaj olabilir. Bode çizim formatı aynı zamanda faz açısını da gösterir. Ara frekanslarda, impedansın hayali bileşeni (Z_{imag}) arttıkça q artar. Bode grafiği, elektrokimyasal sistemin frekansa bağlı davranışının, frekans değerleri açık olmaktan ziyade örtük olan Nyquist grafiğine göre daha belirgin bir tanımını sunmaktadır. Bode eğrisinin bu üstünlükleri SFI analizlerini değerlendirmemize olanak sağlamıştır. Şekil 4.9 45 Hz'de sabit frekansta CRP-anti-CRP etkileşiminin impedanstaki ve faz açısındaki değişimini göstermektedir.

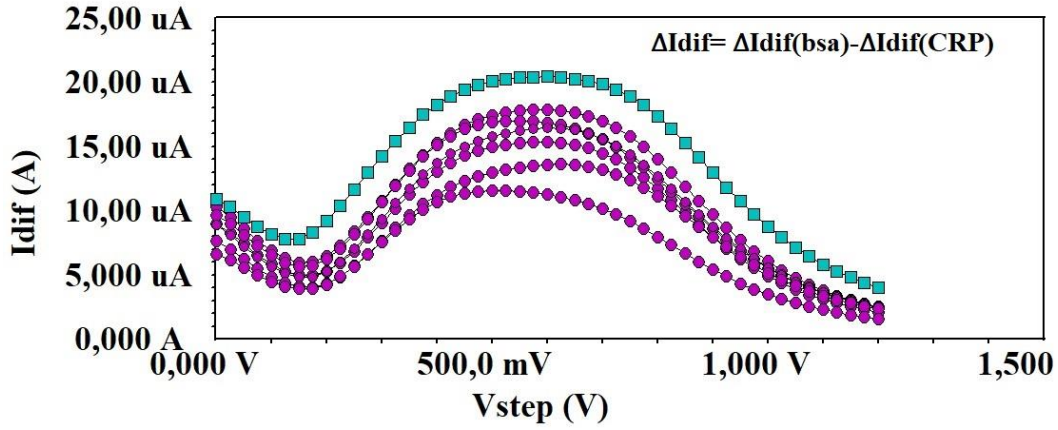
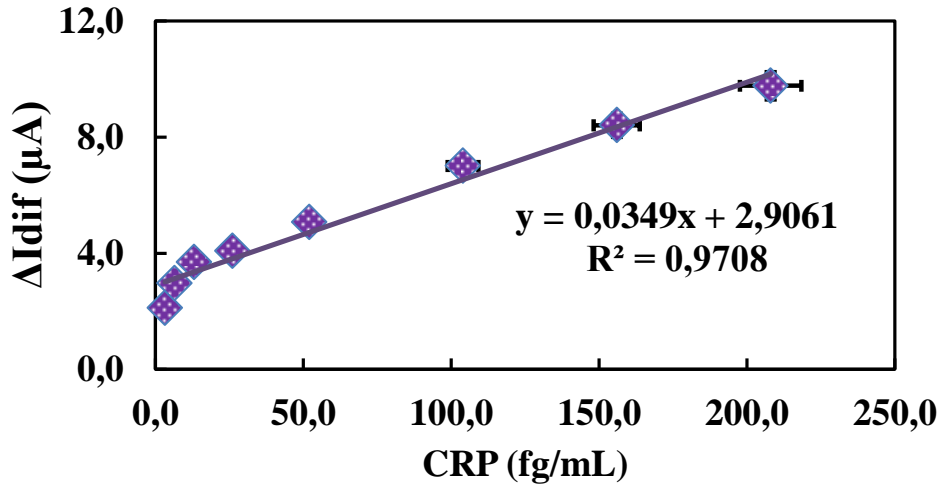


Şekil 4. 9. CRP Nöro-biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

Şekil incelendiğinde zamana bağlı olarak mavi işaret; impedanstaki değişimi gösterirken pembe işaret faz açısındaki değişimi göstermektedir. Faz açısı basitçe 'gerçek direnç' üzerinden 'hayali direncin' teğet değeridir. Örneğin eğer faz açısı bir ise, $\tan = \frac{\text{imag}}{\text{gerçek}}$ tir. CRP, hedefi anti-CRP ile etkileşime girdiğinde, tasarlanan yüzey üzerinde ekstra bir engelleme etkisi oluşur ve bu durum, faz açısında bir azalma ve devrenin impedans değerinde bir artış olarak yansır. İmpedanstaki zamana bağlı artış, spesifik etkileşimin bir işareti olarak kabul edilebilir. Yaklaşık 1500 ks (25 dakika) civarında, CRP'nin anti-CRP ile etkileşiminin bir doygunluk noktasına eriştiği gözlemlenmektedir.

4.1.3.6. Kare dalga voltametri

Geliştirilen nöro-biyosensörün karakterizasyon aşamaları sadece EIS ve CV teknikleri ile değil, aynı zamanda EIS gibi frekansa bağlı olan başka bir elektrokimyasal teknik olan SWV tarafından da izlenmiştir (Şekil 4.10.A). SWV, katodik puls ve aynı genlikte anodik puls arasındaki bir dizi potansiyel sinyalin birleşiminden oluşur. Katodik puls uygulandığında, analit yüzeye dağılır ve hızla azalır. Anodik puls sırasında, indirgenmiş analit hemen yeniden oksitlenir. Bu nedenle CRP konsantrasyonu arttıkça pik akımındaki azalma arasında doğrusal bir ilişki vardır.

A**B**

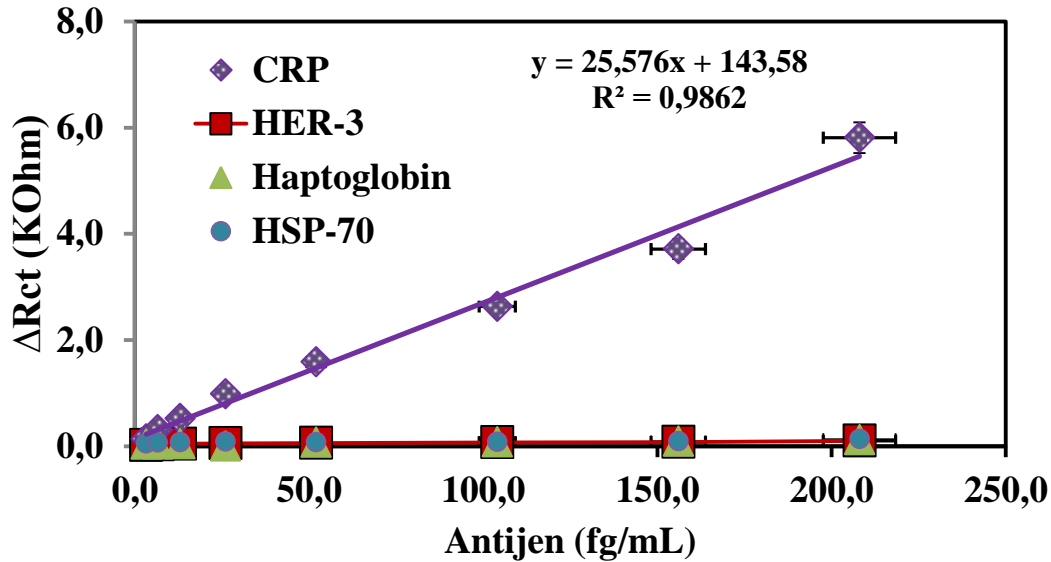
Şekil 4. 10. (A) Nöro-biyosensör sisteminin farklı CRP konsantrasyonlarına kare dalga voltametri ile verdiği yanıt, (B) kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiğinde görüldüğü gibi (Şekil 4.10.B) 3,25-208 fg/mL CRP konsantrasyon aralığında, SWV sonuçları EIS ile benzer hassasiyetlere sahiptir. SWV'nin EIS'ye olan avantajı, potansiyel taramanın birkaç saniye içinde tamamlanmış olmasıdır, oysa EIS için daha uzun bir süreye ihtiyaç vardır. Tayin aralığının sadece EIS ile değil SWV ile de gösterilmesi geliştirilen nöro-biyosensör stratejisinin üstünlüklerindedir.

4.1.3.7. CRP nöro-biyosensörünün seçiciliği

Tasarlanmış biyosensörün hedef CRP'ye karşı seçiciliği, nonspesifik protein antijenleri, insan HER-3, haptoglobin, HSP-70 ile olan nonspesifik etkileşimlerinin aynı konsantrasyon aralığında (3,25-208 fg/mL) incelenmesi ile belirlenmiştir.

Şekil 4.11' de HER-3, haptoglobin ve HSP-70' in nöro-biyosensöre spesifik olmayan çok küçük bir katkısı olduğunu göstermektedir. Nonspesifik etkileşimlerin toplam Rct yanıtına olan bu ihmal edilebilir katkısı, biyosensörün spesifik hedef CRP'ye karşı iyi bir seçiciliğe işaret etmektedir.



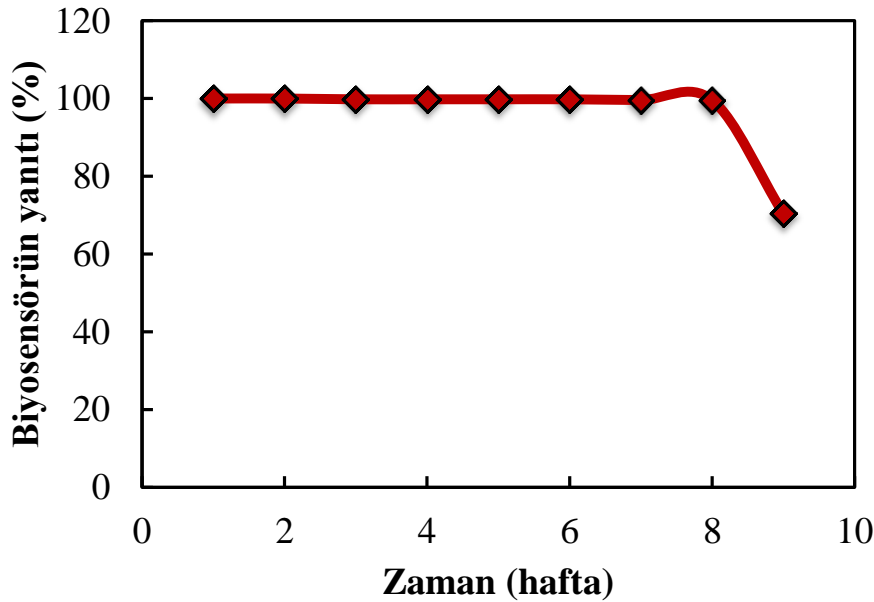
Şekil 4. 11. Nöro-biyosensör sisteminin farklı antijenlere karşı seçiciliği

Çizelge 4. 3. Seçicilik çalışmalarına ait yük transfer direnci değerleri

CRP (fg/mL)	ΔRct (ohm)	Standart sapma (SD) n=4	ΔRct (ohm) (HER-3)	ΔRct (ohm) (Haptoglobin)	ΔRct (ohm) (HSP-70)
3,25	137	±0,0065	22	41	48
6,5	312	±0,013	32	36	66,5
13	518	±0,032	45	45,7	72,5
26	985	±0,052	55	52,5	88
52	1585	±0,104	62	77	77
104	2631	±0,211	72	82,7	78
156	3714	±0,312	80	94,5	90
208	5813	±0,335	102	122	132,5

4.1.3.8. Nöro-biyosensörün depo ömrü

ITO-temelli tek kullanımlık nöro-biyosensörün depolanma stabilitesi, belirli periyotların sonunda nöro-biyosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan biyosensörler 4 ° C'de saklanıp ve her 7 günde bir CRP analizi yapılmıştır. İlk sekiz hafta boyunca nöro-biyosensörler başlangıçtaki aktivitelerini neredeyse tamamen korurken (% 99,6), dokuzuncu haftanın sonunda nöro-biyosensörün CRP analizine yönelik cevabı, bazı yıkıcı etkilere ve spesifik olmayan bağlanmalara bağlı olarak önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12. CRP Nöro-biyosensör sisteminin depolanma stabilitesi

4.1.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik uygulamaları

Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma hastanesine başvuran sağlıklı bireyler arasından rveom toplanan serum örneklerinde CRP analizi geliştirilen CPTMS temelli nöro-biyosensör sistemi ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar hastaneden elde edilen referans teknik sonuçlarıyla tablo kıyaslanmıştır.

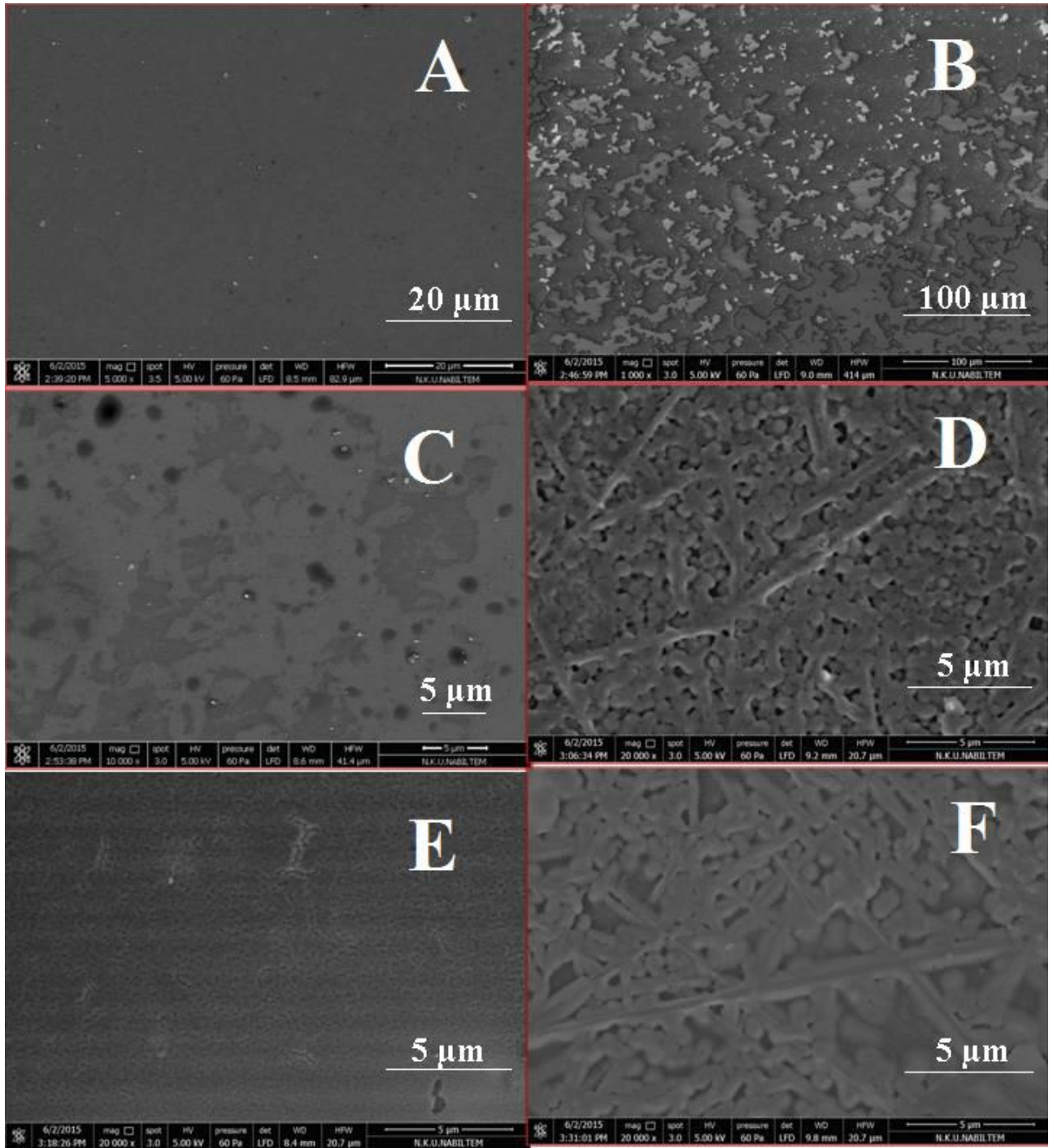
Çizelge 4. 4. CRP Nöro-biyosensör sisteminin serum örneklerinde uygulanabilirlik sonuçları

<i>Örnekler</i>	<i>Hastaneden alınan sonuçlar (mg/L)</i>	<i>Nöro-biyosensör ile elde edilen sonuçlar (mg/L)</i>	<i>Relatif Fark</i>	<i>Geri kazanım(%)</i>
1	4,1	3,99	2,68	97,3
2	1,1	1,42	29,27	129,27
3	2,4	2,57	7,08	107,08
4	2,1	2,41	14,57	114,57
5	4,7	5,45	15,95	115,95
6	2,3	2,12	7,83	92,17
7	1,4	1,5	7,14	107,14
8	3,3	2,8	15,15	84,85

Çizelge 4.4' de görüldüğü üzere, hastanenin uyguladığı referans yöntemi ile önerilen nöro-biyosensör sisteminden alınan sonuçlar arasında iyi bir uyum ve doğruluk gözlenmiştir.

4.1.3.10. SEM görüntüleri

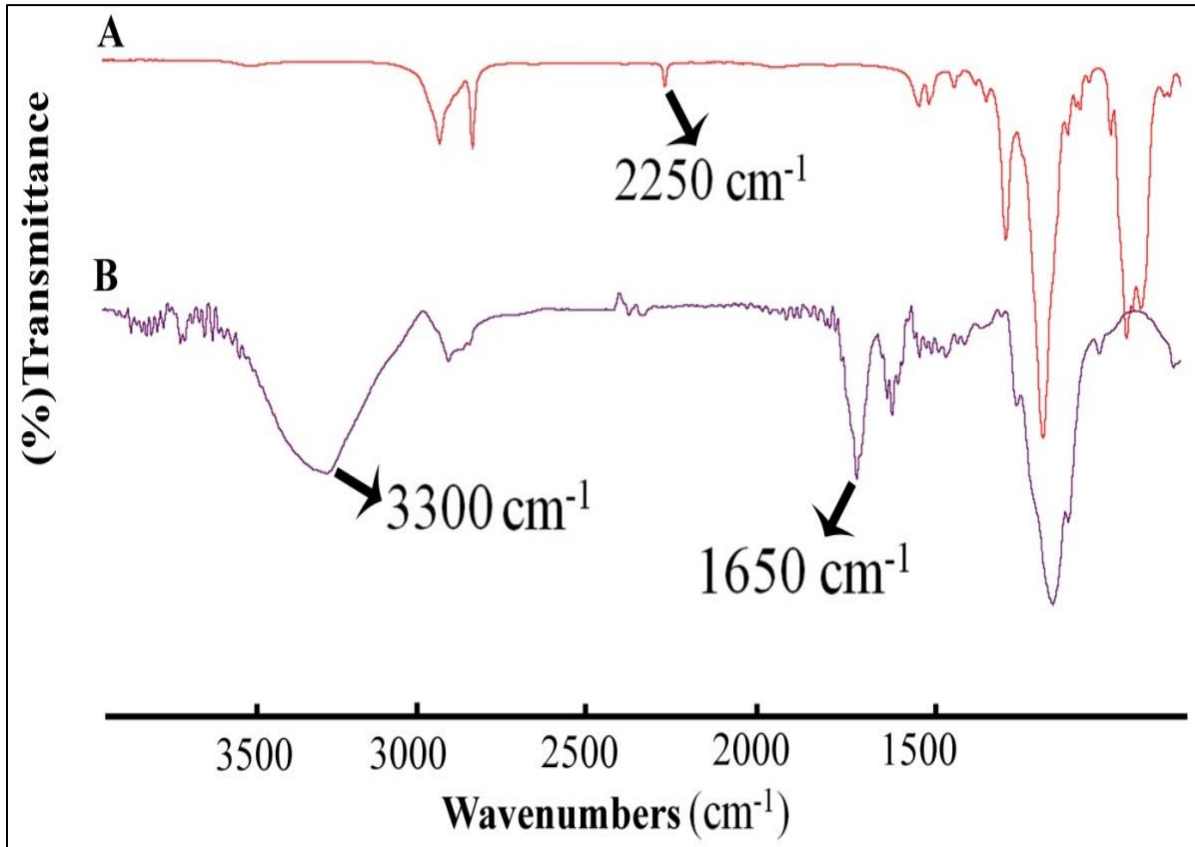
Geliştirilen nöro-biyosensör yüzeydeki kimyasal ve fiziksel değişiklikler, taramalı elektron mikroskobu ile adım adım izlenmiştir. Bu morfolojik değişikliklerin izlenmesi, biyosensörün devinimi hakkında üstün bilgi sağlar. Dizayn edilen biyosensör için SEM görüntüleri Şekil 4.13' te verilmiştir. Şekil 4.13.A tipik olarak bir ITO elektrodunun pürüzsüz yüzeyini göstermektedir. Akabinde oluşturulan hidrosillenmiş yüzey Şekil 4.13.B' de gösterilmiştir. Elektrodun CPTMS ile modifikasyondan sonra yüzeydeki morfolojik değişim Şekil 4.13.C' de gösterilmiştir. Anti-CRP elektrot yüzeyine immobilize edildiğinde, proteinin pentraxin yapısından dolayı daha küresel bir form elde edilmiştir (Şekil 4.13.D). BSA ile bloke etme adımı, Şekil 4.13.E' den görüldüğü gibi daha yoğun bir yüzey oluşmuştur. CRP ve anti-CRP arasındaki etkileşimden sonra ise fasulye benzeri bir yüzey gözlenmiştir (4.13.F).



Şekil 4. 13. CRP Nörobiosensörünün tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) yalın ITO, (B) ITO/OH, (C) ITO/OH/CPMTS (D) ITO/OH/CPMTS/anti-CRP, (E) ITO/OH/CPMTS/anti-CRP/BSA (F) ITO/OH/CPMTS/anti-CRP/BSA/CRP

4.1.3.11. FTIR sonuçları

CPTMS modifiyeli ve akabinde anti-CRP'nin immobilizasyonu ile elde edilen ITO yüzeyinin Fourier-dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) spektrumu ve Şekil 4.14 'te gösterilmektedir. Şekil 4.14.A CPTMS modifiye ITO elektrot yüzeyini göstermektedir. 2250 cm^{-1} 'deki orta yoğunluktaki bandın gözlemlenmesi, CPTMS'de $\text{C}\equiv\text{N}$ gruplarının varlığını açıkça göstermektedir. Şekil 4.14.B, CPTMS modifiye edilmiş ITO yüzeyi üzerinde anti-CRP'nin immobilizasyonu sonrası aynı yüzeyin FTIR spektrumunu göstermektedir. Yaklaşık 1650 cm^{-1} deki yoğun ve güçlü bant, CPTMS ve anti-CRP arasındaki kovalent etkileşim neticesinde oluşan imin grubunun varlığını göstermektedir. Ayrıca 3350 cm^{-1} arasındaki geniş bant sekonder amin gruplarına karşılık gelmektedir.



Şekil 4. 14. CRP Nöro-biyosensörünün tasarım adımlarının FTIR spektrumları (A) CPMTS, (B) anti-CRP

4.2. C-reaktif protein (2) tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör

4.2.1. Nörobiyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı

Silan kimyası, ITO temelli biyosensörlerin tasarımında sıklıkla kullanılmaktadır. 11-Siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) mono tabaka oluşturmak için bir yandan kondensasyon reaksiyonu verirken, öte yandan yüzeydeki -OH grupları aracılığıyla ITO substratları ile etkileşir. Bir organo fonksiyonel silan olan 11-CUTMS düşük yüzey gerilimi nedeniyle ITO-OH yüzeyine karşı yüksek reaktiviteye sahip olabilirler. SAMs ile substrat arasındaki yeterli etkileşimleri sayesinde geçiş fazının oluşumuna öncülük edebilmektedir. CRP tayinine yönelik geliştirilen ikinci nöro-biyosensör sisteminde yüzeydeki SAMs 11-CUTMS ile oluşturulmuştur. Nitril azotu üzerinde eşleşmemiş elektron çiftine sahip olan siyano grubunun, uygun hidrojen donörü bulunan moleküller ile moleküller arası bağlar oluşturabilmesi biyoalgılama elementinin immobilizasyonunda belirgin üstünlükler sağlamıştır. Ek olarak, diğer silan ajanlarına göre daha uzun bir karbon zinciri içeren 11-CUTMS, yüzeyde daha kompakt bir SAMs yığınının oluşturulmasına olanak sağlar. Yüzeyde stabil bir tek tabaka oluşturmak için, yüzeyinde aktif OH grupları bulunan ITO elektrotlar 11-CUTMS ile gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 11-CUTMS ile SAMs oluşturulduktan sonra, elektrotlar PAMAM çözeltisine daldırılmıştır. Bu noktada PAMAM dendrimer çözeltisinin kullanım amacı, aktif amino terminallerini arttırarak anti-CRP immobilizasyon performansını amplifiye etmektir. Elektrotlar PAMAM çözeltisi ile muamele edildikten sonra anti-CRP immobilizasyonu, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit çözeltisi ortamında gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyondan sonra fonksiyonel terminaller ve non spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla BSA bloklama ajanı olarak kullanılmıştır (**Marsden ve Ziemianski 1979**).

İmpedans "spektroskopisi" adı, impedansın tek bir frekanstan ziyade farklı frekansları tayin edebilme gerçeğinden türemiştir. Bu sayede bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların veya membranların değişim ve difüzyon prosesleri ve karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır. Bu bilgilere ulaşmak için, impedans spektrumu genellikle eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle direnç ve kapasitanstan oluşan bu devre incelenen sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini açıklar. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon,

partisyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir **(Daniels ve Pourmve 2007)**.

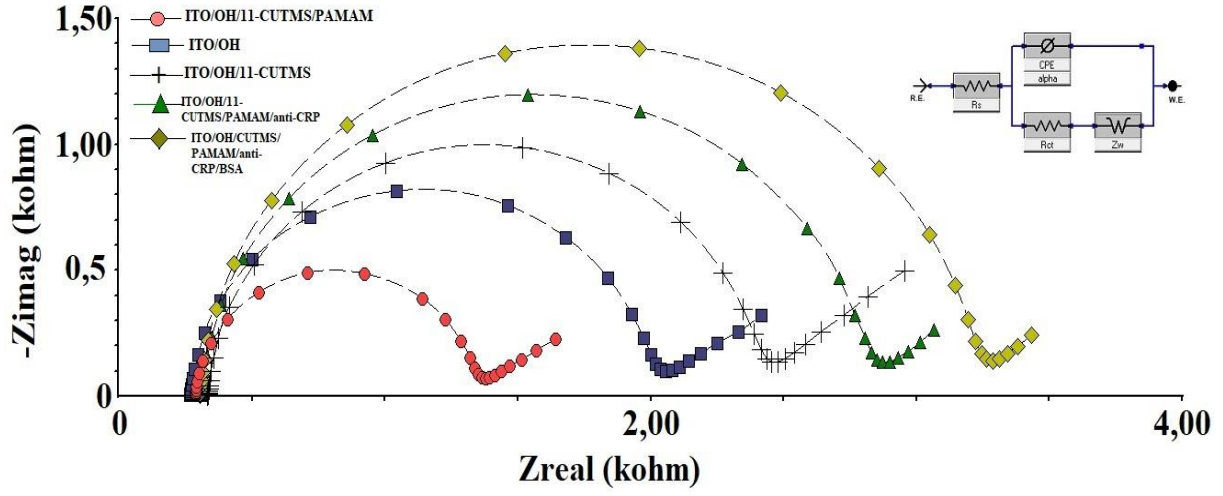
Nyquist plot elektrolitik çözelti direnci, elektrot polarizasyon direnci ve çift tabaka kapasitansı vb gibi elektrokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi için kullanılan impedansın en kritik ve popüler formatlarından biridir. Nyquist grafiği, kompleks bir düzlemde $Z'(\omega)$ ve $Z''(\omega)$ ile temsil edilir. Bu grafiğin pek çok avantajları arasında en önemlileri ekstrapolasyon yaparak çözelti direncini hesaplayabilmek; çözelti direncinin belirgin etkilerini gözlemleyebilmek; seri devreye vurgu yapabilmek iki ya da daha fazla deneyin sonuçlarının kıyaslanabilmesi sayılabilir **(Agarwal ve ark. 1992)**.

Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait EIS verilerinin Nyquist grafikleri, Şekil 4.15.A' da gösterilmektedir. Verilerin eşdeğer devre modeli ile fitlenmesi, ara tabaka yük transfer direncinin (R_{ct}) her tabaka (Yalın elektrot, OH, CUTMS ile SAM, PAMAM, anti-CRP ve BSA) oluştuktan sonra değiştiğini (Şekil 4.15.B) göstermiştir.

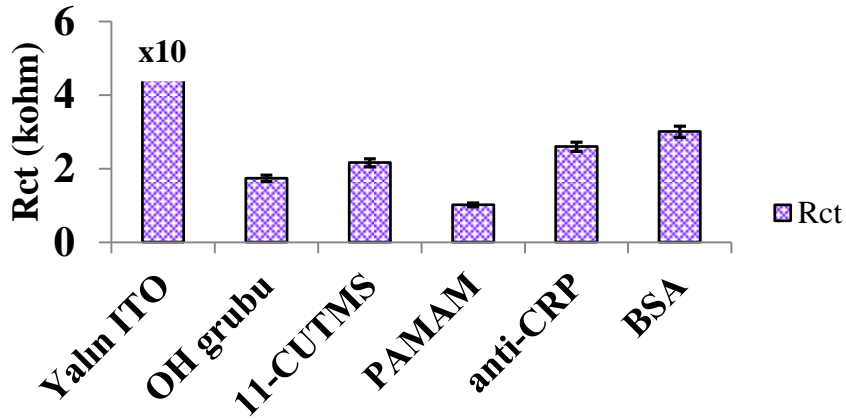
Elektrot-çözelti ara yüzündeki redoks probunun elektron transfer kinetiği elektron transfer direnci (R_{ct}) ile kontrol edilir. Temizlenmiş yalın ITO elektrodun yük transfer direnci (Şekil 4.15.B) yaklaşık 45000 ohm'dur. İmpedans spektrumlarından görüldüğü gibi, ITO yüzeyinde -OH gruplarının oluşumu, elektroda iletken davranış kazandırarak yük transfer direncinde bir azalma sağlar. Akabinde, yüzeyde 11-CUTMS ile SAMs oluşturulmasından sonra, yapının uzun alifatik zincir kısmı yüzeyde sıkıca istiflenerek etkili hidrofobik etkileşimlere yol açmıştır. Buna ek olarak, 11-CUTMS'deki negatif yüklü -CN grupları redoks probunu itmekte ve yüzeye difüze olmasını zorlaştırmaktadır. Bu etkiler, EIS sonuçlarına yük transfer direncinde bariz bir artış olarak yansımıştır. Bir sonraki aşamada, amino terminalli PAMAM dendrimerin primer amino grupları 11-CUTMS'un aktif -siyano grupları arasında gerçekleşen reaksiyon, ikincil ketimin organik yapısının oluşmasıyla neticelenmektedir. Bu kovalent etkileşim sayesinde PAMAM; 11-CUTMS modifiyeli ITO yüzeye bağlanmış olur. Beklendiği gibi, PAMAM üzerindeki pozitif amino grupları ile negatif yüklü redoks probu arasındaki elektrostatik çekim, İmpedans spektrumlarına R_{ct} değerinde bir azalma olarak yansır. İmmobilizasyon materyalleri olarak dendrimerler, çok dallı, üç boyutlu üniform yapılarla sahip nanomalzemelerdir. Merkez çekirdek, dallar ve yüzey grupları, dendritik mimarilerinin ana bileşenleridir. Bu nöro-biyosensörün tasarımında kullanılan PAMAM dendrimeri yüzeyinde 8 tane amino grubu bulundurur. Glutaraldehit, anti-CRP'nin ITO

yüzeyine immobilizasyon aşamasında antikor ve PAMAM'ın birincil amino grupları arasında bir çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır.

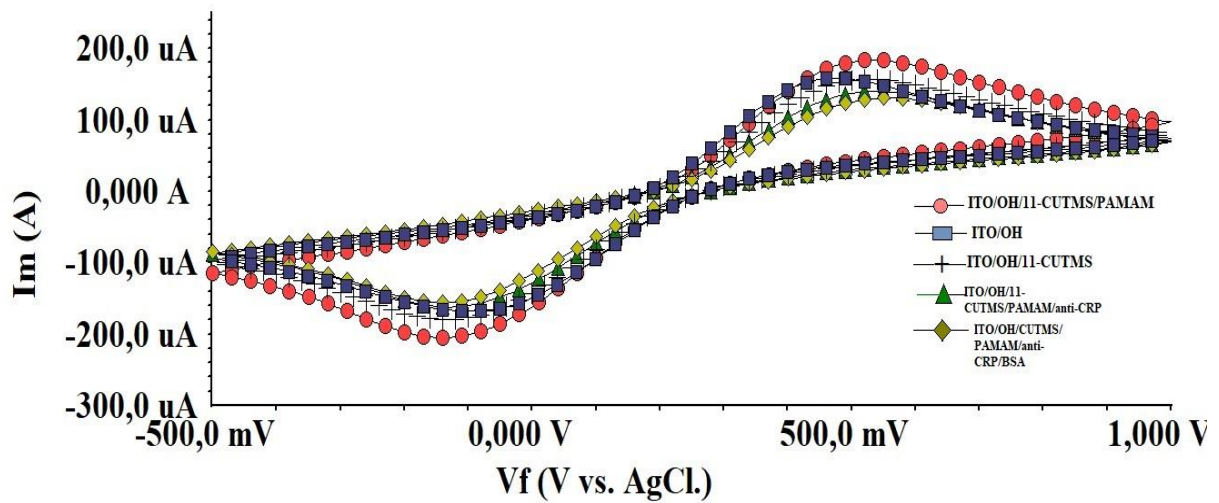
A



B



C



Şekil 4. 15. CRP Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) EIS verileri, (B) her adıma ait Rct değerleri (C) döngüsel voltametri verileri

Anti-CRP'nin elektrot yüzeyi üzerindeki kovalent immobilizasyonu, modifiye elektrot yüzeyindeki yalıtım özelliğini açıkça arttırmış ve Şekil 4.15.A 'da görüldüğü gibi yük transfer direncinde belirgin bir artışa neden olmuştur. PAMAM dendrimer sahip olduğu pozitif yükler sayesinde, nöro-biyosensörün yüzeyini daha az negatif yapar ve böylece redoks çiftinin sensör yüzeyine yaklaşmasına izin verir ve sonuçta yük aktarımı daha etkili olur. Bu sonuç, 11-CUTMS ve PAMAM dendrimerlerinden oluşan platformun anti-CRP'nin etkili bir şekilde immobilizasyonunu sağladığı görülmektedir. Son adımda, aktif amino uçlarını bloke etmek için kullanılan BSA, aynı zamanda yüzey üzerindeki elektron direncinin artmasına da sebep olmuştur.

Anti-CRP temelli biyolojik sistemlerin elektrokimyasal davranışlarını araştırmak için döngüsel voltametri de yararlanılmıştır. İmpedans spektrumları ve döngüsel voltamogram sonuçları birbiriyle uyumludur. Şekil 4.15.C görüldüğü üzere 11-CUTMS ile SAMs oluşturulduktan sonra, negatif yüklü siyano grupları ve negatif yüklü redoks probu birbirini itip, pik akım sinyalinin azalmasına sebep olmuştur. Şekil 4.15.C' de görüldüğü gibi, CUTMS ile modifiye edilmiş elektrotlar PAMAM ile muamele edildiğinde, PAMAM yapısının primer amino grupları ile redoks probu arasındaki elektrostatik çekim, pik akımlarının artmasına neden olmuştur. Anti-CRP'nin CUTMS ile modifiye edilmiş ITO yüzeyine kovalent immobilizasyonu sonrasında, redoks probu ve elektrot yüzeyi arasındaki immobilize tabakaların önleyici etkileri nedeniyle hem anodik hem de katodik piklerde bir azalma gözlemlenmiştir.

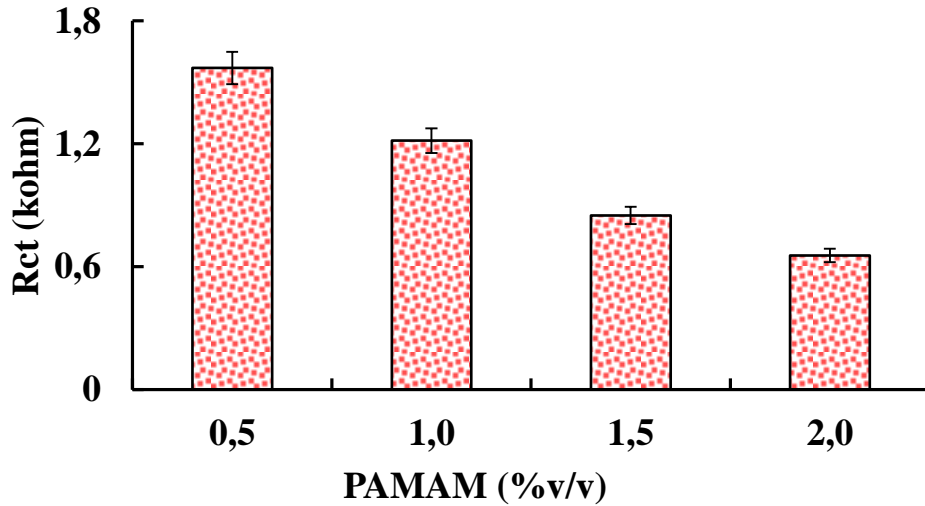
4.2.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün optimizasyon parametreleri

4.2.2.1. PAMAM dendrimerinin optimum konsantrasyonu

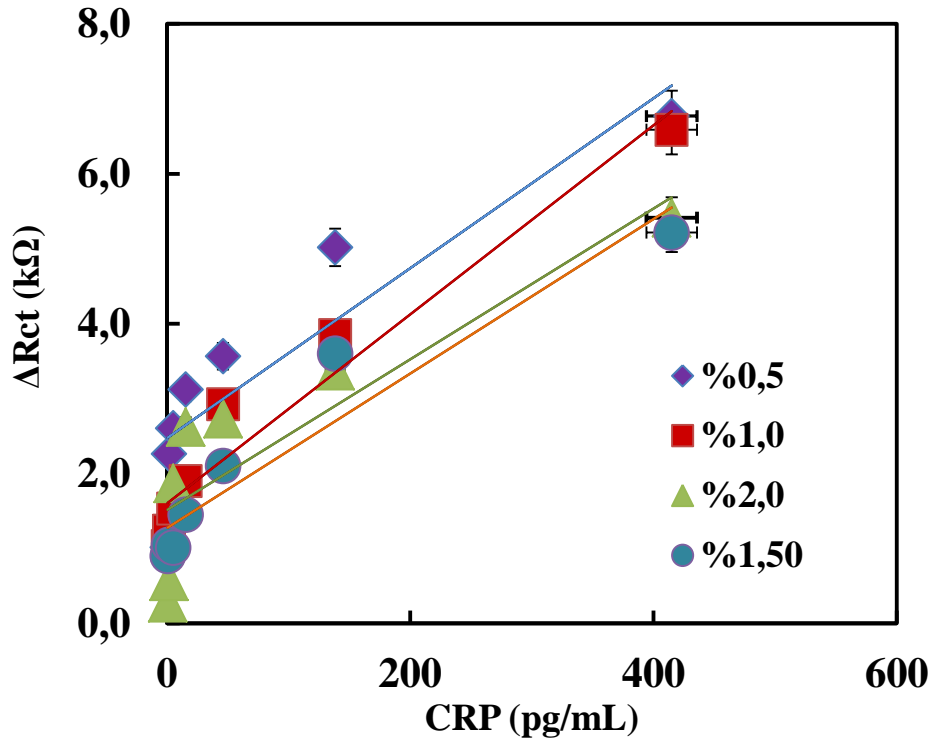
Dendrimerin serbest amin gruplarının sayısı, anti-CRP'nin immobilizasyonu adımıdaki etkili çapraz bağlar için önemlidir. Çekirdekten yüzeye giderken dallanma noktalarının sayısı (basamaklı noktalar) dendrimer jenerasyonu olarak adlandırılır. Bu çalışmada kullanılan PAMAM dendrimer, algılama yüzeyi üzerinde mümkün olduğunca fazla sayıda anti-CRP'nin immobilizasyonunu destekleyen çok sayıda primer amino gruptan oluşmuştur. PAMAM konsantrasyonunun optimize edilmesi, anti-CRP immobilizasyonu ve akabinde CRP'nin en uygun şekilde tanınmasına olanak sağlar. Bu amaçla, % 1 (v/v) 11-CUTMS ile modifiye edilmiş ITO elektrotlar; farklı konsantrasyonlarda PAMAM (etanol

içinde % 0,5, 1, 1,5 ve 2,0) çözeltileri ile oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

PAMAM konsantrasyonları farklılandırılıp diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki CRP konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir. Şekil 4.16 incelendiğinde, PAMAM konsantrasyonu arttıkça, yük transfer direnci düşmektedir ki bu beklenen bir neticedir. Fakat kalibrasyon eğrileri incelendiğinde (Şekil 4.17), % 2,0 PAMAM nispeten düşük yük transfer direncine ve çok düşük bir belirleme katsayısına (R^2 : 0,7633) sahipken, % 0,5 PAMAM yüksek yük transfer direncine ve nispeten düşük bir belirleme katsayısı (R^2 : 0,8212) sahiptir. Bununla birlikte,% 1,0 PAMAM çözeltisine ait sonuç yüksek yük transfer direnci ve yüksek belirleme katsayısı göstermiştir (R^2 : 0,9412). PAMAM konsantrasyonu arttıkça 11-CUTMS modifiyeli ITO yüzeyine bağlanan PAMAM, redoks probun yüzeye difüzyonunu kolaylaştırmakta fakat anti-CRP'nin immobilizasyonuna ve akabinde CRP'nin ölçümlenmesine aynı oranda etkileyememektedir. Bu veriler ışığında, nöro-biyosensörün dizaynına %1,0 PAMAM çözeltisi ile devam edilmiştir.



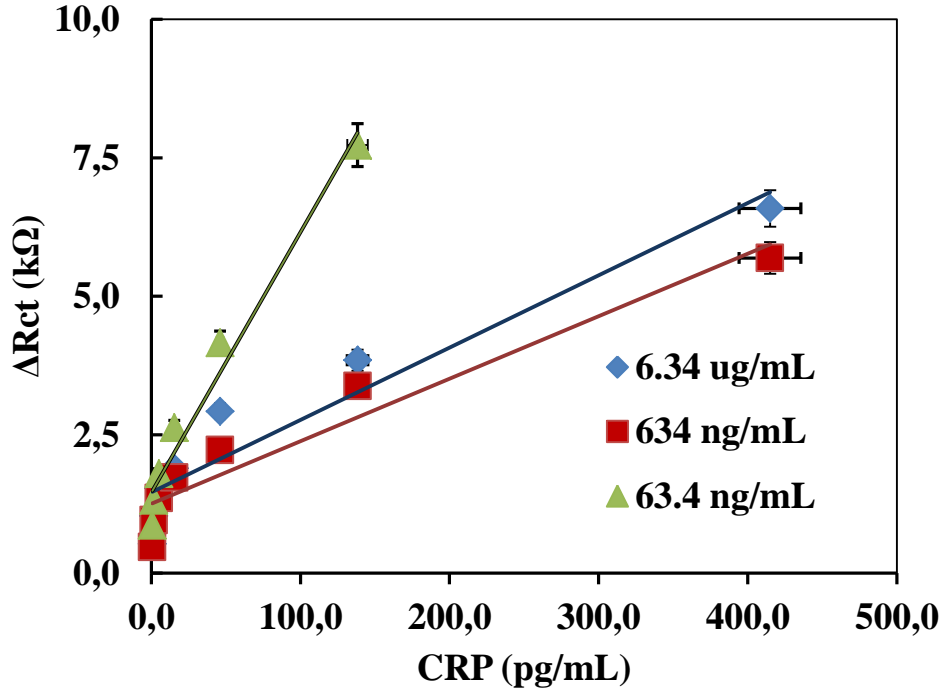
Şekil 4. 16. Farklı PAMAM konsantrasyonlarının yük transfer direncine etkisi



Şekil 4. 17. Farklı PAMAM konsantrasyonlarıyla hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri

4.2.2.2. Optimum anti-CRP konsantrasyonu

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında, anti-CRP konsantrasyonunun biyoalgılama sistemi cevabı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, oda sıcaklığında 60 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda anti-CRP (63,4 ng / mL, 634 ng / mL ve 6,34 ug / mL) ile biyosensörler hazırlandı. Anti-CRP konsantrasyonları farklılaştırılıp diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki CRP konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir. Daha yüksek antikor konsantrasyonlarında, nöro-biyosensörün duyarlılığında bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla 6,34 ug / mL ve 634 ng / mL anti-CRP $R^2 = 0,9112$ ve $0,9267$). Bunun nedeni, CRP'nin meydana gelen yüksek sterik engellenmeden dolayı yüzeye kolayca difüze olamaması ve olası protein-protein etkileşimlerinin CRP'nin tespitini azaltması olabilir. EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri analiz edildiğinde (Şekil 4.18), CRP'nin optimal olarak tanınması için $63,4 \text{ ng mL}^{-1}$ anti-CRP çözeltisi ileri ki aşamalar için optimize edildi.



Şekil 4. 18. Farklı anti-CRP konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri

4.2.3. CRP (2) nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri

4.2.3.1. CRP'nin geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi

Optimum koşulları belirlenen nöro-biyosensör sistemiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart CRP çözeltileri EIS ve CV teknikleriyle ölçümlenmiştir. CRP konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki, Şekil 4.15.A' ya eklenen eşdeğer devre modeli ile belirlenmiştir.

CRP nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{CRP}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (4.2)$$

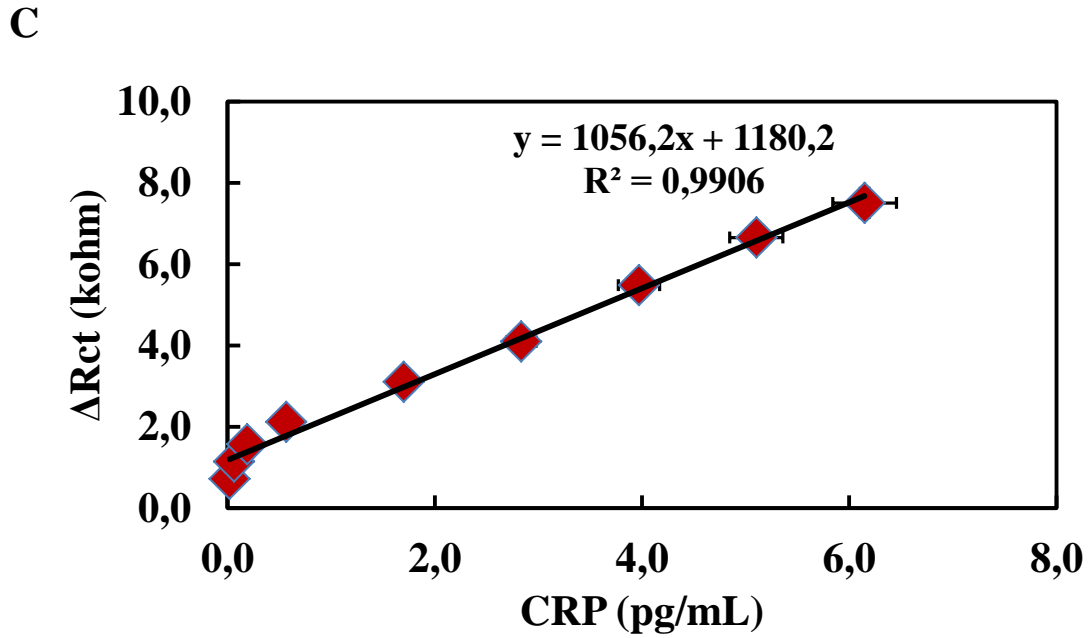
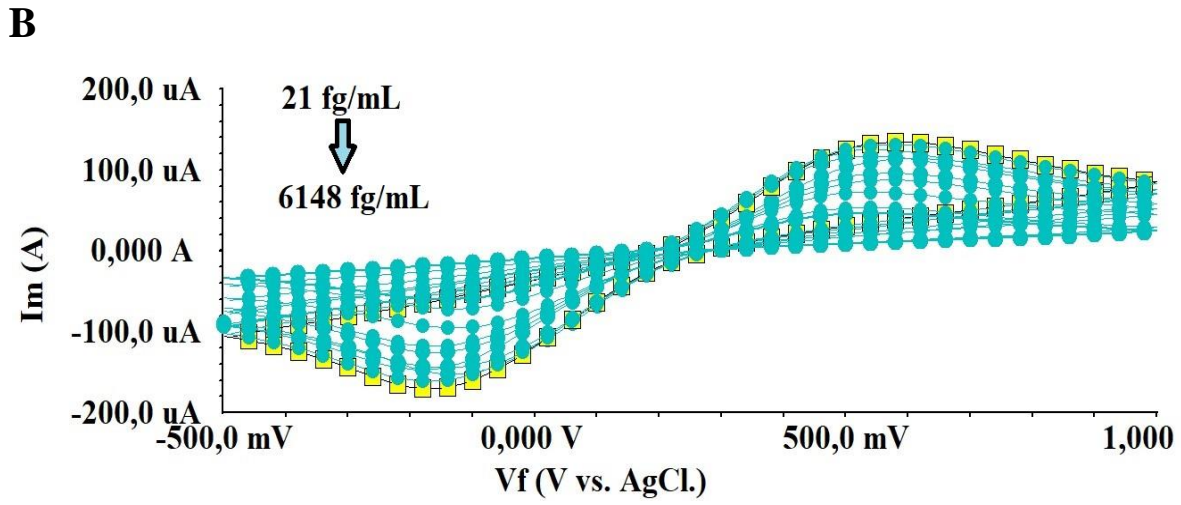
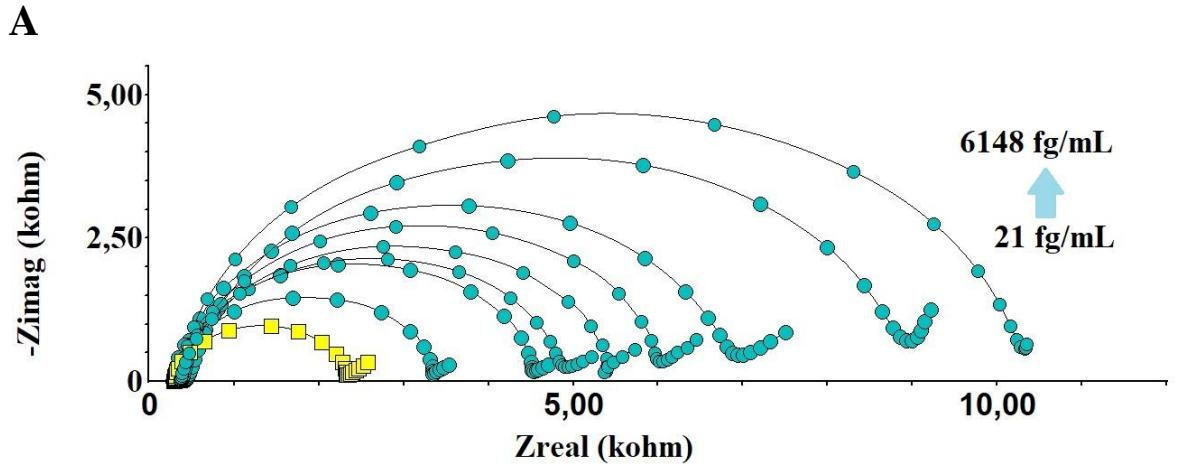
burada $R_{ct}(\text{CRP})$, anti-CRP ve CRP arasında antikor-antijen bağlanmasından sonra elektron transfer direncinin değeridir. $R_{ct}(\text{BSA})$, BSA ile oluşturulmuş biyosensörün bloklama aşamasının yarım daire çapının değeridir. ac potansiyel sarsımı üçlü elektrot düzeneğini

içeren elektrokimyasal hücreye uygulanmasıyla birlikte, akım tüm sistem elemanlarını –ITO çalışma elektrodu, biyoalgılama elementi, çözeltili ve karşıt elektrot- dolaşmaya başlayacaktır. Ölçülen impedans, bu elemanların bireysel katkılarının bir özeti olarak olmaktadır. Sistemin kapasitans değişikliği, dielektrik sabiti veya transduser yüzeyindeki tabakanın değişmesiyle indüklenmektedir.

Geliştirilen tek kullanımlık nöro-biyosensörünün artan konsantrasyonlarındaki CRP ile inkübe edilmesi neticesinde elde edilen Nyquist grafikleri ve döngüsel voltammogramları, Şekil 4.19.A ve 4.19.B' de sunulmaktadır.

Bir algılama sistemi ile ölçülebilen maksimum ve minimum değerler, dinamik aralık veya açıklık olarak da adlandırılan ölçüm aralığı olarak tanımlanır. Bu aralık, algılama sistemi için anlamlı ve doğru bir çıktı sağlamaktadır. Tüm algılama sistemleri belirli bir aralıkta ölçüm alabilecek şekilde tasarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin belirtilen düz bir çizgiye yakınlığı sensörün doğrusallığını gösterir. Elektrokimyasal biyosensörler her zaman doğrusal konsantrasyon aralığının üst sınırına sahiptir. Bu sınır, biyokimyasal veya biyolojik reseptörün biyokatalitik veya biyo-kompleksleştirici özellikleriyle doğrudan ilişkilidir.

CRP konsantrasyonu arttıkça, Nyquist grafikleri üzerinde yarım daire çapındaki doğrusal bir artış gözlenmiştir. R_{ct} 'deki artış, elektrot yüzeyinin iletkenlik özelliklerinde azalmaya neden olan bir immüno-kompleksin oluştuğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde, Şekil 4.19.B, CV tepe akımlarının artan CRP konsantrasyonları ile azaldığını göstermiştir. Bunun nedeni, yüzeydeki CRP konsantrasyonunun artmasıyla immüno-kompleksin büyümesinin, elektron transfer bariyerini önemli ölçüde arttırmasıdır. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.19.C) $21-6148 \text{ fg mL}^{-1}$ aralığında lineer bir korelasyon göstermiştir. LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0.34 fg mL^{-1} ve 1.13 fg mL^{-1} olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında CRP tayinine yönelik geliştirilen sensör sisteminin hassasiyetinin yüksek olduğu vurgulanabilir.



Şekil 4. 19. Optimum koşullarda hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda CRP' ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Tasarlanan nöro-biyosensörün sahip olduğu bu hassas ve geniş tayin aralığı (21-6148 fg/mL), PAMAM dendrimerinin sağladığı dallanmanın bir neticesidir. Dendrimerde bulunan dallanarak büyüyen fonksiyonel –amino grupları yüzeye mümkün oldukça çok anti-CRP'nin immobilizasyonuna olanak sağlamıştır. Ayrıca, 11-CUTMS ile PAMAM kombinasyonundan oluşan algılama platformu CRP'nin hassas ve femtogram düzeyinde tayini için yeni ve umut vaat eden bir tasarımıdır. Organosilan ITO yüzeyi ile bağlantıyı sağlayan bir köprü görevi görürken, PAMAM dendrimer ile gerçekleştirdiği kovalent etkileşim sayesinde hassas ve geniş bir tayin aralığının öncüsü olmuştur. Literatürde, 11-CUTMS ile tasarlanmış herhangi bir biyosensör sistemi mevcut değildir; bu bakımdan çalışma oldukça yenilikçidir.

İmpedimetrik biyosensörlerin başlıca problemlerinden biri, antijenlerin antikor fonksiyonelleştirilmiş elektrotlara doğrudan bağlanması üzerine impedans spektrumlarının nispeten küçük bir değişime uğramasıdır. Oluşturulan sinyaller (yani, elektron transfer direncindeki, R_{ct} ve çift yüklü tabaka kapasitansındaki, Cd'deki farklar), antijen konsantrasyonu düşük olduğunda ve antijen-antikor kompleksinin yüzey kaplaması doygunluktan uzak olduğunda özellikle önemsizdir. Bu önemli sorun, amplifiye edilmiş impedimetrik immünosensörlerin geliştirilmesine yönelik son çalışmalarda ele alınmıştır. Geliştirilen bu nöro-biyosensör sisteminde kullanılan PAMAM dendrimer de bu sorunu üstesinden gelinilmesi hedeflenmiş ve yüksek sinyaller elde edilebilmiştir.

Geliştirilen nöro-biyosensörün üretim adımlarına ait K.K.T değerleri Çizelge 4.5' te verilmiştir. K.K. dönüşümleri EChem Analyst programı yardımıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 5. Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

Nöro-biyosensör adımı	Kramers Kronig Transform değeri (μ)
Yalın ITO	179,8
ITO/OH	50,02
ITO/OH/11-CUTMS	1,749
ITO/OH/CUTMS/PAMAM	12,8
ITO/OH/CUTMS/PAMAM/anti-CRP	1,821
ITO/OH/CUTMS/PAMAM/anti-CRP/BSA	0,09469

Seçilen model ile sonuçların uyumu zayıfsa verilerin K-K dönüştürülemez olduğunu ve bu nedenle kalitesiz olduğunu varsayabiliriz. Bu, eşdeğer devre modeline K-K uyumlu olmayan veriler uydurmak için çok az nokta vardır anlamına gelir. Doğrusal, nedensel ve kararlı olan EIS verileri için K-K ilişkileri her zaman doğru olacaktır. Ölçülen gerçek ve sanal spektral veriler K-K ilişkilerine uymuyorsa, verilerin bu koşullardan birini ihlal ettiği noktasına ulaşılabilir.

4.2.3.2. CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Optimum şartlar altında hazırlanan 18 tane ITO tek kullanımlık elektrodun, geliştirilen nöro-biyosensör sistemiyle belirli bir CRP konsantrasyonunu (1,7 pg/mL) aynı doğrulukta ölçme kabiliyeti tekrarlanabilirlik başlığı altında incelenmiştir. Tekrarlanabilirlik deneyleri için korelasyon katsayısı, ortalama değer ve standart sapma sırasıyla % 6, 45, 1,86 ve 0,12 pg/mL olarak hesaplanmıştır.

4.2.3.3. CRP (2) nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Tekrar üretilebilirliğin tanımı, başka herhangi bir analitik cihazda olduğu gibi elektrokimyasal biyosensörler için de aynıdır: bir dizi gözlemde veya bir süre boyunca gerçekleştirilen sonuçlarda saçılma veya kaymanın bir ölçüsüdür. Genellikle lineer aralık içindeki analit konsantrasyonları için belirlenir. ITO temelli, PAMAM ve 11-CUTMS ile dekore edilmiş CRP nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirlik kabiliyeti, aynı prosedürle farklı zamanlarda hazırlanan 10 biyosensör sisteminin 21-6148 fg / mL tayin aralığındaki cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda 6 nöro-biyosensörün yanıtlarının CRP için 21-6148 fg mL⁻¹ arasındaki benzer doğrusallığı gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.6).

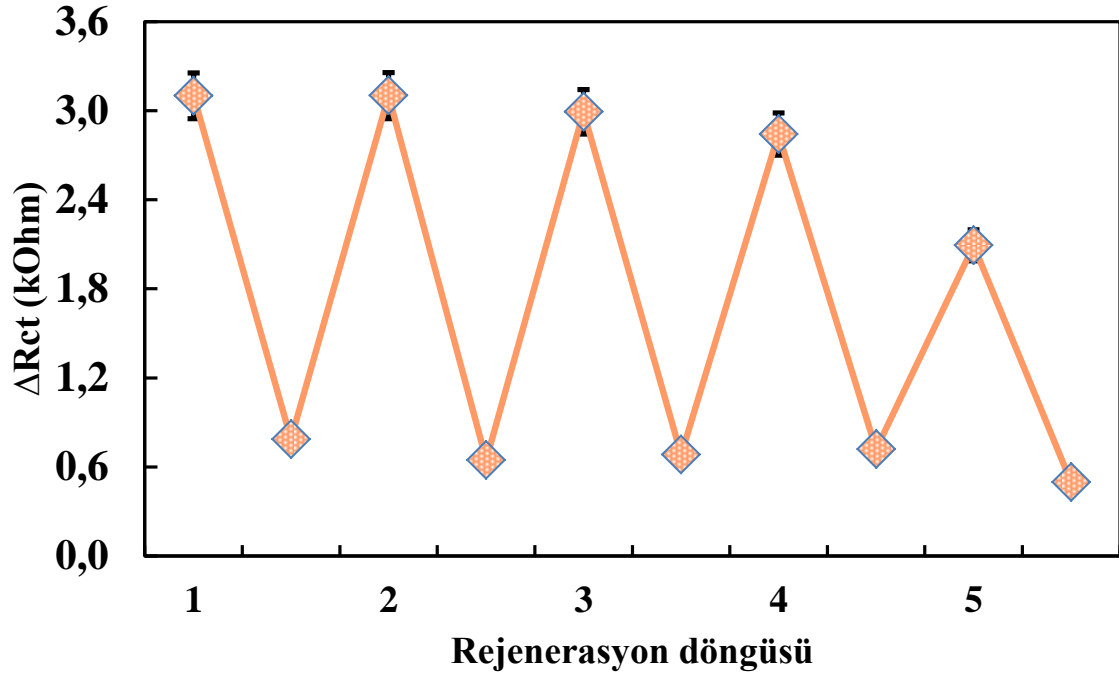
Tekrar üretilebilirliğe ait sonuçların lineer eşitliklerine ait eğimlerin ve interseptlerin relatif standart sapmaları sırasıyla %3,39 ve %2,21 olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik sonuçları, PAMAM ve 11-CUTMS'den oluşan yüzey platformunun, CRP'nin 21-6148 fg / mL konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılıkla tanınmasına izin verdiğini göstermektedir.

Çizelge 4. 6. CRP Nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirliğine ait doğru denklemleri

Biyosensör numarası	y	R ²	Lineer aralık (fg/mL)
Biyosensörün tekrar üretilebilirliği			
1	1104,2x + 958,06	0,9819	21-6148
2	1222,5x + 979,24	0,9838	21-6148
3	1369,8x + 864,3	0,9894	21-6148
4	1118,4x + 916,5	0,9832	21-6148
5	1202,5x + 949,3	0,9851	21-6148
6	1056x + 1080,5	0,9894	21-6148

4.2.3.4. CRP nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi (tekrar-kullanılabilirlik)

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenera edilebilme kapasitesi 10 mM HCl rejenerasyon çözeltisi ile muamele edilerek test edilmiştir. Biyosensör sistemlerinde yer alan etkileşimler göz önüne alındığında, potansiyel enerji farklılıkları genellikle biyoreseptör (anti-CRP) / analit (CRP) bağlanmasında önemli bir güçtür. Etkileşimler, genellikle yük-yük etkileşimleri tarafından aracılık edilir. Belirli bir çözelti pH'sında, , amino asit kalıntısının izoelektrik noktasına (pI) bağlı olarak, yapı pozitif veya negatif olarak yüklenebilir. Yükün çözücü ortamına bağlı olması nedeniyle, çözücü içindeki iyonik kuvvet, pH ve rakip iyonların varlığı gibi faktörler, biyosensör rejenerasyonunda başrol oynayan biyoreseptör ve analit arasındaki entalpik etkileşimleri etkilemektedir. Kullanılan rejenerasyon çözeltisi ile (HCl), geliştirilen PAMAM-CUTMS platformundan oluşan nöro- biyosensör sistemi 4 kere rejenera edilebilmiş, daha sonra sinyal kritik anlamda kaybedilmiştir (Şekil 4.20). Biyoalgılama platformunun bozulmuş olması, CRP'nin algılanmasına mani olmuştur.

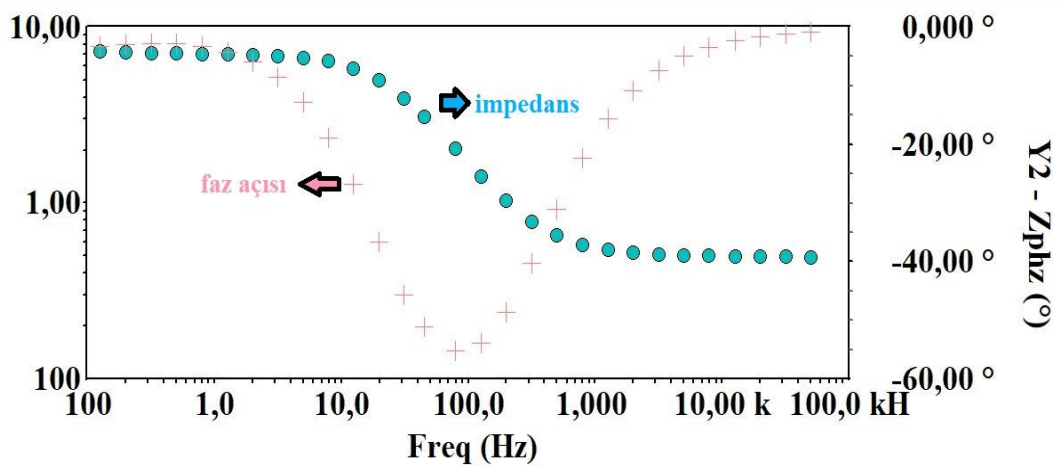


Şekil 4. 20. CRP Nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi

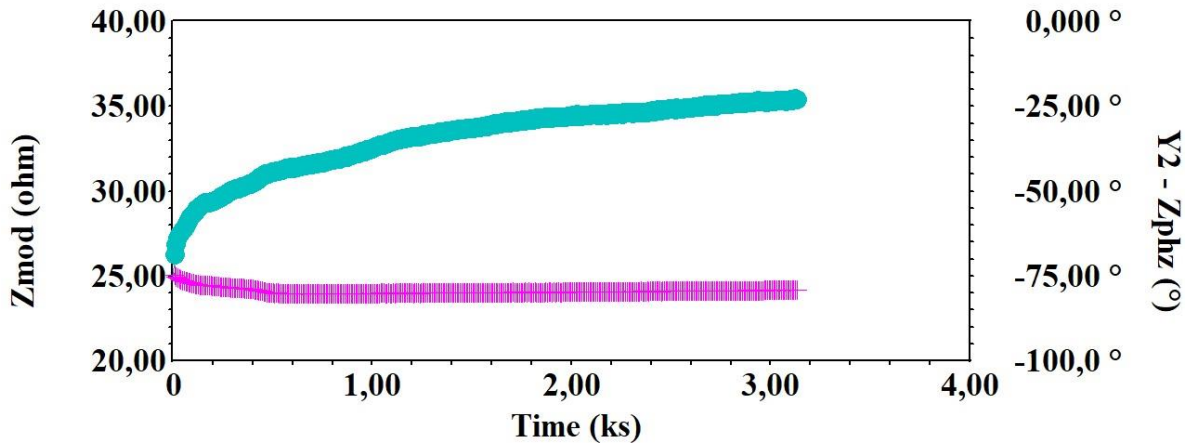
Sensör geliştirmede yüksek maliyet esas olarak enstrümantasyon ve materyallerin yüksek maliyetine bağlı olmaktadır. Tekrar kullanılabilir (rejenere edilebilir) sensörlerin varlığı maliyetleri azaltmak için önemli bir yoldur. Ekonomik nedenlerden ayrı olarak, cihazdan cihaza varyansın büyük bir hata kaynağı olabileceği uygulamalarda sensörlerin tekrar kullanılabilirliği (rejenere edilebilirliği) kaçınılmazdır.

4.2.3.5. Sabit frekansta impedans analizi

Anti-CRP antikor - CRP bağlanmasının kinetiksel davranışı sabit frekanslı impedans teknikliği ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem, elektriksel yüzeydeki değişimleri anlamak adına oldukça kullanışlıdır. Bu amaçla, potentiostat, Bode plot yardımıyla tanımlanan sabit bir (10 Hz) frekansa ayarlanmıştır. Şekil 4.21 PAMAM-CUTMS modifiyeli nörobiyosensörün BSA adımına ait bir Bode eğrisini göstermektedir.



Şekil 4. 21. CRP Nöro-biyosensörünün bode grafiği



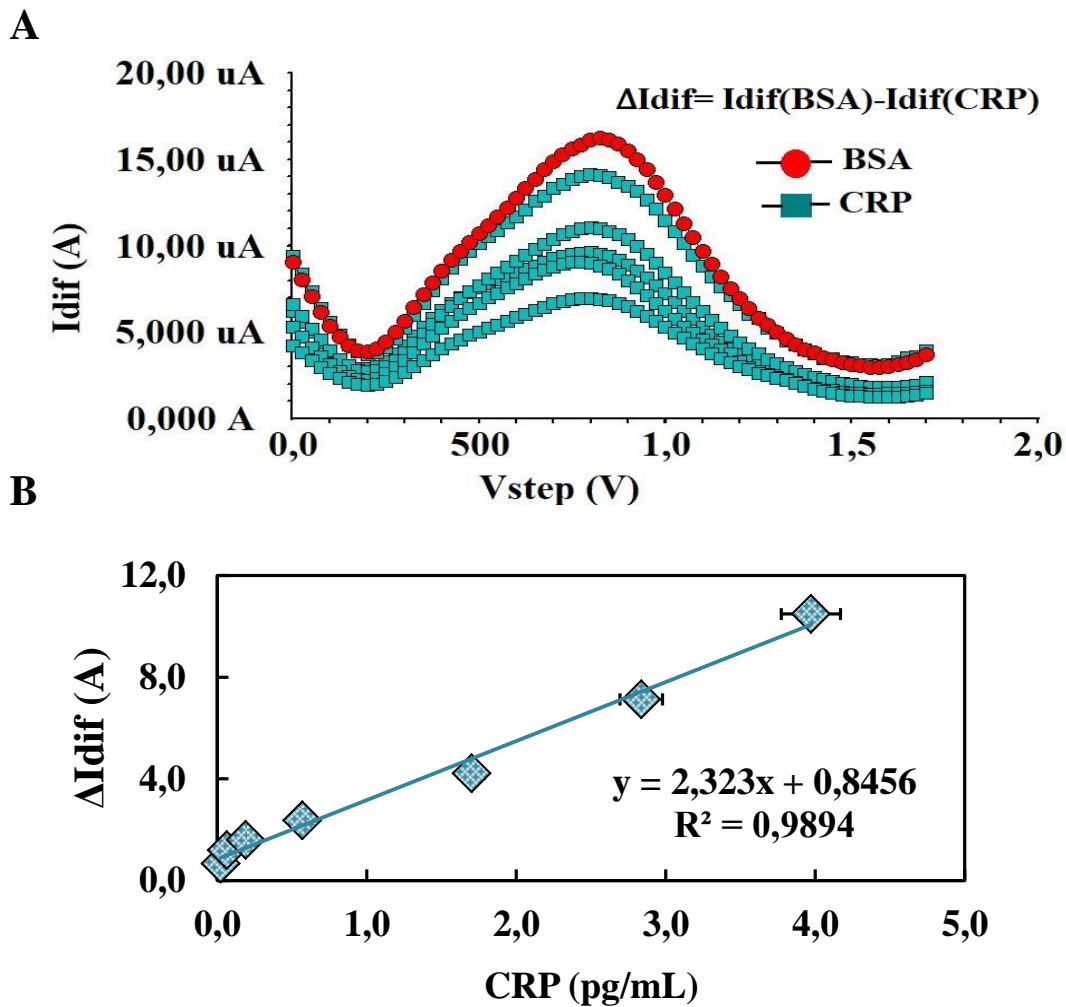
Şekil 4. 22. CRP nöro-biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

Bode grafiğinin değerlendirilmesi neticesinde parametreleri belirlenen SFI analizi non faradiyik prosesle ilerlemiştir (Şekil 4.22). CRP'nin anti-CRP'ye olan afinitesi 3200 ks civarında bir doygunluk noktasına erişmektedir. Antikor/antijen ilişkisi non faradiyik süreçte impedanstaki ve faz açısındaki değişimle takip edilmiştir.

Faradayik EIS'de bir redoks türü dönüşümlü olarak oksitlenip-indirgenir. Bu nedenle, faradaik EIS ortamına redoks-aktif türlerin ve DC koşullarının, tüketilmeyecek şekilde eklenmesini gerektirir. Aksine, nonfaradaik impedans spektroskopisi için ek reaktif gerekmemektedir, bu da non-faradayik çalışmalarını point of care uygulamalarına daha uygun hale getirmektedir. Sabit frekansta non -faradaik bir şemaya dayanan bir biyosensör uygulamaları kapasitif sensörlere dahildir. Bu noktadan değerlendirildiğinde, SFI ile örneklerin analizi umut vaat edicidir.

4.2.3.6. Kare dalga voltametri

Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin CRP'ye verdiği yanıt başka bir elektrokimyasal teknik olan SWV ile de takip edilmiştir. SWVden elde edilen voltamogram (Şekil 4.23.A) incelendiğinde CRP konsantrasyonu arttıkça tepe akımındaki azalma arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir. Kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği ile EIS sonuçlarından elde edilen grafik benzer hassasiyet göstermektedir (Şekil 4.23.B).



Şekil 4. 23. (A) Nöro-biyosensör sisteminin farklı CRP konsantrasyonlarına kare dalga voltametri ile verdiği yanıt, (B) kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği

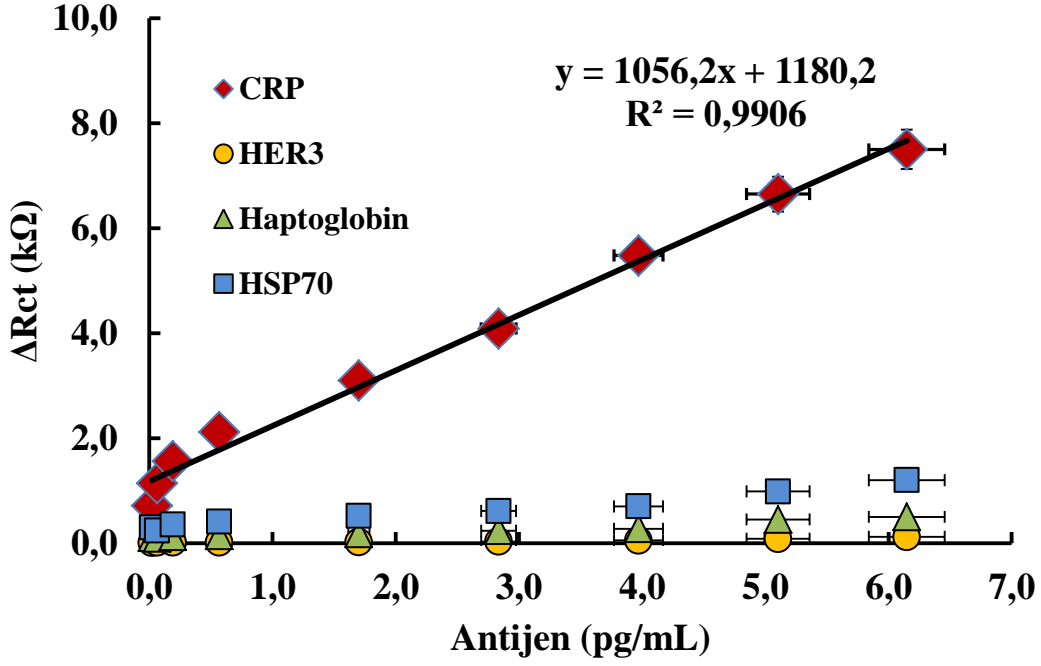
Son yıllarda, kare dalga voltametrisinin (SWV) kullanımı, hassas elektrokimyasal sensörler ve biyosensörlerin üretilmesinde temel olmuştur. Bir sensörün etkinliği, analitiyle

ilgili olarak ne kadar hassas ve seçici olduğu ile doğru orantılıdır. CRP için geliştirilen nöro biyosensör sisteminde de görüldüğü üzere, bu etkinlik, SWV gibi daha hassas bir elektrokimyasal teknik uygulanarak artırılabilir. SWV gibi puls tekniklerinin arkasındaki temel ilke, yük ve faradaik akımların ayrışma oranlarındaki farktır. Yük akımı, bir üstel fonksiyon olarak ayrışarak faradaik akımdan çok daha hızlı bozulurken, faradayik akımın ayrışması zamanın karekökü ile ters orantılıdır. Bu nedenle, her puls'un sonucu olarak, kapasitif akım faradaik akımına kıyasla ihmal edilebilir. Faradayik akımın faradayik olmayan akıma oranının artması, daha yüksek bir saptama sınırının yanı sıra daha düşük bir saptama limitine olanak tanır ve bu nedenle SWV'nin analitik amaçlar için kullanımı oldukça idealdir. SWV bu çalışmada da olduğu gibi yüksek frekansta çalıştırılabilme özelliğinden dolayı da oldukça tercih edilen bir tekniktir. Bu sayede kare dalga kullanılan deneyler hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmekte ve diğer tekniklere kıyasla elektroaktif türler korunabilmektedir. Elektroaktif türlerin kullanımını nispeten azaldığı için de ITO elektrot yüzeyi elektroaktif olmayan ürünlerle daha az engellenmiş olur. SWV'nin bir başka avantajı, arka plan akımına dahil edilen oksijenin indirgenmesinden ötürü, oksijenin analit çözeltisinden çıkarılmasının gerekli olmamasıdır (**Gupta ve ark. 2011; Lee ve ark. 2012; Chen ve Shah 2013**).

4.2.3.7. CRP nöro-biyosensörünün seçiciliği

11-CUTMS ve PAMAM ile dekore edilerek tasarlanmış nöro-biyosensörün hedef CRP'ye karşı seçiciliği, nonspesifik insan protein antijenleri, HER-3, haptoglobin, HSP-70 ile olan nonspesifik etkileşimlerinin aynı konsantrasyon aralığında (21-6148 fg/mL) incelenmesi ile belirlenmiştir.

Şekil 4.24, HER-3, haptoglobin ve HSP-70 ün nöro-biyosensöre spesifik olmayan çok küçük bir katkısı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 24. Nöro-biyosensör sisteminin farklı antijenlere karşı seçiciliği

Bununla birlikte sensör sistemi aralarında en yüksek afiniteyi HSP70'e göstermiştir. Bu durum, HSP70'in CRP'ye olan amino asit kalıntısı benzerliğinden kaynaklanmış olabilir. Nonspesifik etkileşimlerin toplam Rct yanıtına olan bu ihmal edilebilir katkısı, biyosensörün spesifik hedef CRP'ye karşı iyi bir seçiciliği olduğuna işaret etmektedir.

4.2.3.8. CRP nöro-biyosensörünün depo ömrü

11-CUTMS ve PAMAM platformundan oluşan ITO-temelli tek kullanımlık biyosensörün depolama stabilitesi, belirli periyotların sonunda nöro-biyosensörün impedimetrik tepkisinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan biyosensörler + 4 ° C'de muhafaza edilerek her 7 günde bir CRP ölçümü (1,7 pg/mL) gerçekleştirildi. İlk altı hafta boyunca, nöro-biyosensörler başlangıçtaki aktivitelerini neredeyse tamamen korumuştur (% 95.5).

Bir biyosensör cevabının operasyonel stabilitesi, sensör geometrisine, hazırlama yöntemine ve uygulanan reseptör ve transdüserine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Ayrıca, biyosensörün vereceği cevap substrata (CRP) olan dış veya iç difüzyona veya biyolojik tanıma reaksiyonuna büyük ölçüde bağlıdır. Depolama kararlılığına etki eden

önemli parametreler depolama şekli (kuru veya ıslak) atmosfer bileşimi, pH, tampon bileşimi ve katkı maddelerinin mevcudiyetidir (**Bhalla ve ark. 2016**). Her ne kadar geliştirilen nöro-biyosensör laboratuvar ortamında iyi bir depolama stabilitesi gösterse de, endüstriyel ölçekteki depolama stabilitesini araştırmak da elzemdir.

4.2.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik uygulamaları

Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik validasyonu, Namık Kemal Üniversitesi hastanesinden rveom yöntemle toplanan serumlarda CRP analizinin yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. CRP'nin sağlıklı bireylerdeki referans değer aralığı geliştirilen sistemin tayin aralığına göre çok yüksek olduğu için, serumlar öncelikle 10^6 kat seyreltilmiştir. CUTMS-PAMAM biyoalgılama platformu temelli sistemle gerçekleştirilen ölçümlerin sonuçları, hastaneden alınan ve referans teknikle ölçülen sonuçlarla kıyaslanmıştır. (Çizelge 4.7)

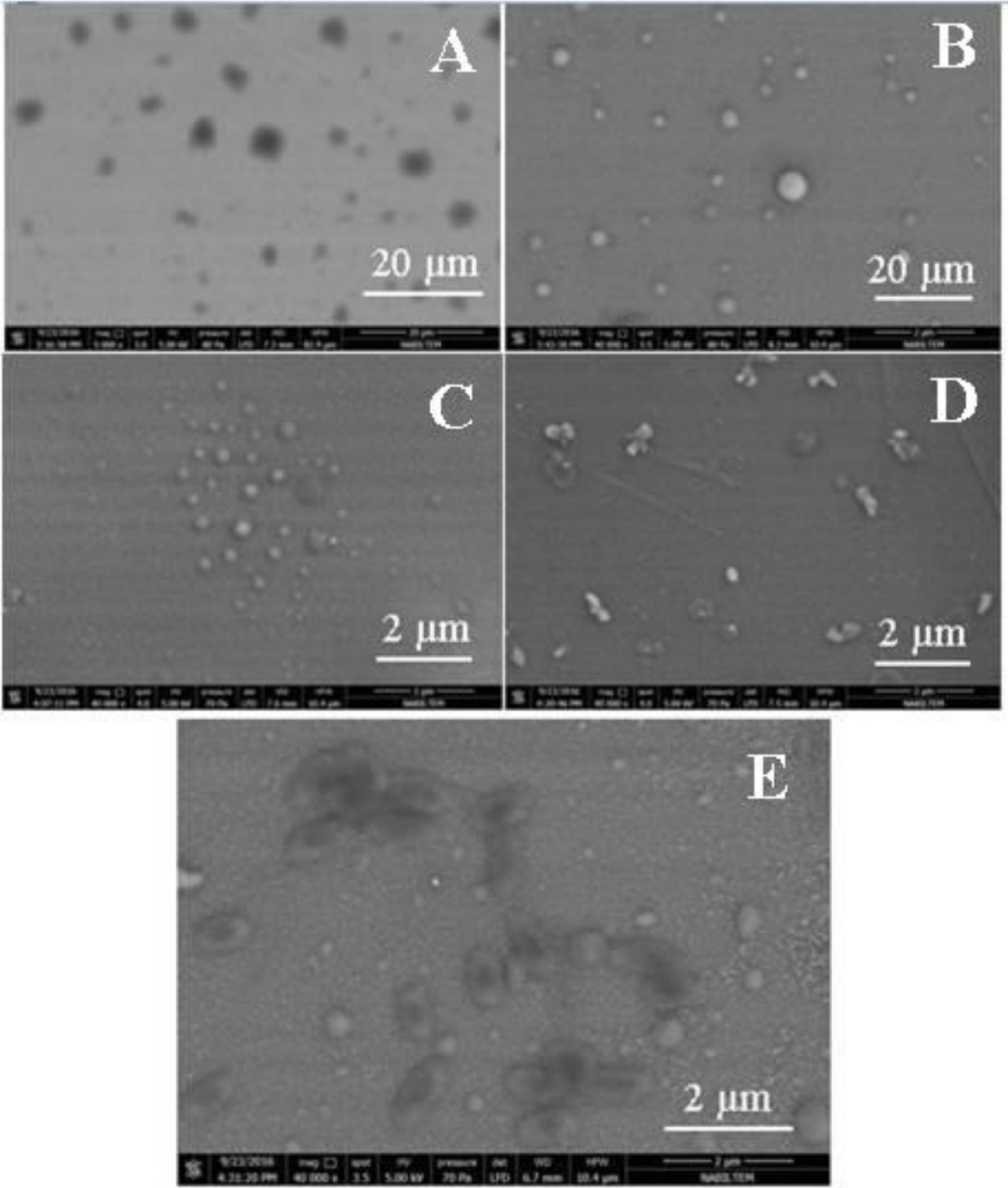
Çizelge 4. 7. CRP Nöro-biyosensör sisteminin serum örneklerinde uygulanabilirlik sonuçları

Örnekler	NKÜ'den alınan sonuçlar (mg/L)	Biyosensör tarafından bulunan (mg/L)	Bağıl Fark	Geri Kazanım (%)
1	0,9	0,83	7,77	92,23
2	0,5	0,61	22	122
3	2,5	2,92	16,8	116,8
4	0,9	1,22	35,5	135,5
5	1,3	1,11	14,61	85,39
6	2,7	2,56	5,18	94,82
7	1,2	1,05	12,5	87,5
8	0,7	0,82	17,14	117,14

Sonuçlar incelendiğinde, geliştirilen bu yeni nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamalar açısından umut vaat ettiği görülmektedir. Ayrıca kullanılan tekniğin kolay hazırlanıyor olması ve maliyetinin oldukça düşük olması klinikte kullanılan pek çok tekniğin üstünde yer almasını sağlamaktadır. Namık Kemal Üniversitesi Hastanesinde CRP tayininde kullanılan teknik türbidimetrikdir ve bu tekniğin yüksek hassasiyetteki cihazları pahalıdır. Ayrıca, geliştirilen sistemde kullanılan elektrotların tek kullanımlık olması; hastane haricindeki (ev, iş, sağlık ocakları vs.) CRP analizlerine de olanak sağlayacaktır.

4.2.3.10. SEM görüntüleri

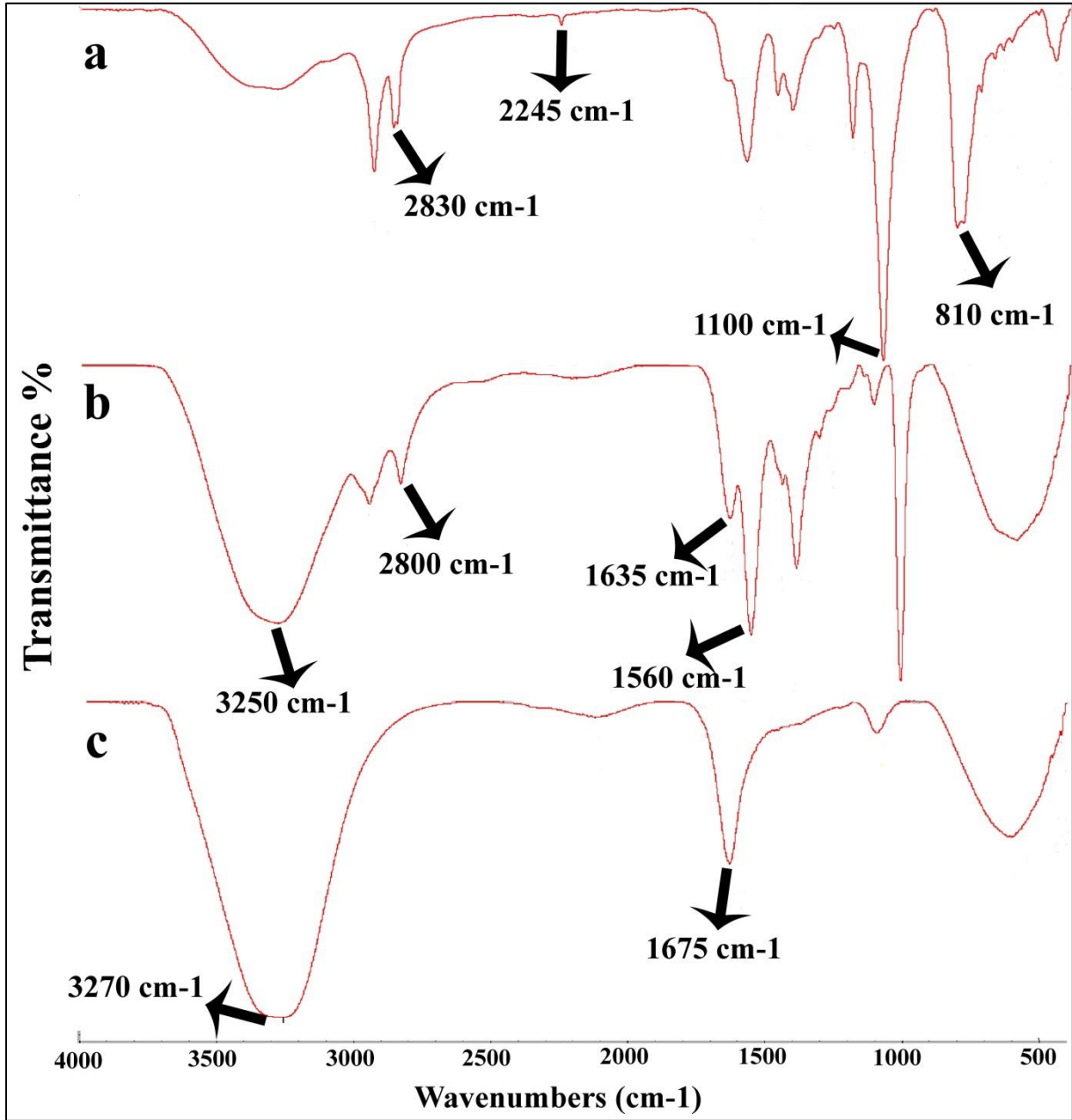
Biyosensör yüzeyindeki kimyasal ve fiziksel değişiklikler, taramalı elektron mikroskobu ile adım adım izlenebilir. Bu değişikliklerin izlenmesi, biyosensörün hareketi hakkında üstün bilgi sağlar. İnşa edilen biyosensör için SEM görüntüleri Şekil 4.25 'de gösterilmiştir. 11-CUTMS'in SAM ile modifikasyondan sonra yüzeydeki morfolojik değişim Şekil 4.25.A' da gösterilmiştir. Şekil 4.25.B, PAMAM modifikasyonundan sonraki görüntüyü göstermektedir. PAMAM molekülleri, mikron altı boyutlarıyla küreler halinde görünür. Şekil 4.25.C, PAMAM moleküllerine kovalent olarak bağlanan anti-CRP moleküllerinin küresel yapısını göstermektedir. Yüzeydeki aktif grupları BSA ile bloke ettikten sonra, yüzeyin morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.25.D'de gösterilmektedir. CRP ile etkileştikten sonra biyosensör yüzeyinin morfolojisi bir kez daha değişmiştir. Şekil 4.25.E'de gösterilen fasulye benzeri yapılar, PAMAM modifiye edilmiş elektrot yüzeyi üzerinde anti-CRP ve CRP'nin etkileşimine bağlanabilir.



Şekil 4. 25. CRP Nöro-biyosensörlerinin tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO/11-CUTMS, (B) ITO/11-CUTMS/PAMAM, (C) ITO/11-CUTMS/PAMAM/anti-CRP, (D) ITO/11-CUTMS/PAMAM/anti-CRP/BSA, (E) ITO/11-CUTMS/PAMAM/anti-CRP/BSA/CRP

4.2.3.11. FTIR sonuçları

Nöro-biyosensör sistemi geliştirilirken yüzeyde oluşan ya da kaybolan bağlar FTIR ile takip edilmiştir. Şekil a 11-CUTMS'ye ait FTIR spektrumunu, b; PAMAM dekorasyonunu c ise anti-CRP immobilizasyonu sonrası pik değişimlerini göstermektedir



Şekil 4. 26. CRP Nöro-biyosensörüne ait FTIR spekturumları (A) 11-CUTMS, (B) PAMAM, (C) Anti-CRP

Şekil 4.26.A' daki 2830 cm-1deki pik, O-CH₃'e ait spesifik piktir. 2245 cm-1deki zayıf pik CN grubunun bağına ait piktir. 1100 cm-1deki pik Si-O-Si bağına gösterme ihtimali çok yüksektir. 810 cm-1deki pik sadece spektrumda a'da vardır ve Si-CH₃ bağına ait piktir. Tüm bu analizler birlikte değerlendirildiğinde spektrumun a'nın 11-CUTMS yapısını destekler nitelikte olduğunu söylemek mümkündür.

Şekil 4.26.B' de 3250 cm-1deki yayvan pik birincil aminlerin N-H gerilme titreşimine ait piktir, bununla birlikte 1560 cm-1deki pik ise N-H bağına ait eğilim pikidir. 2800 cm-1deki küçük pik C-H bağına gerilme titreşimine aittir. 1635 cm-1de görülen spesifik pik, PAMAM'ın 11-CUTMS ile etiletiğini gösteren imin karakteristik pikidir.

Şekil 4.26.C' de en net değişim 1560 cm-1deki pikin kaybolup yerine 1675 cm-1deki keskin pikin gelmesidir ki bu anti-CRP'nin yüzeye immobilizasyonunu destekler ölçüdedir.

4.2.3.12. Tasarlanan CRP Nöro-biyosensörlerinin literatürdeki yeri

Bu tez çalışmasında, CRP tayinine yönelik 2 farklı biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Çizelge 4.8 son 5 yıl içinde yapılan elektrokimyasal temelli CRP biyosensörlerinin tasarım stratejilerini ve analitik karakteristiklerini göstermektedir. CPTMS ile geliştirilen CRP biyosensörünün etkileyici LOD değerine diğer çalışmalar ulaşamamaktadır. Ayrıca literatürde şu ana dek CPTMS ile yapılmış çalışmaya rastlamak mümkün değildir. Bu bakımdan CRP tayinine yönelik geliştirilen CPTMS temelli sistem oldukça pratik, kolay hazırlanabilen, maliyeti düşük, hassasiyeti yüksek ve yenilikçidir. 11-CUTMS de oldukça yeni ve daha önce biyosensör stratejilerinde başvurulmamış bir materyaldir. Bu kullanışlı organosilan, PAMAM ile mükemmel bir uyum sergilerek tayin aralığını oldukça geniş bir aralığa çekmiştir. Çizelgedeki diğer çalışmalara nispeten LOD değeri dolayısıyla hassasiyeti oldukça yüksektir. Tüm bunların ötesinde CRP tayini için geliştirilen her iki biyosensör sistemi de klinik örneklerde mükemmel sonuçlar göstererek pratik uygulama için aday olduğunun altını çizmiştir.

Çizelge 4. 8. Literatürde bildirilen çeşitli CRP biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması

Elektrot konfigürasyonu	İmmobilizasyon yöntemi	Ölçüm yöntemi	Tayın ARALIĞI	LOD	Referans
Altın elektrot düzeyinde HS-C11-(EG)3-OCH ₂ -COOH ile SAMs	EDC-NHS kimyası	EIS ve CV	0,5-50 Nm	176±18 pM	(Bryan, Luo ve ark. 2013)
Karbon nanofiber temelli	PMMA	EIS ve CV	0.05–5 µg/ml	11 ng/ml	(Gupta, Periyakaruppan ve ark. 2014)
Rgo-AuNP temelli ITO elektrot	MPA	EIS ve CV	1 ng/mL-1 µg/mL	0,08 ng/mL	(Yagati, Pyun ve ark. 2016)
Rgo modifiye SPCE	PyNHS	SFI	10 ng/mL-10 µg/mL	0,1 ng/MI	(Singal ve Kotnala 2017)
Ni ile modifiye edilmiş Au nanopartikül	Sistein SAM	EIS ve CV	$2.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} - 1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$3.56 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	(Liu, Li ve ark. 2014)
Au üzerine tutturulmuş DNA	DNA adsorbsiyonu	EIS ve CV	3.125–25 mg/L		(Songjaroen, Feeny ve ark. 2016)
SPE-altın nanopartikül	Adsorbsiyon	CV	0.047–23.6 µg mL ⁻¹	17 ng mL ⁻¹	(Thangamuthu, Santschi ve ark. 2018)
ITO-PET elektrot	CPTMS ile SAM	EIS ve CV	3,25-208 fg/mL	0,455 fg/mL	
ITO-PET elektrot	CUTMS ile SAM ve PAMAM	EIS ve CV	21-6148 fg/mL	0,34 fg/mL	

4.3. SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sistemi

4.3.1. Nöro-biyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı

Parkinson hastalığı biyobelirteçi olan synuclein alfa (SYN alfa) tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminde altın nanopartikül ve poli glutamik asit polimerinden faydalanılmıştır. ITO-PET elektrotlar belirtilen teknikle temizlikten sonra, temiz elektrot yüzeyinde yine belirtilen teknikle aktif –OH grupları oluşturulmuştur. Akabinde, Hidroksillenen ITO elektrotlar yüzeyinde elektrokimyasal teknikle altın nanopartikül biriktirilmiştir. Elektrokimyasal yaklaşım, doğrudan doğruya bir substrat üzerindeki AuNP'lerin tek adımlı ve faydalı bir şekilde üretilmesi için iyi bir alternatiftir. Bu yöntemle, biriktirme potansiyelini, konsantrasyonunu, tampon çözeltisini ve biriktirme süresini değiştirerek, AuNP'lerin parçacık morfolojisi ve dağılımını kontrol etmek nispeten kolaydır. Ayrıca elektrokimyasal olarak nanopartikül biriktirme diğer tekniklere kıyasla ucuz, hızlı ve kolay uygulanabilir (Wang ve ark. 2008).

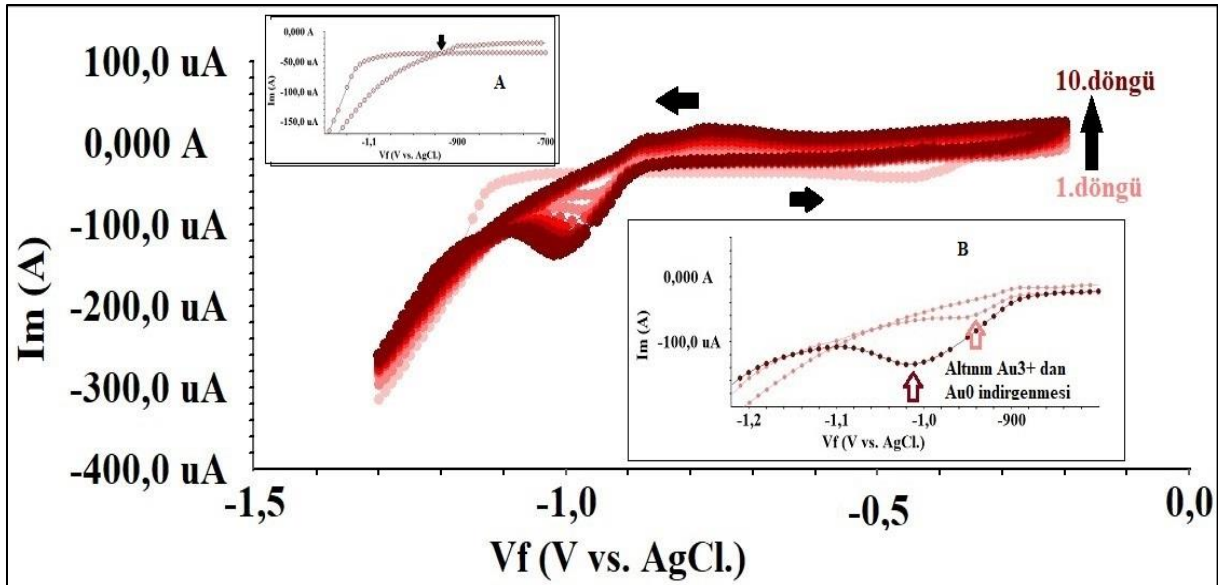
Bununla birlikte altın nanopartikülün ITO yüzeyinde doğrudan biriktirilmesiyle ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

ITO elektrotlara AuNP'nin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi için döngüsel voltametriden (CV) yararlanıldı. Bu yöntemi seçmenin nedenlerini şöyle sıralayabiliriz: Bu yöntem, reaktant veya üründen herhangi birindeki adsorpsiyon olayının ortaya çıkması ve Au (III) indirgenme mekanizmasında ara maddelerin mevcudiyeti hakkında bilgi verir. Kütle transfer olgusunun heterojen elektron transferine karşı nispi önemini ayırt etmemizi sağlar. Ayrıca, döngüsel voltammogramların şekli büyüme süreçlerinin karakteristiğidir. Son olarak, CV, AuNP elektrodepozisyonu (biriktirilmesi) için en uygun koşulların belirlenmesini sağlar (Wang ve ark. 2009).

Nano tanecikli parçacıkların bir substrat üzerine biriktirilmesinin iki temel işlemi içerdiği iyi bilinmektedir: çekirdeklenme ve parçacıkların büyümesi. Biriktirme işlemi, nanoparçacık büyüklüğünün büyümesinin sıkı kontrolünü sağlamak için çok hızlı gerçekleşir dolayısıyla nanoparçacık boyutunun elektrodepozisyonu onlarca nanometre ile yüzlerce nanometre arasında değişebilir.

Şekil 4.27, elektrokimyasal biriktirme işlemi ile Au nanopartiküllerin elektrokimyasal sentezi sırasında kaydedilen döngüsel voltammogramları açıkça göstermektedir.

İleri ve geri döngülerinin akımlarının geçit yapması (Şekil 4.27.A) yüzey koşullarının önemini vurgulamaktadır. Elektrot yüzeyi iyi temizlenmediğinde, sistematik olarak bu akım geçişi gözlenmemiştir. Tam tersine tatmin edici bir elektrot temizliğinde bu akım geçitinin görüldüğü literatürce de rapor edilmiştir (Hezard ve ark. 2012). Başlangıçta, Au'nun indirgenmesi, Ag / AgCl referans elektroduna karşı yaklaşık -940 mV'de meydana gelmiştir, ancak tekrarlayan tarama döngüleri ile birlikte indirgenme potansiyeli, birikim üzerindeki çekirdeklenmeye bağlı olarak, -1,010 V'a (Şekil 4.27.B) kaymıştır. Bu kayma yüzeyde altın nanopartikülün biriktiğinin göstergesidir.



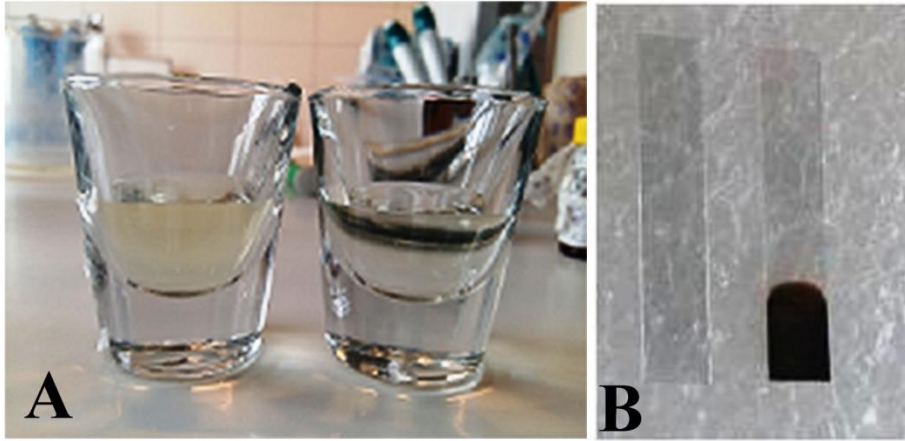
Şekil 4. 27. ITO elektrot yüzeyine altın nanopartikül kaplanmasına ait döngüsel voltammogramlar (A) 1. döngü (B) ilerleyen döngü sayısı ile birlikte kayan indirgenme potansiyeli

Dikkat çekilmesi gereken bir diğer nokta $AuCl_4^-$ katodik pik akımının azaldığıdır. Bu varyasyon esas olarak difüzyon tabakasındaki $AuCl_4^-$ tüketimine bağlıdır.

Literatür incelendiğinde ITO yüzeyinde altın nanopartikülün biriktirme potansiyelinin önemine vurgu yapıldığı görülmektedir. -0,2 - (-0,4 V) dan daha pozitif potansiyellerin uygulanması başarılı bir altın nanopartikül oluşumuna mani olmaktadır. Bu durum, uygulanan

potansiyelin çekirdekleşme için yeterli olmadığı fakat partikül büyümesi için yeterli olabileceği yönünde açıklanabilir (Wang ve ark. 2009).

Şekil 4.28 altın nanopartikül için kullanılan altın çözeltisinin (pH 7,0 fosfat tamponu içinde) kaplama öncesi ve sonrası durumunu göstermektedir. Ayrıca şekil 4.28B temiz ITO elektrodun altın nanopartikül biriktirilmeden önceki durumunu ve sonrasını göstermektedir.



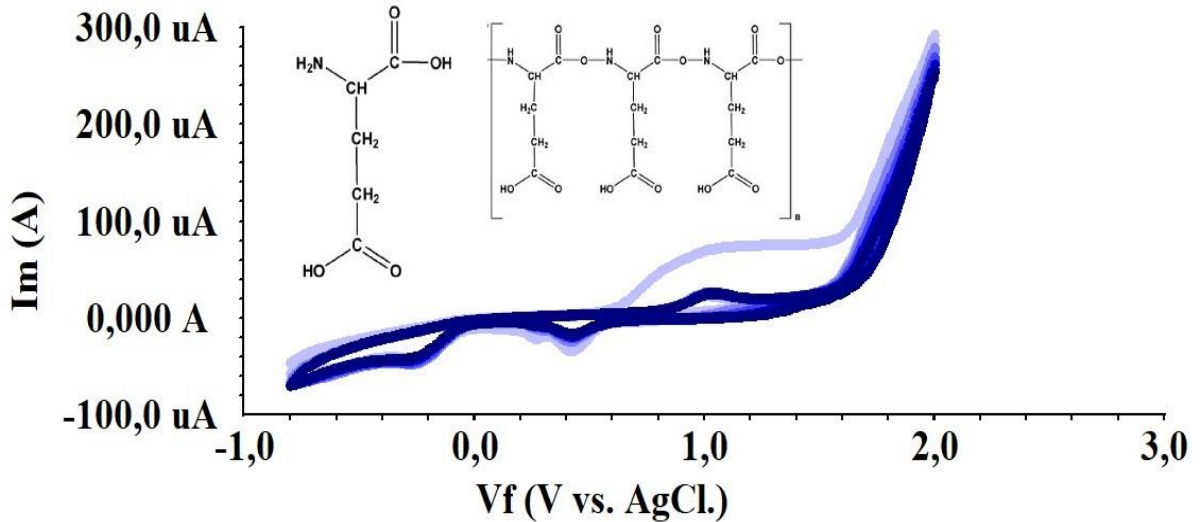
Şekil 4. 28. (A) altın kaplamada kullanılan çözeltinin biriktirme öncesi ve sonrası durumu (B) yalın ITO ve altın nanopartikül kaplanmış ITO

Altın nanopartikül kaplanmış ITO elektrotlar, yıkanıp kurutulduktan sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Daha sonra elektrotlar, elektropolimerizasyon işlemi için glutamik asit monomer çözeltisi (Ph 7,50 fosfat tamponu içinde hazırlanmış) içine daldırılarak, CV ile -0,8 V-(2,0 V) tarama aralığında polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Glutamik asit, poli-glutamik asit (PGA) oluşturmak için elektrot yüzeyinde kolayca elektro-polimerize edilebilen bir aminoasittir. PGA, tekrarlayan glutamat birimleri ve α -amino ve δ -karboksilik asit fonksiyonel gruplarını bağlayarak elektrokimyasal uygulamada üstün özellik gösteren protonlanmış karboksilik grupları (pKa = 4,45) içerir (Liu ve ark. 2011). Ayrıca, sentetik poliaminoasit film modifiye edilmiş elektrotlar redoks reaksiyonlarının kinetiğini incelemek için özellikle avantajlıdır.

Şekil 4.29' daki döngüsel voltamogramlar, poli glutamik asite ait elektrokimyasal olarak aktif bir kaplamanın büyümesini göstermektedir. -0,8 ila 2,0V potansiyel aralığındaki birinci döngüde, glutamik asit, oluşan serbest radikalle bağlantılı olarak 1,20 V civarında keskin bir tepe noktası vermiştir. İkinci döngüde, keskin zirve kaybolup yerini 1,050 V civarında yeni bir noktaya bırakmıştır. Bu yeni zirve, döngü sayısı ile arttırılmış polimerin tepe noktasına aittir. Elektro-polimerizasyon, serbest radikalın oksidasyon potansiyelinden daha pozitif olan 1,5 V değerinin üzerine çıkıldığında gözlemlenmiştir. Yani bu durum serbest radikal oluşumu ile başlatılan polimerizasyon işlemidir. Anodik potansiyel arttırıldığında, elektropolimerleşmenin hızlanmakla birlikte arka plan akımının da arttığı görülmüştür. Benzer şekilde, katodik potansiyelin azaltılması da -0,8V'ye ulaşınca kadar reaksiyonu artırabilir. Böylece elektrokimyasal potansiyel aralığı -0.8'den 2.0 V'a kadar uygulanmıştır. Dokuzuncu döngüden sonra, tepe akımının artışı neredeyse sabit ve daha kararlı hale gelmiştir; bu durum polimerizasyonun büyümesinin doyma seviyesine ulaştığını düşündürmektedir.

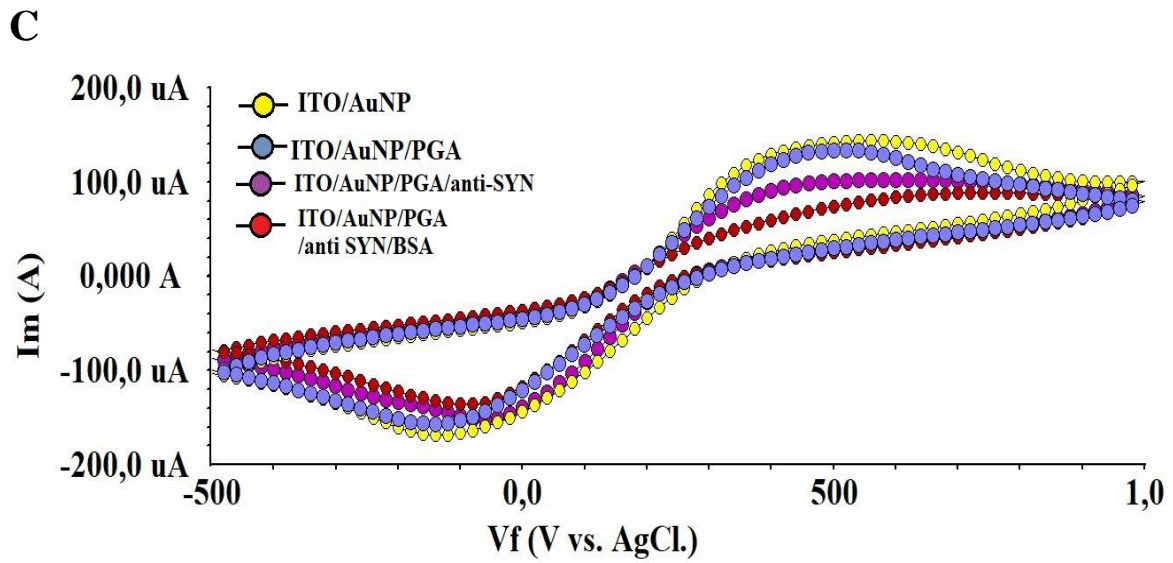
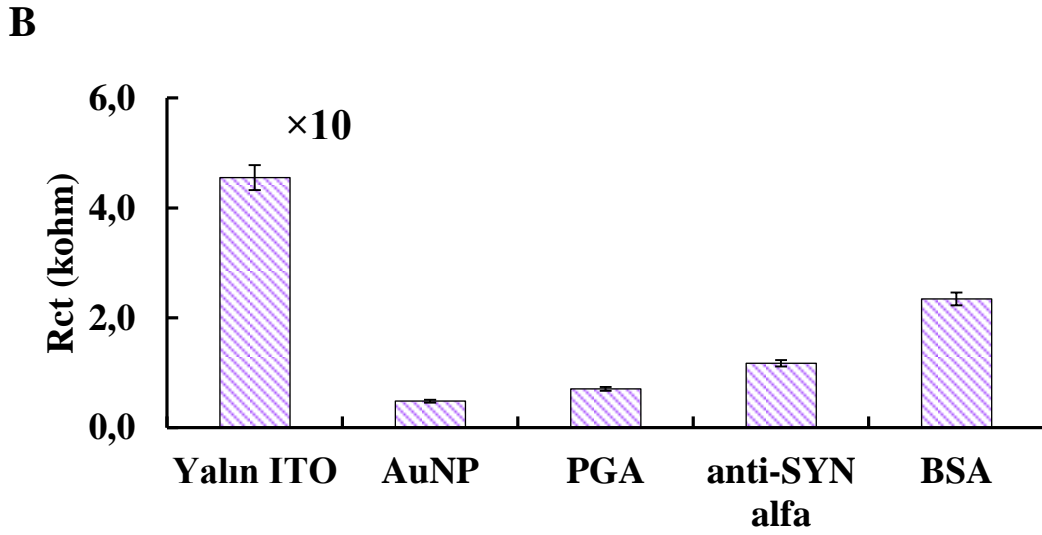
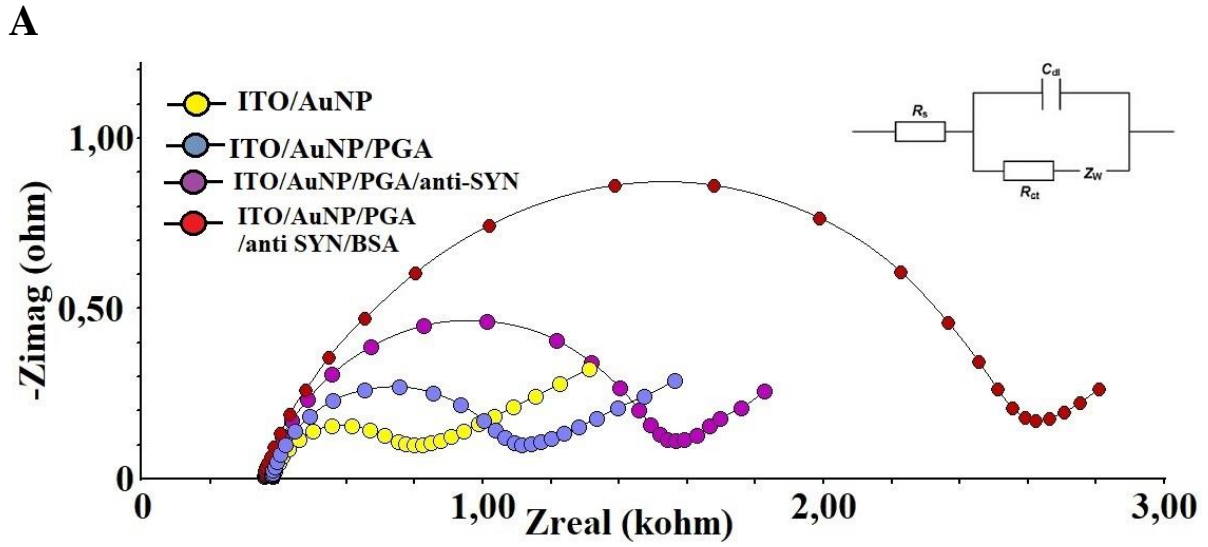
Poliglutamik asit, glutamik asit üzerindeki bir karboksilat grubu ve amino grubu arasındaki etkileşimlere bağlı olarak kondense olur. Bu yapı, karboksilat kalıntılarını AuNP-ITO film yüzeyi üzerinde serbest bırakır.



Şekil 4. 29. Altın nanopartikül katkılı ITO elektrot yüzeyinde glutamik asidin elektropolimerizasyonuna ait döngüsel voltamogramlar

Poliglutamik asit modifiyeli, altın nanopartikül katkılı ITO tek kullanımlık elektrotlar yıkanıp, kurutulduktan sonra EDC-NHS çözeltisi ile muamele edilmiştir. EDC-NHS kimyası fonksiyonel karboksil terminali ile –amin grupları arasında etkileşimi sağlayan vazgeçilmez bir çapraz bağlayıcıdır. PGA'daki serbest karboksilat grupları, negatif yüklü elektrot ve pozitif yüklü SYN alfa molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimi güçlendirir, PGA-AuNP modifiyeli ITO elektrotların SYN alfaya karşı gelişmiş hassasiyet ve seçiciliğine yol açar. EDC-NHS muamelesinden sonra elektrotlar vakit kaybetmeden anti-SYN alfa çözeltisine daldırılarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İmmobilizasyondan sonra fonksiyonel terminaller ve non spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla BSA bloklama ajanı olarak kullanılmıştır.

SYN alfa tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün inşasına ait adımların EIS'dan alınan impedans spektralleri, her adıma ait yük transfer değişimleri ve CV'den alınan voltamogramları Şekil 4.30' da gösterilmiştir.



Şekil 4. 30. SYN-alfa Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) EIS verileri, (B) her adıma ait Rct değerleri (C) döngüsel voltametri verileri

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde yük transfer direnci (R_{ct}) iki etkinin bir tezahürüdür: (1) elektrotta oksidasyon veya indirgenme olayı ile ilişkili enerji potansiyeli (yani aşırı kapasiteyle) (2) elektrotta ulaşan redoks türlerinin enerji bariyeri ile birlikte elektrostatik itme veya sterik bir engel nedeniyle (**Daniels ve Pourmve 2007**). EIS’da bir diğer önemli element Warburg impedanstır. Sadece faradaik EIS'deki fiziksel önemi olan Warburg impedansı (Z_w), elektroaktif türlerin elektrodta difüzyonundan kaynaklanan gecikmeyi temsil eder. Warburg impedansının karakteristiğinin, düşük frekanslarda 45° eğime sahip düz bir çizgi olduğu anlaşılmaktadır. Bu, düşük frekanslı difüzyon kontrolüne işaret etmektedir çünkü reaktiflerin elektrot yüzeyine difüzyonu, sadece düşük frekanslarda olabilen yavaş ilerlemeli bir işlemdir. Bununla birlikte, daha yüksek frekanslarda, reaktiflerin dağılması için yeterli zamanı yoktur. Şekil 4.30.A impedans spektrasından görüleceği üzere altın nanopartikül ve akabinde poliglutamik asit oluşumunda Warburg impedansın 45 derecelik eğimini görmek mümkündür, ki bu adımın difüzyon kontrollü olduğunu gösterir.

Yük transfer değişimleri incelendiğinde (Şekil 4.30.B) altın nanopartikülün yalnız ITO elektrotlara bariz bir iletkenlik kazandırdığı görülmektedir, altın nanopartikül katkılı yüzeyde glutamik asit polimeri oluşturulduğunda elektrodun iletken davranışının devam ettiği görülmektedir. Glutamik asit polimerinin karboksilat gruplarıyla kovalent etkileşen anti-SYN alfa’nın amino grupları yüzeyde bariyer oluşturarak impedansın artmasına sebep olmuştur. BSA’nın bloklama etkisi beklenilidği üzere impedimetrik sinyalin artması ile karakterizedir.

En yaygın olarak kullanılan voltametrik teknikler, elektrottan çözeltiye uygulanan potansiyelin sürekli olarak değiştirilmesine dayanır ve sonuçta ortaya çıkan akımın ölçümü ile birleşir. Döngüsel voltametri bir çözeltide yer alan redoks reaksiyonlarının yapısını belirlemek için kullanılır. Bu strateji, puls teknikleri kadar hassas olmamasına rağmen, bir analitin izinin belirlenmesinin ötesinde bir çok kullanım alanına sahiptir. CV çoğunlukla, oksidasyon / indirgenme mekanizmaları, biçimsel potansiyellerin belirlenmesi, elektron transferi ve elektron transfer kinetiği gibi kritik verilerin elde edilmesi için bir araç olarak kullanılmaktadır (**Cannes ve ark. 2003**). Dolayısıyla elektron transfer kinetiğine dayanan geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin adım adım oluşturulması CV ile de takip edilmiştir. Nöro biyosensörün dizayn adımlarına ait Döngüsel voltamogramlar (Şekil 4.30.C) gösterilmiştir. Ferri/ferro probunun döngüsel voltametrinde kullanılması, elektrot yüzeyindeki filmlerin elektrokimyasal özelliklerini test etmek adına oldukça kıymetlidir. Böylece,

oluşturulan AuNPler ve substrat arasındaki elektronik iletişim hakkında bilgi sağlanabilmiştir. Anodik ve katodik dalgalar arasındaki pik potansiyel ayrımı şu eşitliğe göre hesaplanmıştır:

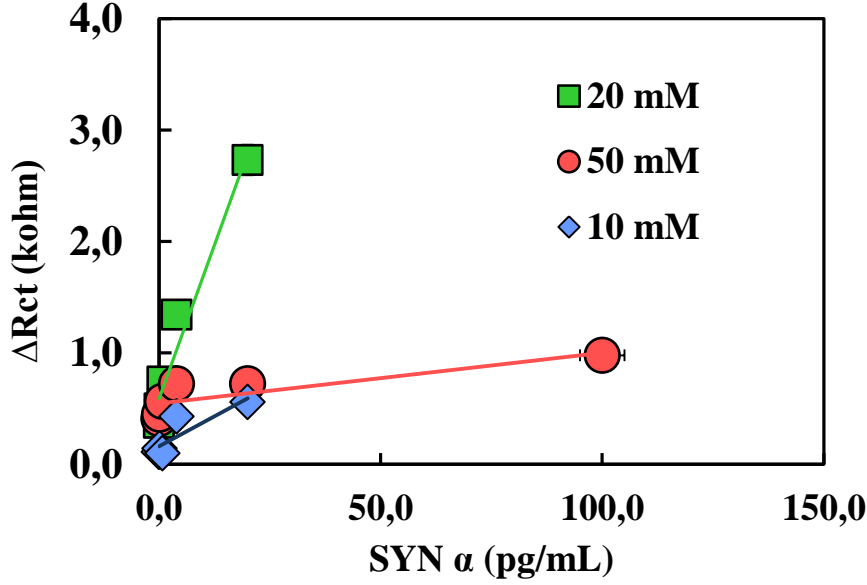
$$\Delta E_p = (E_{pc} - E_{pa}) \quad (4.3)$$

Bu eşitliğe göre, 100 mV/s tarama hızında OH-lanmış yalın ITO elektrodun ΔE_p değeri 0,45 V iken altın nanopartikül biriktirildikten sonra ΔE_p değeri 0,36 V'a düşmüştür. Elektron aktarım hızı ile ters orantılı olan pik potansiyeli ayrımı, elektrotun iletkenliğinin elektrokimyasal değerlendirmesi için kullanılır (**Harris ve Bruening 2000**). Bu düşüş ITO yüzeyinde elektro kimyasal olarak biriktirilmiş olan AuNP'lerin elektrotun iletkenliğini büyük ölçüde arttırdığını göstermektedir. Altın nanopartikül ile modifiye edilen ITO elektrotlar Poliglutamik asit polimeriyle kaplandıktan sonra pik akım ayrımının 0,31 V'a düştüğü görülmüştür. ΔE_p değerleri AuNP ve PGA'nın Fe (CN) 6 3- / 4- elektron transferini arttırmak ve tüm yükseltgenme-indirgenme sürecini hızlandırmak için iletken köprüler sağladığını göstermektedir.

4.3.2. SYN alfa nörobiyosensörünün optimizasyon parametreleri

4.3.2.1. Optimum glutamik asit (monomer) konsantrasyonu

Elektropolimerizasyon aşamasının etkinliği glutamik asit monomerinin konsantrasyonun optimize edilmesiyle artırılmıştır. Bunun için farklı monomer konsantrasyonlarında gerçekleştirilen elektropolimerizasyon işlemi haricinde diğer parametreler sabit tutularak belirli aralıktaki SYN konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri (Şekil 4.31) ile takip edilmiştir.



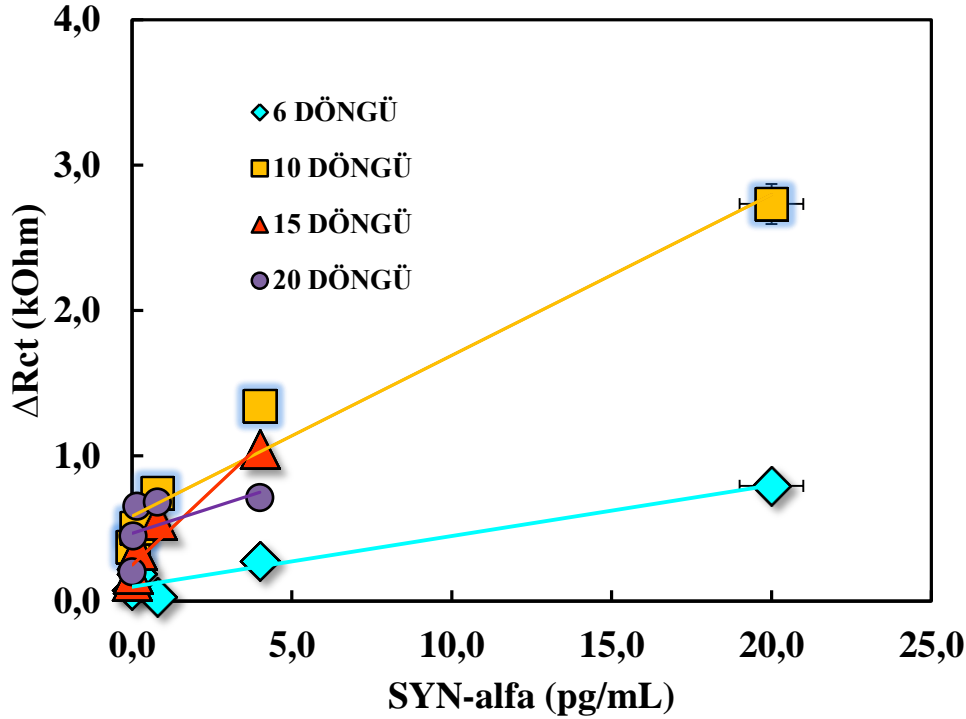
Şekil 4. 31. Farklı monomer konsantrasyonlarının Nöro-biyosensör sisteminin yanıtına etkisi

Glutamik asit konsantrasyonu, biyoalgılama tabakası tarafından SYN alfanın tanınmasını etkileyen önemli bir faktördür. Şekil 4.31' de görüldüğü gibi, 50 mM'ye ulaşıncaya dek yük transfer direnci kademeli olarak artar. Bununla birlikte, glutamik asit konsantrasyonu 50 mM ulaştığında yük transfer kinetiği ciddi bir şekilde düşmüştür bu durumu redoks probunun yüzeyle iletişimini engelleyen PGA kalın filmine atfetmek mümkündür. Bununla birlikte 10 mM glutamik asit konsantrasyonu ile hazırlanan polimer 4 pg/mL SYN alfa konsantrasyonu ile doygunluğa erişmiş ve ileri konsantrasyonları algılanmasında zayıf kalmıştır. 20 mM glutamik asit konsantrasyonu sahip olduğu yüksek yük transferi ve nispeten yüksek belirleme katsayısı ile (R^2 : 0,9555) ileri aşamalar için optimize edilmiştir.

4.3.2.2. Optimum elektropolimerizasyon döngü sayısı

Altın nanopartikül katkılı ITO elektrotlar yüzeyinde poliglutamik asit polimerinin yoğunluğu kullanılan monomer konsantrasyonunun yanı sıra döngü sayısından da etkilenir. Bu etki, yüzeyin morfolojisini değiştirerek SYN alfanın algılanmasında ve tayin sınırının belirlenmesinde kritik rol oynar. Farklı döngü sayılarında elektropolimerizasyon işlemi yapıp diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki SYN alfa

konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.32).



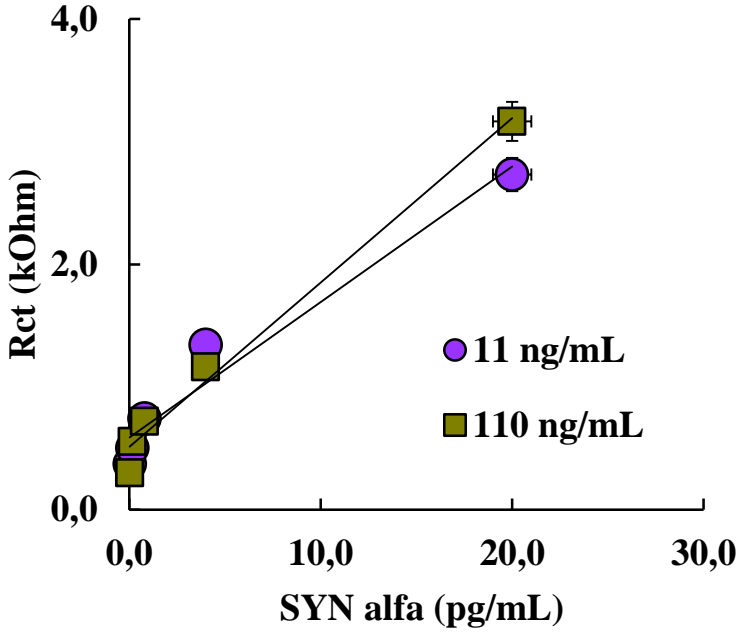
Şekil 4. 32. Farklı döngü sayılarıyla gerçekleştirilen elektropolimerizasyon işlemlerinin nöro-biyosensör sistemi yanıtına etkisi

Kalibrasyon eğrileri incelendiğinde döngü sayısı arttıkça yüzeyde daha fazla PGA filmi oluşturulmasından ötürü elektron transfer direncinin arttığı bununla birlikte döngü sayısı 20'ye ulaştığında ise fazlaca kalınlaşan PGA filmin elektron transfer prosesine mani olduğu düşünülmektedir. 20 döngü sayısı ile gerçekleştirilen elektropolimerize yüzey ileri SYN alfa konsantrasyonlarının belirlenmesinde zayıf kalmakta, 10 döngü sayısı nispeten yüksek belirleme katsayısına ($R^2: 0,9557$) sahip olmaktadır. Bu bilgiler ışığında, ileri çalışmalara glutamik asitin 10 döngü sayısı ile polimerleştirilmesiyle devam edilmiştir.

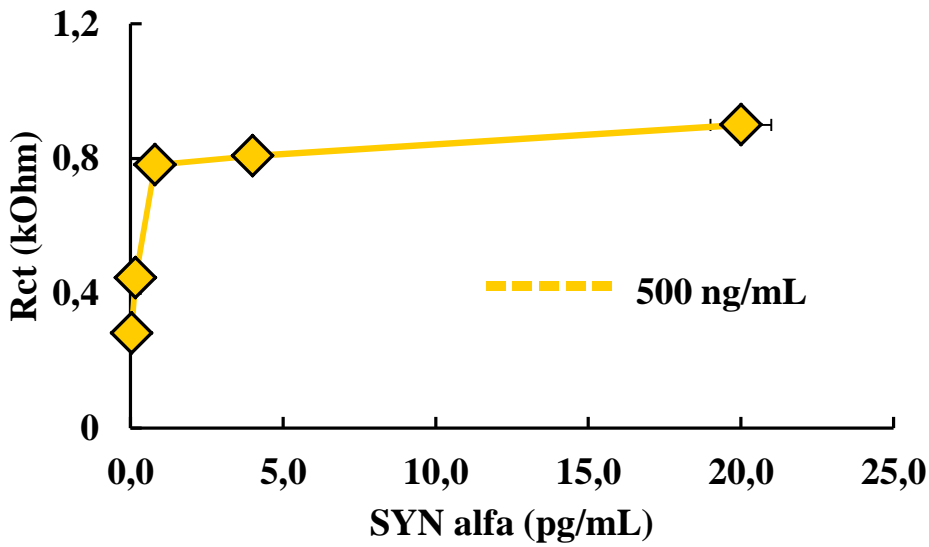
4.3.2.3. Optimum anti-SYN alfa konsantrasyonu

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında, anti-SYN alfa konsantrasyonunun altın nanopartikül katkılı- poli glutamik asit modifiyeli biyoalgılama sistemi cevabı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, oda sıcaklığında 60 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda anti-SYN alfa (11 ng / mL, 110 ng / mL ve 500 ng / mL) ile nöro-

biyosensörler hazırlandı. Anti-SYN alfa konsantrasyonları farklılandırılıp diğer parametreleri sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki SYN alfa konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.33-34).



Şekil 4. 33. Farklı anti-SYN-alfa konsantrasyonlarıyla hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin kalibrasyon grafikleri



Şekil 4. 34. 500 ng/mL anti-SYN-alfa ile hazırlanan Nöro-biyosensörün doygunluk eğrisi

Düşük anti-SYN alfa konsantrasyonunda (11 ng/mL) nispeten düşük yük transfer direncine ve belirleme katsayısına ($R^2: 0,9555$) sahip olan sistemin bu durumu, anti-SYN alfanın nispeten küçük bir protein (12 kDa) olması ile açıklanabilir. Bu durum göz önüne alınarak nöro-biyosensörler yüksek anti-SYN alfa antikoları ile hazırlanmıştır. 500 ng/mL anti-SYN alfa'nın oluşturduğu yüksek sterik engelden ötürü düşük konsantrasyonlardaki SYN alfa ile hızlıca doyduğu görülmektedir. Bununla birlikte 110 ng/mL anti-SYN alfa çözeltisi ile hazırlanan nöro-biyosensör sistemi yüksek belirleme katsayısına sahiptir ($R2:0,9866$).

4.3.3. SYN alfa nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri

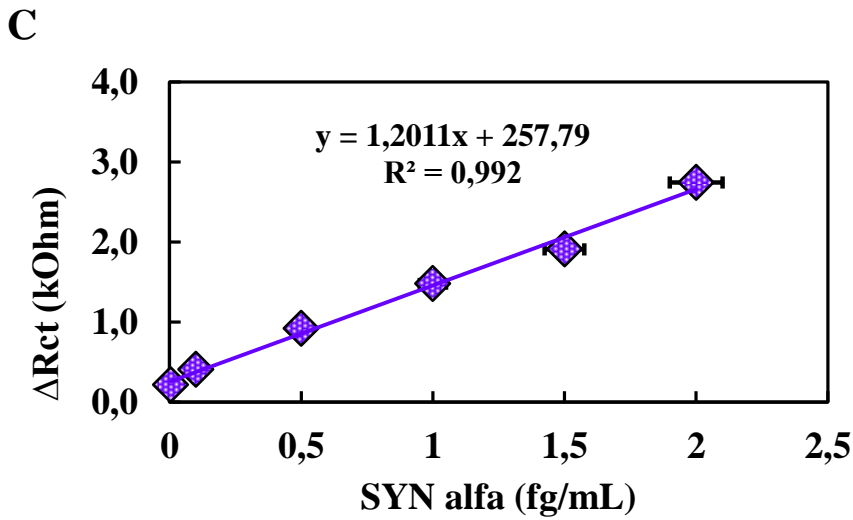
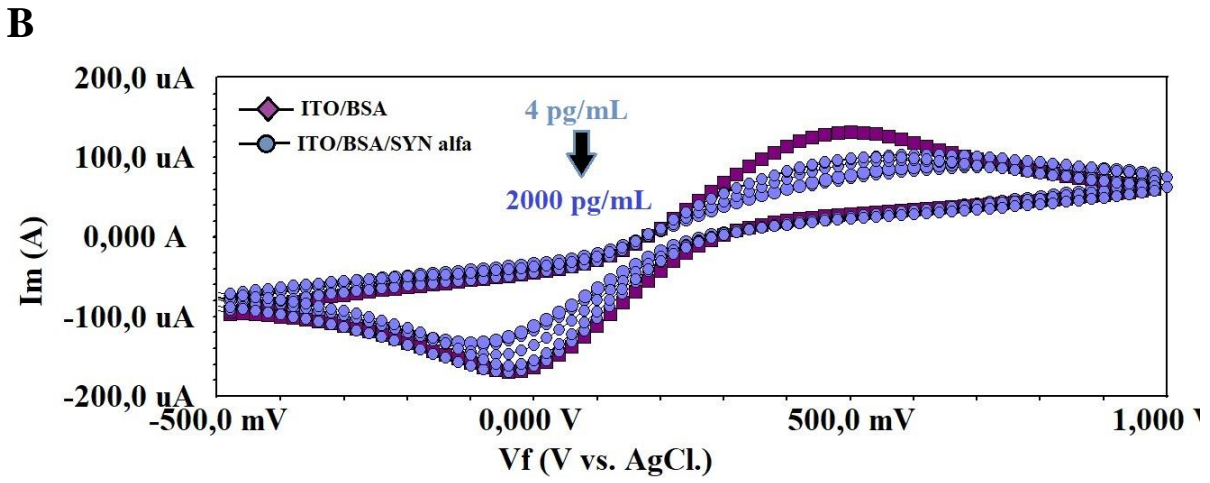
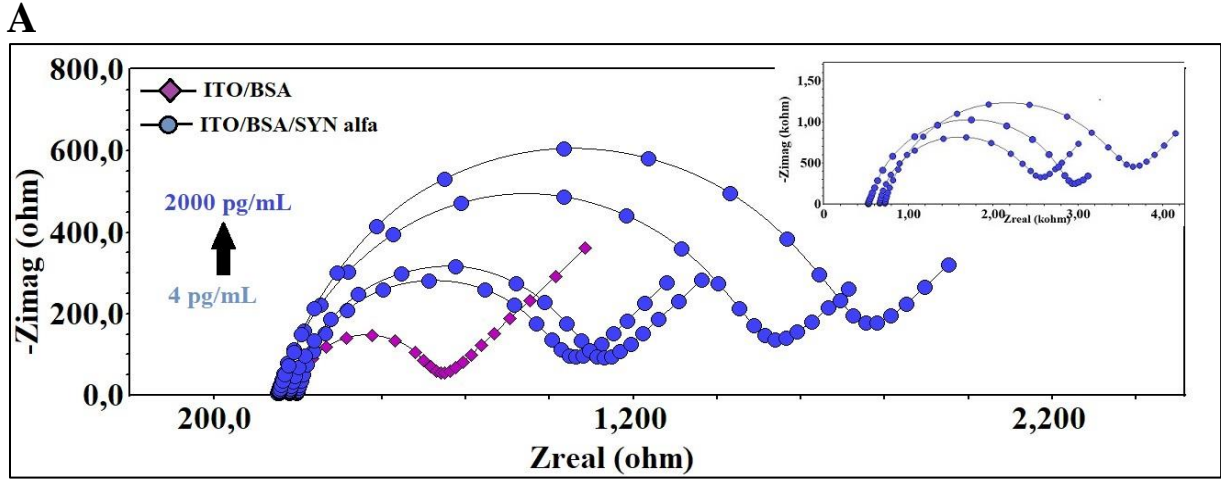
4.3.3.1. SYN alfa'nın geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi

Optimum koşulları belirlenen altın nanopartikül katkılı-PGA modifiyeli ITO nöro-biyosensör sistemiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart SYN alfa çözeltileri EIS ve CV teknikleriyle ölçümlenmiştir (Şekil 4.35.A-C). SYN alfa konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki, Şekil 4.30A 'ya eklenen eşdeğer devre modeli ile belirlenmiştir.

Eşdeğer devre modelinde yer alan elemanlardan R_s ve ZW , çözelti içindeki redoks probunun difüzyon özelliklerini ve elektrolit çözeltisinin kütle özelliklerini temsil eder. Bu nedenle, bu parametreler, elektrot yüzeyinde meydana gelen kimyasal dönüşümlerden etkilenmez. Devredeki diğer iki bileşen olan C_{dl} ve R_{ct} , elektrot / elektrolit arayüzündeki dielektrik ve yalıtım özelliklerine bağlıdır.

SYN nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(SYN) - R_{ct}(BSA) \quad (4.4)$$



Şekil 4. 35. Optimum koşullarda hazırlanan Nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda SYN-alfaya' ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Faradayik impedans spektroskopisinin genellikle, antikorla (anti-SYN) fonksiyonelleştirilmiş elektrot yüzeylerine antijenlerin (SYN alfa) bağlanması sonucu elektrot yüzeyinde oluşan yalıtıma daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Arabirimdeki tam elektriksel impedansı ölçmek için - gerçek kısmı Z_{re} de dahil olmak üzere- redoks probu elektrolit çözeltisine eklenir. Redoks probu, elektrotta uygun potansiyel uygulandığında elektrot yüzeyinde bir faradayik akım sağlar. Elektrot yüzeyindeki biyo-afinite kompleksi oluşumu üzerinde gözlemlenen impedans spektrumunun gerçek bileşenindeki değişiklikler ilgili kapasitans değişikliklerinden daha yüksektir. SYN alfa artan standart konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan faradayik akım, yüzeyde bir immunokompleksin oluştuğunu göstermektedir.

Oluşan biyo-afinite kompleksinde SYN alfanın konsantrasyonu arttıkça yük transfer direnci de belirli bir noktaya kadar lineer artış sergilemektedir. EIS spektrumundan elde edilen verilerle çizilen kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.35.B) geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin 4-2000 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon verdiğini, bununla birlikte 2000 pg/mL üzerindeki SYN alfa konsantrasyonlarında sistemin yük transfer direncinin bir platoya eriştiğini, biyosensör arayüzeyinin doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Altın nanopartikül katkılı, poliglutamik asit modifiyeli nöro-biyosensör sisteminin SYN alfa için LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0,135 pg/mL ve 0,45 pg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen biyosensörün SYN alfa analizinde yüksek duyarlılık gösterdiğini vurgulamaktadır.

İmpedans spektroskopisi, arayüzeylerin biyoalgılama olaylarından kaynaklı kapasitans değişikliklerinin saptanmasına da olanak sağlar. Bu kapasitans değişiklikleri, kompleks impedans spektrumlarının hayali kısmı olan Z_{im}'den türetilebilir. Antijenler (SYN-alfa) ve antikorlar (anti-SYN-alfa) genellikle yüklü protein molekülleri olduğundan, bunlar arasında biyo-afinite komplekslerinin oluşumu, elektrot yüzeyine uygulanan yükten etkilenebilir. Bu nedenle, biyo-afinite komplekslerinin oluşumu üzerine gözlemlenen kapasitans değişiklikleri potansiyel bağımlıdır ve optimum şartlar belirlenmelidir.

Çizelge 4. 9. Artan SYN alfa konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, Ru ve kapasitanstaki değişiklikler

Elektrot	Rct (ohm)	Ru (ohm)	C_{dl} (µF)
Nöro-biyosensör	395,8± 5,6	399,7± 2,90	3,71± 0,14
SYN alfa 4 pg/mL	677,3±7,7	407,9± 2,91	3,27± 0,09
SYN alfa 25 pg/mL	756,8±8,0	392,2± 2,86	2,58± 0,06
SYN alfa 100 pg/mL	1152±10,9	367,1± 2,67	2,49± 0,04
SYN alfa 500 pg/mL	1376± 12,7	369,4± 2,65	2,39± 0,04
SYN alfa 1000 pg/mL	1918± 18,9	677,2± 4,67	2,36± 0,05
SYN alfa 1500 pg/mL	2877± 26,7	747,2± 5,13	2,05± 0,04
SYN alfa 2000 pg/mL	3724± 25,3	548,3± 3,73	2,03± 0,03

Anti-SYN alfa ve SYN alfa ile AuNP-PGA ile işlevselleştirilmiş elektrot arasındaki biyo-afinite etkileşimi, çift yüklü tabaka kalınlığını artırır ve redoks probunun ara yüzey elektrokimyasal sürecini inhibe eder. Elektrot kapasitansı, C_{dl} düşerken elektron transfer direnci, Rct, sırasıyla artmaktadır (Çizelge 4.9). Bu durum geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin 4-2000 pg/mL SYN alfa aralığında verdiği impedimetrik davranışın neticesidir.

Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin üretim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşümleri Çizelge 4.10’ da verilmiştir.

Çizelge 4. 10. Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

Nöro-biyosensör adımı	Kramers Kronig Transform değeri (µ)
Yalın ITO	179,8
ITO/OH	50,02
ITO/OH/AuNP	6,48
ITO/OH/AuNP/PGA	10,1
ITO/OH/AuNP/PGA/anti-SYN	5,68
ITO/OH/AuNP/PGA/anti-SYN/BSA	1,645

Kramers Kronig dönüşümlerinin sağlanamaması iki kategoriye ayrılabilen çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir, (i) veriler sistematik hatalar içeriyor olabilir; Bunlar, ölçüm kurulum ve ekipmanı, örneklerin tazeliği, numune sıcaklığındaki yavaş değişim vb. nedenlerden dolayı olabilir ve (ii) seçilen eş değer devre modelleme fonksiyonu uygun değildir; Bu, dağıtıcı elemanların yanlış seçilmesinden ve / veya düzenlenmesinden

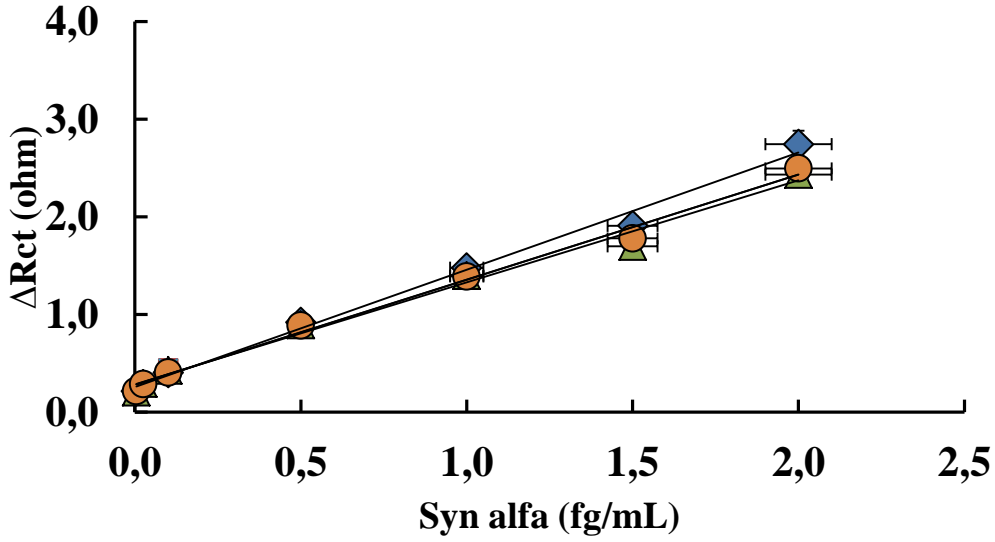
kaynaklanabilir veya verilerin, geçersiz bir transfer fonksiyonuna (yani, bir dizi basit dispersiyon elemanı veya transfer fonksiyonu tarafından oluşturulamayan) ihtiyaç duyması olabilir (**Boukamp 1995**). Bu değerlendirmeler göz önüne alındığında AunP-PGA temelli synuclein alfa biyosensörünün K.K. dönüşümleri sistematik hatanın minimum olduğu ve kullanılan modelin gerçek ve hayali impedans datalarıyla eşleştiğini göstermektedir.

4.3.3.2. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği

ITO temelli altınnanopartikül ve PGA katkılı nöro- biyosensörünün tekrarlanabilirliği, benzer koşullar altında hazırlanan 20 kullan at elektrot ile hazırlanan aynı konsantrasyonda SYN alfa (100 pg / mL) analiz edilerek belirlenmiştir. Nöro - biyosensörün analizin varyasyon katsayısı % 4,43 ortalama değer ve standart sapması 128,55 ve 5,69 pg / mL olarak hesaplanarak oldukça iyi bir tekrarlanabilirlik kapasitesine sahip olduğu vurgulanabilir.

4.3.3.3. SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrarüretilebilirliği

Altın nanopartikül katkılı, PGA modifiyeli ITO temelli SYN alfa nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle farklı zamanlarda hazırlanan 6 biyosensör sisteminin 4-2000 pg / mL tayin aralığındaki cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda 6 nöro-biyosensörün yanıtlarının SYN alfa için 4-2000 pg / mL arasındaki benzer doğrusallığı gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.36' da gösterilen tekrar üretilebilirliğe ait eğimlerin ve interseptlerin relatif standart sapmaları sırasıyla % 4, 54 ve % 4, 04 olarak bulunmuştur. Tekrarüretilebilir sinyaller, nöro-biyosensörün yanıtı üzerine yapılan çıkarımda yüksek güvenilirlik ve sağlamlık değerlendirilmesinin yapılmasını sağlamaktadır.



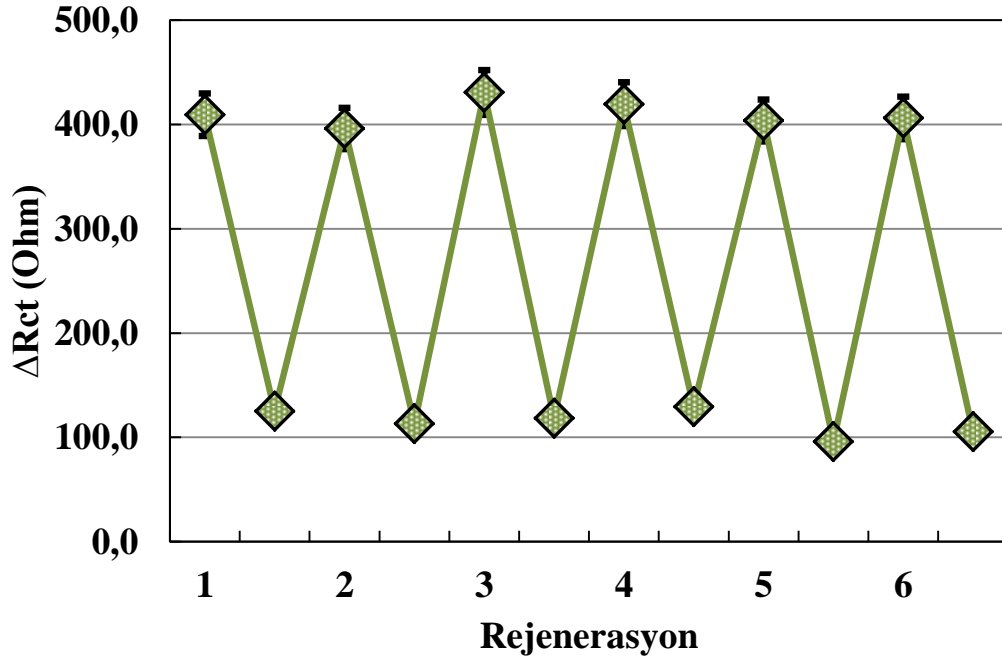
Şekil 4. 36. Nöro-biyosensör sisteminin tekrar üretilebilirliği (n=6)

Tekrarüretilebilirlik çalışmalarında temel gereksinim, biyomoleküllerin biyolojik aktivitelerini koruyarak sensör yüzeyine immobilize hale getirilmesi ve bu sayede tekrarlanan ölçümler alınabilmesidir. Anti-SYN alfa'nın glutamik asit ve altın nanopartikül platformundan oluşan ITO yüzeyine immobilizasyonu, kuvvetli kovalent etkileşimlerle sağlanmıştır. Bu durum nöro-biyosensörün yüksek tekrarüretilebilirlik karakteristiğine sahip olmasında temel etkidir.

4.3.3.4. SYN alfa nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi (tekrar-kullanılabilirlik)

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyon edilebilme kapasitesi pH 2,8 glisin-HCl tampon rejenerasyon çözeltisi ile muamele edilerek test edilmiştir. Sisteme yüksek veya düşük pH tamponlarının uygulanmasıyla rejenerasyon sağlanmasına dair pek çok çalışma rapor edilmiştir. Genel olarak, pH 2,0'den daha düşük pH tamponu, biyoreseptörün geri dönüşü olmayan hasarına sebep olabilmekte, yüksek pH tamponu ise aynı nedenden dolayı yaklaşık 11 pH ile sınırlandırmak gerekmektedir. Yükün çözücü ortamına bağlı olması nedeniyle, çözücü içinde iyonik mukavemet, pH ve rakip iyonların varlığı gibi faktörler, biyosensör rejenerasyonunda yardımcı olan bioreseptör ve analit arasındaki entalpik etkileşimleri etkin tarayarak yük etkileşimlerinin görece kuvvetini değiştirebilir (Goode ve ark. 2014).

SYN alfanın da yapısında bulunan triptofan, valin, lösin, metionin, fenilalanin, sistein ve izolösin gibi bazı aminoasitler hidrofobik özellikleri ile bilinmektedir. Bazı sistemlerde, hidrofobik etkileşimler antikorun antijen etkileşiminin anahtarıdır ve apolar yüzeylerin genellikle bağlayıcı ara yüzeye gömüldüğü ve bu durumun bir biyosensörün bağlanma ve akabinde rejenerasyonunu analiz etmek için kritik olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4. 37. SYN-alfa nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi

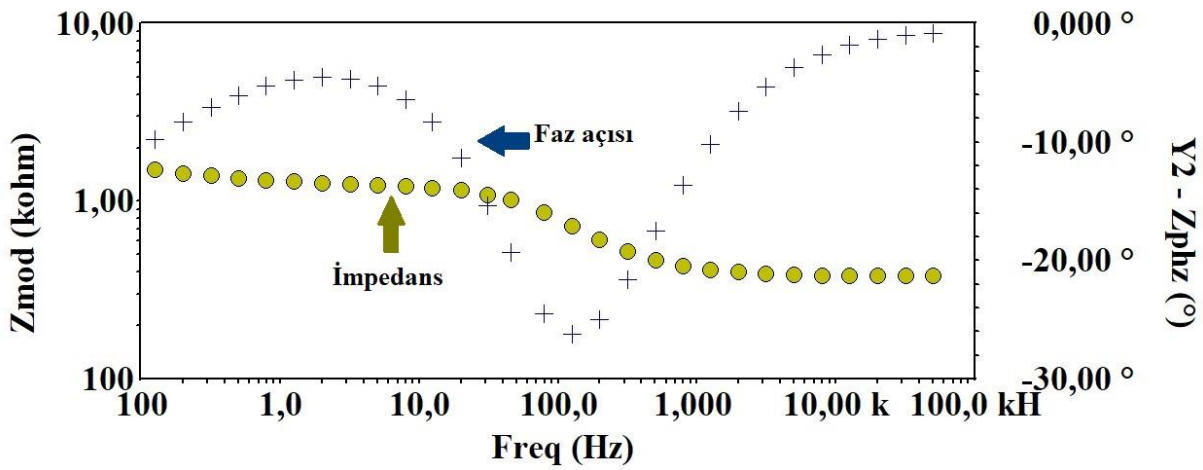
Altın nanopartikül-poliglutamik asit ile dekore edilmiş ITO-PET elektrotlar belirtilen tampon sistemiyle 6 defa rejenerere edilebilmişlerdir. 7.döngüden itibaren geliştirilen nöro-biyosensör SYN alfa ölçüm sinyalini kritik derecede kaybetmiştir (Şekil 4.37). Bu durum AuNP-PGA biyoalgılama platformunun tamamen bozulmaya başlamasıyla açıklanabilir.

Rejenerasyon, sensör sistemlerinin tekrar kullanılabilirliğine ve dolayısıyla maliyet yüküne fazlaca etki eden bir parametredir. Uzun rejenerere olma kapasitesine sahip biyosensörlerin ticari kullanım potansiyeli yüksektir.

4.3.3.5. Sabit frekansta impedans analizi

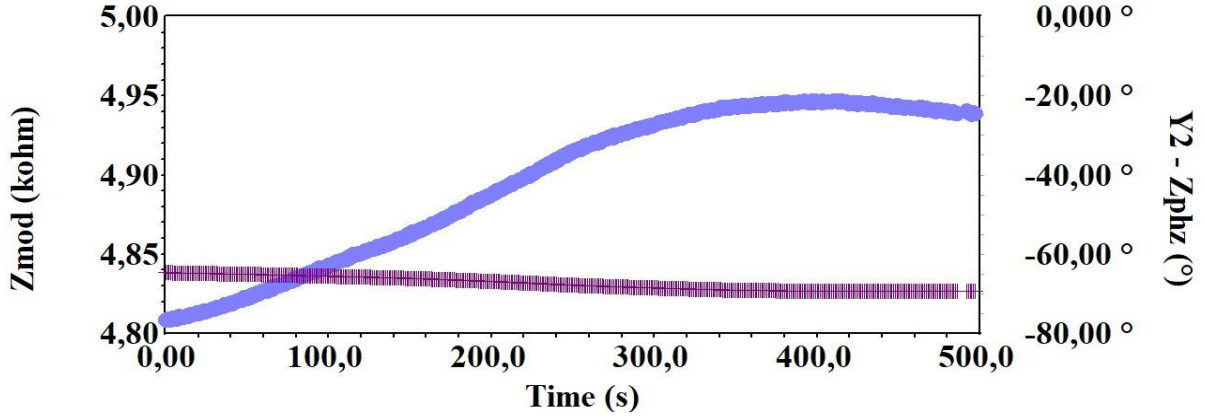
Sabit frekansta impedans, antikor-antijen etkileşimlerinin zamana karşı elektrokimyasal impedans değişimlerini takip etmek için kullanılır. Standart EIS'den farklı olarak SFI'da, bir spektrum bulunmamaktadır. Ölçüm, hücreye uygulanan sabit bir DC potansiyeli ile yapılır.

Sisteme uygulanacak olan sabit frekans Bode grafiği yardımı ile tespit edilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4. 38. SYN-alfa nöro-biyosensörünün bode grafiği

Bode grafiği, frekans alanı içerisinde mutlak $Z(\omega)$ ve faz açısı $\theta(\omega)$ gösterir. Frekans, eksenlerden birinde görüldüğünden, spektrumun impedans ve faz kaymasına etkisi açıktır. Faz kaymasının $\theta(\omega)$ maksimum / minimum olduğu noktalarda R_s , R_p , C_{dl} ve frekans değerleri belirlenebilir. Randles hücresinin davranışının dirençli olduğu yüksek ve düşük frekans sınırlarında, faz açısı neredeyse sıfırdır. Ara frekanslarda, impedansın hayali bileşeni arttıkça faz açısı artar.

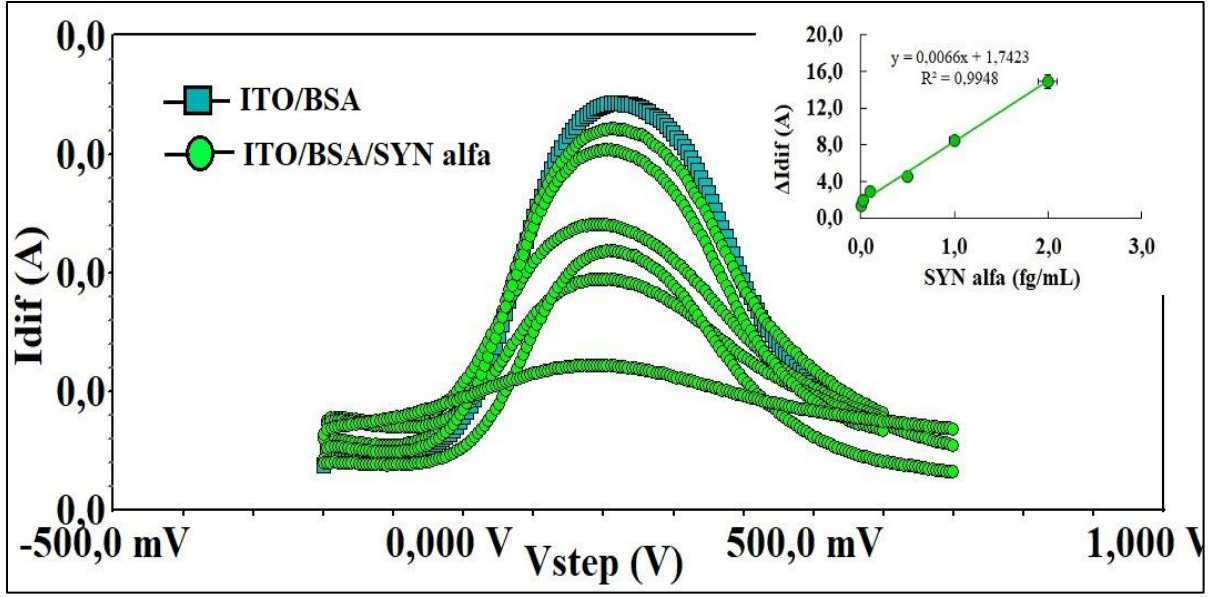


Şekil 4. 39. SYN- alfa nörobiosensörünün sabit frekansta impedans analizi

Sabit frekansta (7 Hz) nöro-biosensör sisteminin non-faradayik ortamda SYN alfa tayinine yönelik verdiği impedimetrik davranış (Şekil 4.39) görülmektedir. 550 saniye civarında SYN alfa'nın biyoalgılama yüzeyinde doyumluğa eriştiği gözlemlenmektedir. İmpedansta faz açısı kapasitif karakterin mukavemetini göstermektedir. Sistemin kapasitansının düşmesi faz açısının azalması olarak tezahür eder.

4.3.3.6. Kare dalga voltametri

Geliştirilen nöro-biosensör sisteminin hassasiyeti önemli bir voltametrik teknik olan SWV ile de takip edilmiştir. Tayin aralığında (4-2000 pg/mL) hazırlanan SYN alfa standart çözeltileri altın nanopartikül-poliglutamik asit dekoreli nöro-biosensör sistemi ile ölçümlenmiş ve elde edilen voltamogramdan kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4. 40. Nöro-biyosensör sisteminin farklı SYN-alfa konsantrasyonlarına kare dalga voltametri ile verdiği yanıt ve kare dalga voltametrisinden elde edilen kalibrasyon grafiği

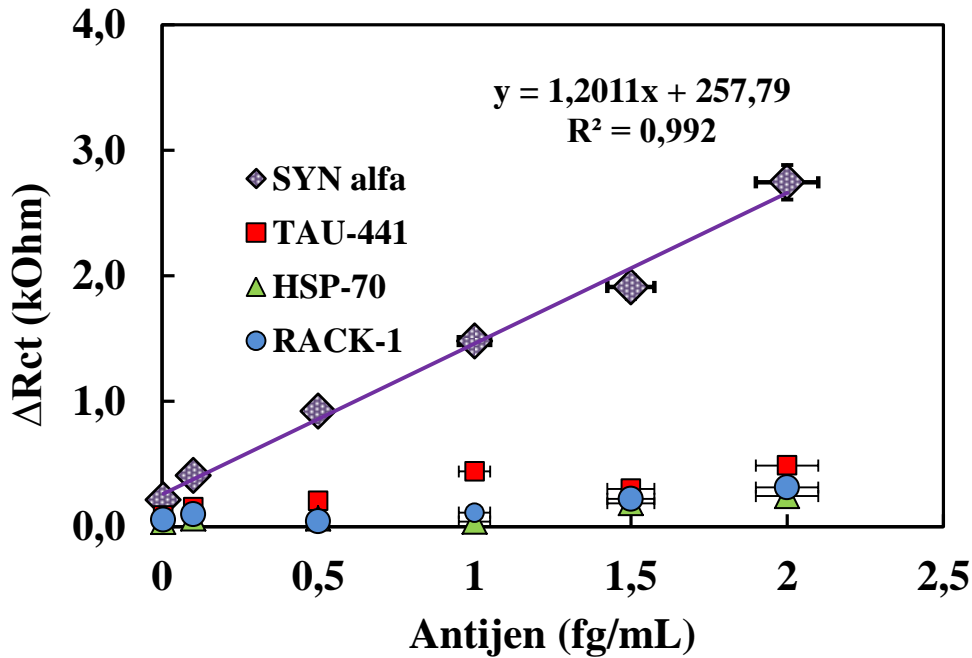
Elde edilen sonuç, EIS'den elde edilen sonuçlarla benzer hassasiyet göstermektedir, iki yöntemi karşılaştırmak gerekirse, EIS ile kalibrasyon çiziminin oluşturulması bir frekans aralığı üzerinde impedimetrik deneylerin yapılmasını gerektirir ki bu da ciddi analiz süresi ve çabası demektir. Buna ek olarak, bir Nyquist çiziminde kötü tanımlanmış yarım daire elde edildiğinde yüksek bir belirsizlik derecesi Zet ile ilişkilendirilir, bu durumda bilgisayar simülasyonlarını gerçekleştirmek için daha fazla analiz süresi gerekecektir. Aksine, SWV daha hızlı bir saptama tekniğidir, çünkü voltametrik tarama saniyeler içinde tamamlanır. Şekilde görüldüğü üzere tepe şekilli bir akım tepkisi üretilir ve bu, doğrudan kalibrasyon oluşturmak için kullanılabilir. Elektrokimyasal olarak tersinir bir reaksiyona sahip bir prob, etiketsiz bir elektrokimyasal immünosensör ile birlikte kullanıldığında, SWV, hızlı, verimli, etkili ve düşük maliyetli bir saptama tekniği olarak tercih edilebilir.

4.3.3.7. SYN alfa nöro-biyosensörünün seçiciliği

Tasarlanmış biyosensörün hedef SYN alfa antijenine karşı seçiciliği, bazı nonspesifik protein antijenleri, insan HSP-70, Tau-441 ve RACK-1 ile olan nonspesifik etkileşimlerinin aynı konsantrasyon aralığında (4-2000 pg/mL) incelenmesi ile belirlenmiştir.

Seçicilik sensörün benzer analitlere değil, sadece hedef analitine yanıt verdiği anlamına gelir.

Şekil 4.41, HSP-70, Tau-441 ve RACK-1 ün nöro-biyosensöre spesifik olmayan çok küçük bir katkısı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte anti-SYN alfa immobilize edilmiş altın nanopartikül-PGA katkılı yüzeye en çok afinitesi olan protein Tau-441 olmuştur. Tau-441 ile SYN alfa'nın bazı aminoasit kalıntılarının benzerliği bu afiniteye sebep olmuş olabilir. Nonspesifik etkileşimlerin toplam Rct yanıtına olan bu ihmal edilebilir katkısı, biyosensörün spesifik hedef SYN alfa'ya karşı iyi bir seçiciliğe işaret etmektedir.



Şekil 4. 41. SYN-alfa nörobiyosensörünün farklı antijenlere karşı gösterdiği seçicilik

Seçicilik, hedef analit konsantrasyonunun hedef dışı biyomoleküllerin konsantrasyonundan çok daha az olduğu gerçek örneklerde özellikle önemlidir. Örneğin, kan serumu tipik olarak yaklaşık toplam 70 mg / mL içerir, bu konsantrasyon içerisinde bile tasarlanan biyosensör sisteminin gerekli konsantrasyonda hedef analiti ölçümleyebilmesi beklenir.

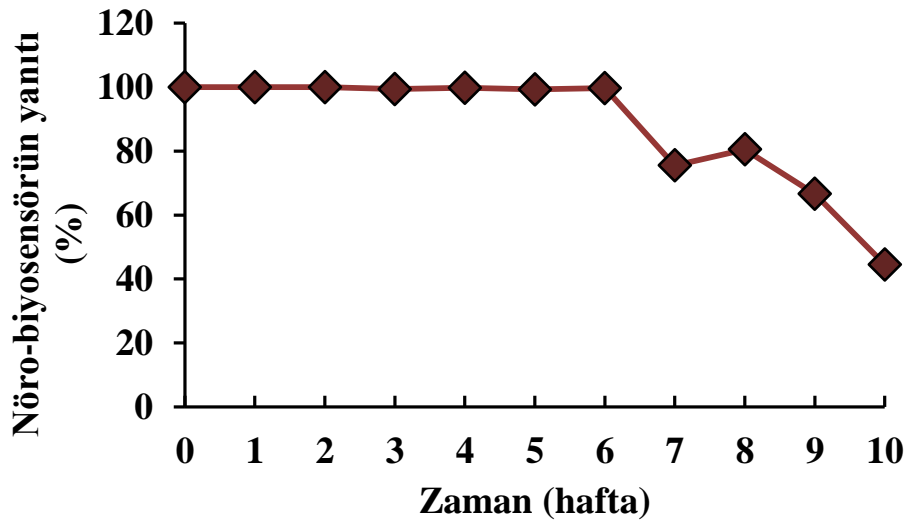
Non-spesifik bağlanma kavramı, hedef dışı biyomoleküllerin prob tabakasına yapışarak hedef bağlanmayı engellemesi veya yanlış pozitif bir sinyale neden olmasıdır. Bu

problemi hafifletmek için, sensör yüzeyi, spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için (prob bağlanma yerlerini işgal etmeyecek şekilde) sığır serum albümini (BSA) gibi bir engelleme maddesini ile muamele edilmiştir. (Daniels ve Pourmve 2007).

4.3.3.8. SYN alfa nöro-biyosensörünün depo ömrü

Depolanma stabilitesi, nöro-biyosensör sisteminin üretildikten sonra belirtilen koşullar altında saklandığında aktivitesini koruması ve hedef analitini algılayabilmesidir. Bu parametre, biyosensör sisteminin ticarileştirilmesi için oldukça önemlidir.

Yüksek afinitelere sahip olan biyoreseptörler, analitin elektrostatik bağlanmasını veya kovalent bağlanmasını koruyarak biyosensörün stabilitesini güçlendirir. Dolayısıyla Ölçümün stabilitesini etkileyen diğer bir faktör de zaman geçtikçe biyoreseptörün bozunmasıdır.



Şekil 4. 42. SYN-alfa nöro-biyosensörünün depolanma stabilitesi

Şekil 4.42 AuNP katkılı PGA modifiyeli ITO tek kullanımlık biyosensör sisteminin +4°C’de kuru olarak depolandığında analitine karşı gösterdiği yanıt görülmektedir. Sistemin 6 hafta boyunca aktivitesini tamamen koruduğu 7. Haftadan itibaren aktivitesinin %20’sini kaybettiği görülmüştür. 10. Haftanın sonunda ise nöro-biyosensör sinyali %60 oranında düşmüştür.

4.3.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamaları

Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik validasyonu, Namık Kemal Üniversitesi Nöroloji polikliniğine başvuran hastalar arasında rveom yöntemle toplanan beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde SYN alfa analizinin yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

BOS, 100 yıldan uzun bir süredir klinisyenler ve beyin cerrahları tarafından tanı amaçlı kullanılmaktadır. Yetişkinlerde toplam BOS hacmi, 140 ila 270 ml arasındadır. Ventriküllerin hacmi yaklaşık 25 ml' dir. BOS, dakikada 0,2 – 0,7 ml veya günde 600-700 ml oranında üretilmektedir. Lomber bölgeden alınan BOS'un toplam protein miktarı sağlıklı yetişkinler için genellikle 150 ile 500 mg / L arasındadır. Bununla birlikte, proteinlerin konsantrasyonu yaş, sağlık durumuna bağlı olarak dalgalanma gösterebilir. (çocuklarda daha düşük). Bir çok nörolojik hastalığa -genellikle kan / BOS bariyer disfonksiyonu olarak literatürde tanımlanan- beyin omurilik sıvısında artmış toplam protein konsantrasyonu eşlik eder (**Hühmer ve ark. 2006**).

Beyinde hastalıkla ilgili değişikliklerin saptanması, BOS protein analizinin temel hedefidir. BOS total proteininin artan konsantrasyonu, lumbar patlamasının başlamasından kısa bir süre sonra nörolojik hastalığın bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (**Hühmer ve ark. 2006**). Literatürde bilgileri sağlıklı bireylerde SYN alfa konsantrasyonunun pg/mL düzeyinde olduğunu belirtir (**Kapaki ve ark. 2013; Shalash ve ark. 2017**).

Üretilen nöro-biyosensörün fizibilite ve analitik güvenilirliğini değerlendirmek için gerçek örnekler, insan serebrospinal sıvısında standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı SYN alfa farklı konsantrasyonlarının (25 pg / mL ve 500 pg / mL) BOS örneklerinin eklenmesi ve EIS tespitinin ardından bağıl standart sapma ve geri elde analitiksel değerleri kalibrasyon grafiği yardımı ile hesaplanmıştır.

SYN alfa daha önceki bölümlerde de bahsedildiği üzere Parkinson hastalığı biyobelirteçleri içerisinde en kuvvetli adaydır. Bu biyobelirtecin konsantrasyonunun belirlenmesi, hastalığın erken tanısı, prognozu ve hatta mekanizması hakkında aydınlatıcı olacaktır. Literatürde sınırlı sayıda SYN alfa tayini yapan biyosensör sistemi bulunmakla birlikte, bunların içerisinde BOS numunelerinde SYN alfa analizi yapan çalışmaya rastlanılmamıştır. Çizelge 4.11 değerlendirildiğinde; altın nanopartikül katkılı poliglutamik

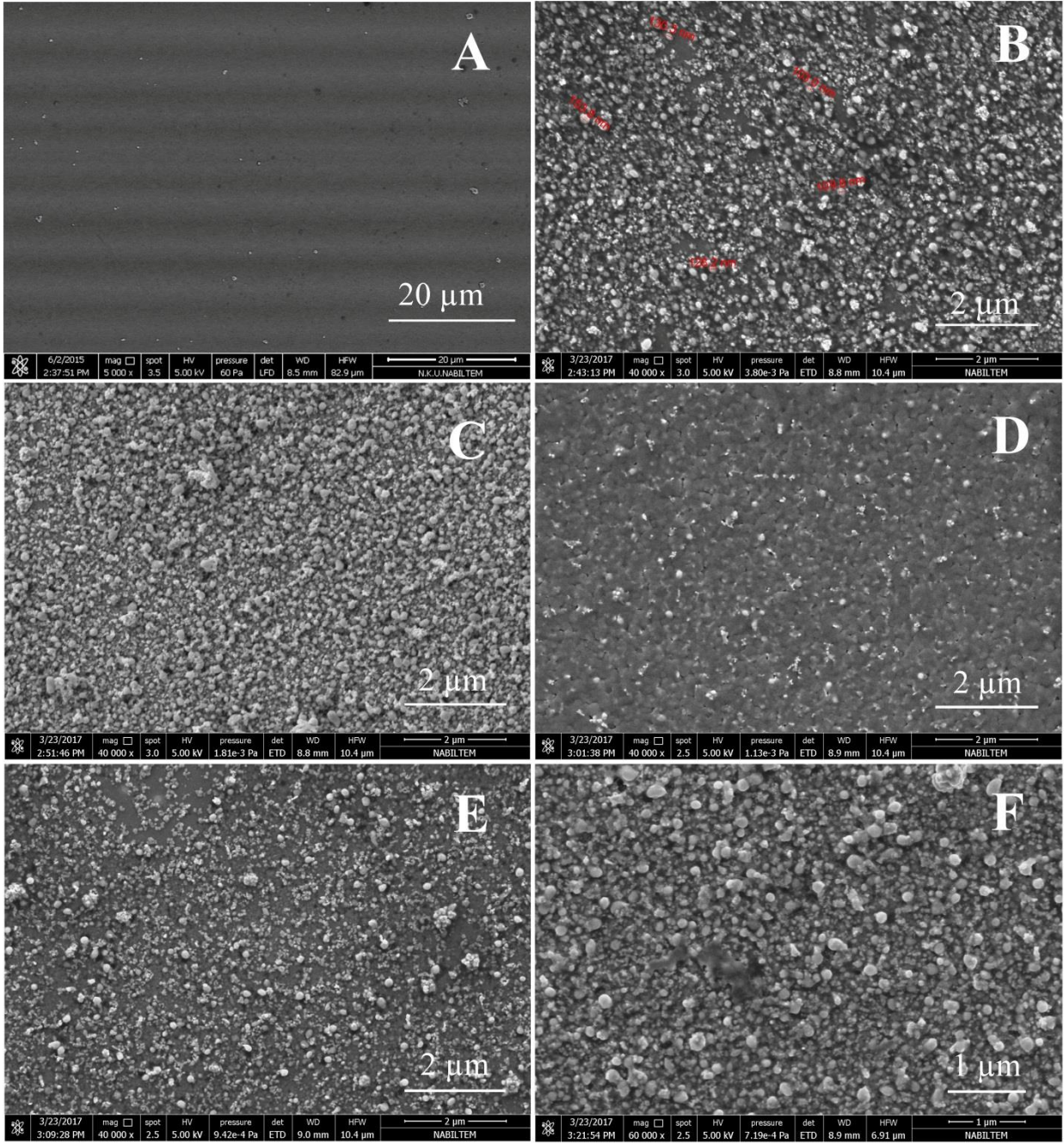
asit ile modifiye edilmiş ITO tek kullanımlık nöro-biyosensör sisteminin insan beyin omurilik sıvısında bulunan SYN alfa konsantrasyonunu belirlemede yüksek hassasiyet gösterdiği değerlendirilmesini yapabiliriz. SYN alfa serumda da bulunmakla birlikte BOS'taki miktarı hastalığında tespitinde özellikle önemlidir. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin PH tanı ve prognozunda anahtar bir protein olan SYN alfa'yı belirleme kapasitesi, uygulanabilirlik açısından umut vaat edicidir.

Çizelge 4. 11. Geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile BOS örneklerinde bulunan SYN-alfa konsantrasyonlarının belirlenmesi

BOS örnek numarası	SYN alfa ölçülen miktarı (pg.mL-1)	Standart eklenen miktar (pg.mL-1)	Ölçülen miktar (pg.mL-1, n=3)	RSD (% , n=3)	Geri Kazanım (%)
1	942	25	999,17 / 990,70 / 943,22	3,08	101,1
		500	1457,7 / 1425 / 1415,9	1,53	99,4
2	497,9	25	515,5 / 533,1 / 500,5	3,16	98,7
		500	1000,3 / 992 / 1021	1,49	100,6
3	403,5	25	415,5 / 422,3 / 417,7	0,82	104
		500	915 / 918,1 / 909,4	0,51	102
4	102	25	137,2 / 145 / 148,2	3,97	116
		500	590 / 585,5 / 584	0,57	99,6

4.3.3.10. SEM görüntüleri

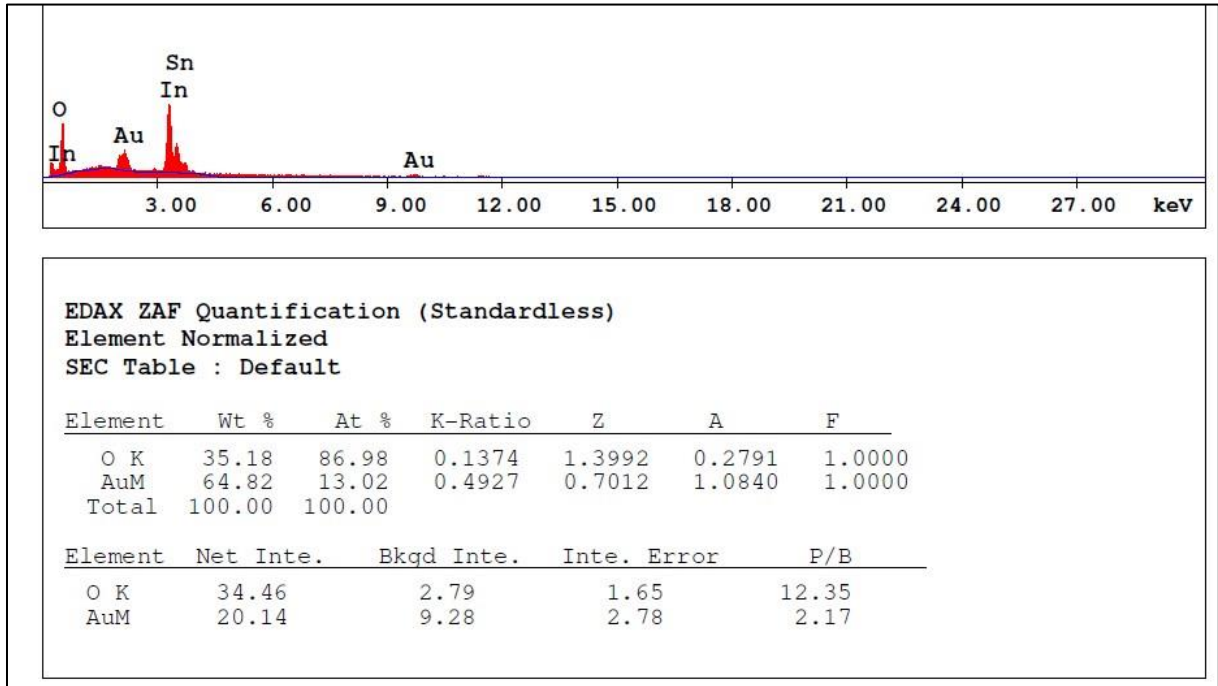
Nöro-biyosensör geliştirilirken yüzeyde meydana gelen morfolojik değişiklikler taramalı elektron mikroskobu ile adım adım takip edilmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4. 43. SYN-alfa nöro-biyosensörlerinin tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO, (B) ITO/AuNP, (C) ITO/AuNP/PGA, (D) ITO/AuNP/PGA/anti-SYN-alfa, (E) ITO/AuNP/PGA/anti-SYN-alfa/BSA, (F) ITO/AuNP/PGA/anti-SYN-alfa/BSA/SYN-alfa

Şekil 4.43.A yalın ITO elektroda ait SEM görüntüsüdür. Elektrotlar altın nanopartikül ile kaplandıktan sonra yüzey morfolojisi şekil 4.43.B' deki gibi olmuştur. AuNP'lerin ortalama boyutunun 80-100 nm civarında olduğu bu görselden görülmektedir. Nanometre büyüklüğündeki altın parçacıkların büyük yüzey-hacim oranları ve yüzeydeki aktif alanların

varlığı nedeniyle mükemmel katalitik aktivite sergiledikleri bilinmektedir. Bu nedenle, ortaya çıkan AuNPs dizisinin elektrotun yüksek katalitik aktivite göstermesinde en büyük etkidir. Altın nanopartikül katkılı yüzey üzerinde poliglutamik asit polimerize edilmesi yüzeyin morfolojisini tekrar değiştirmiştir (Şekil 4.43.C). Anti-SYN alfanın AuNP-PGA modifiyeli yüzeye immobilizasyonu şekil 4.43.D’ de kazandığı globüler form ile net bir şekilde görülmektedir. BSA ile bloklama adımı morfolojide değişikliğe sebep olurken (Şekil 4.43.E) SYN-alfanın antikoru ile immunokompleks oluşturduğu son adımda (Şekil 4.43.F) proteinin globüler formu net bir şekilde sörülmemektedir.



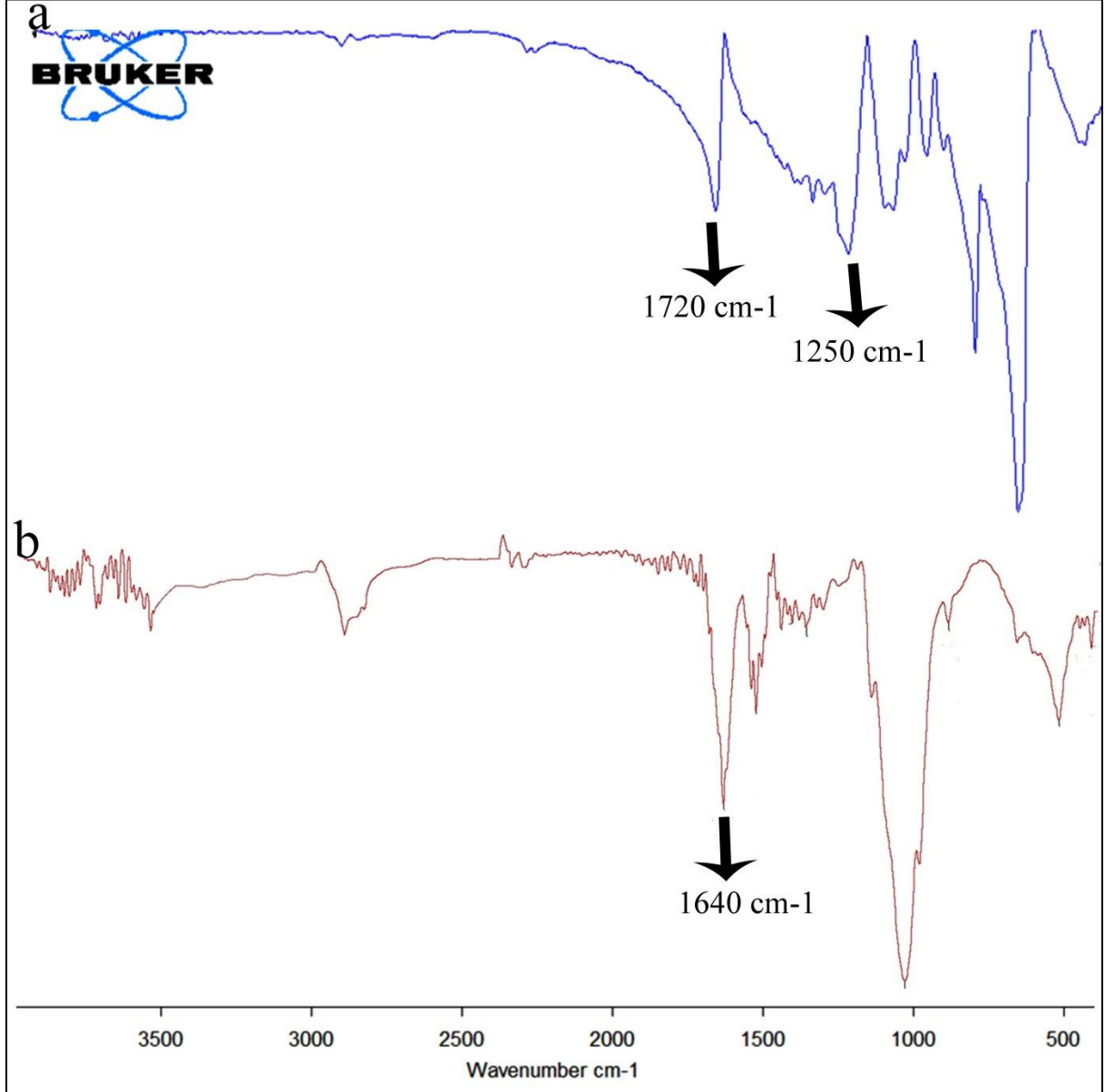
Şekil 4. 44.ITO elektrot yüzeyinde altın nanopartikül biriktirilmesine ait EDX spektrumu

ITO yüzeyinde altın nanopartikül biriktirme adımına ait Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) spektrumu Şekil 4.44’ de görülmektedir. Spektrum ile SEM görüntüleri birlikte değerlendirildiğinde AuNP’nin elektrot yüzeyinde başarılı bir şekilde biriktirildiği yorumu yapılabilir.

4.3.3.11. FTIR sonuçları

Nöro-biyosensörün poliglutamik asit (a) ve ardından anti-SYN alfa’nın (b) immobilizasyuna ait adımların FTIR spektrumları şekil 4.45’ de görülmektedir. Şekil 4.45.a’ da görülen yaklaşık 1720 cm⁻¹’deki kuvvetli pik C=O ve 1250 cm⁻¹’deki titreşim piki C-O

bağına aittir ve bu da PGA'daki karboksilat grubunun varlığına işaretler. PGA yüzeyine anti-SYN alfa immobilize edildikten sonra 1640 cm⁻¹'de görülen pik amit bağının spesifik piki dir ve anti-SYN alfa ile PGA arasındaki kovalent etkileşim sonucu oluşan kovalent bağın göstergesidir.



Şekil 4. 45. SYN-alfa nöro-biyosensörünün FTIR spektrumları (a) PGA, (b) anti-SYN-alfa

4.3.3.12. SYN-alfa nöro-biyosensörünün literatürdeki yeri

Tasarlanan SYN-alfa nöro-biyosensörünün literatürle karşılaştırılması Çizelge 4.12' de verilmiştir.

Çizelge 4. 12. Literatürde bildirilen çeşitli SYN alfa biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması

Elektrot konfigürasyonu	İmmobilizasyon yöntemi	Ölçüm yöntemi	Tayın Aralığı	LOD	Referans
Au katkılı TiO ₂ nanotüp	Ab1 etkileşimi	Foto elektrokimyasal	50 pg/mL-100 ng/mL	34 pg/mL	(An, Tang ve ark. 2010)
PAMAM-Au nanopartikül GCE	poli-o-ABA kovalent etkileşim	EIS ve CV	20 pg mL ⁻¹ - 200 ng mL ⁻¹	14.6 pg /mL	(An, Jiang ve ark. 2012)
Tiyollenmiş aptamer altın elektrot	TCEP MCH	EIS	0.1 nM ve 0.5 µM	1,0 pg/mL	(Benvidi, Rajabzadeh ve ark. 2014)
AuNP- PGA katkılı ITO elektrot	EDC NHS kimyası	EIS ve CV	4-2000 pg/mL	0,135 pg/mL	

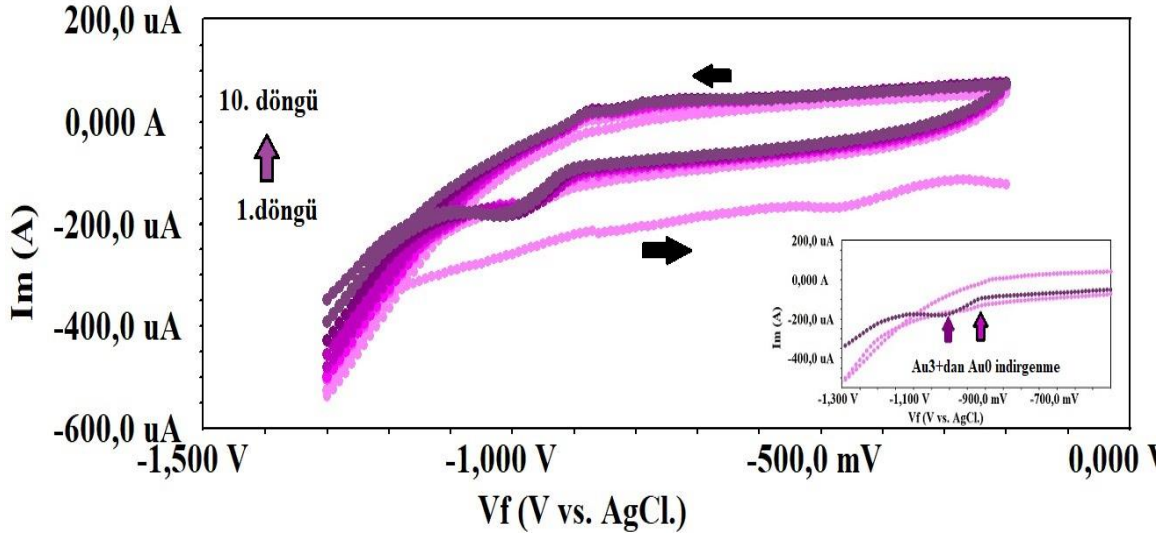
SYN alfa Parkinson tipi demansta önemi göz ardı edilemeyecek bir proteindir. Bu proteinin hassas tekniklerle ölçümlenebilmesi klinik tanıda ve prognozda klinsyenlere yardımcı olacaktır. Bununla birlikte literatürde SYN alfa tayinine yönelik sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Bu çalışmaların ortak özelliği tayin aralığını genişletmek ve algılama sınırını düşürmek adına amplifikasyon materyalleri kullanılmasıdır. Bu tez çalışmasında kullanılan AuNP-PGA katkılı yüzey platformu, SYN alfanın hassasiyetini arttırmıştır. Bu bakımdan geliştirilen nöro-biyosensör sistemi diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Ayrıca yöntemin pratikliği ve düşük maliyetli olması da çalışmanın öne çıkan noktasıdır. Serumda da bulunmak birlikte, SYN alfa'nın tanısında kritik olan vücut sıvısı BOS'tur. Tasarlanan nöro-biyosensör sistemi BOS örneklerinde SYN alfa'nın analizini yüksek hassasiyette gerçekleştirerek, literatürde sunulan çalışmalardan ayrılmaktadır.

4.4. Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sistemi

4.4.1. Nöro-biyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı

Alzheimer hastalığının önemli bir biyobelirteci olan Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin ilk adımı elektrotların daha önceki başlıklarda belirtilen şekillerde temizlenmesidir. Temizlenen ve iyice kurutulan elektrotlar yüzeyine DMF'de disperse edilmiş indirgenmiş grafen oksit (rGO) damlatılıp gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Rgo geniş yüzey alanına, mükemmel elektrik iletkenliğine ve sağlam mekanik özelliklere sahip olmasından ötürü biyosensör alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Geniş yüzey alanı, antikor immobilizasyonunda yüksek etkinlik sağlar (**Benvidi ve ark. 2014**). İndirgenmiş grafen oksit (rGO), camsı karbon (**Benvidi ve ark. 2015**), indiyum kalay oksit (**Yagati ve ark. 2014**) veya altın ve polimerler (**Layek ve Nvei 2013**) gibi çeşitli elektrotlar üzerinde geniş bir analit yelpazesinin tayininde yüksek hassasiyet sağlaması nedeniyle birikmiştir. Ayrıca, rGO'nun iki boyutlu düzlem yapısı, çeşitli nanopartiküllerin yüklenmesi için geniş bir platform sunmakta ve katalitik, manyetik ve optoelektronik materyaller geliştirmek için yeni bir yol olmaktadır (**Muszynski ve ark. 2008**). Elektrokimyasal performansı arttırmak için, GO ve AuNP'ler arasındaki sinerjik işbirliğine dayalı hibridize biyosensörlerin geliştirilmesi son derece caziptir. Dolayısıyla Tau-441 proteinin tayinine yönelik bu sistemde, rGo ile kaplanmış elektrot yüzeyinde altın nanopartikül biriktirilmiştir. Rgo-AuNP ile oluşturulan nanokompozit gece boyu 11-MUA çözeltisinde bırakılarak altın yüzeyin SH ile kuvvetli kovalent etkileşime girerek yüzeyde SAMs oluşturması beklenmiştir. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar yüzeyi tamamen kaplamakla birlikte, rastgele yönelimlerin sayısını azaltır, düzgün, tekrarlanabilir ve kararlı yapılar üretir. Biyobelirteç, SAM yöntemi gibi güçlü kimyasal bağlar kullanılarak elektrot yüzeyinde immobilize edildiğinde, impedimetrik biyosensörlerin tekrarlanabilirlik özelliklerinin ivme kazandığı bildirilmiştir (**Katz ve Willner 2003**).

Şekil 4.46, rGO ile modifiye edilmiş ITO yüzeye elektrokimyasal biriktirme işlemi ile Au nanopartiküllerin elektrokimyasal sentezi sırasında kaydedilen döngüsel voltammogramları açıkça göstermektedir.



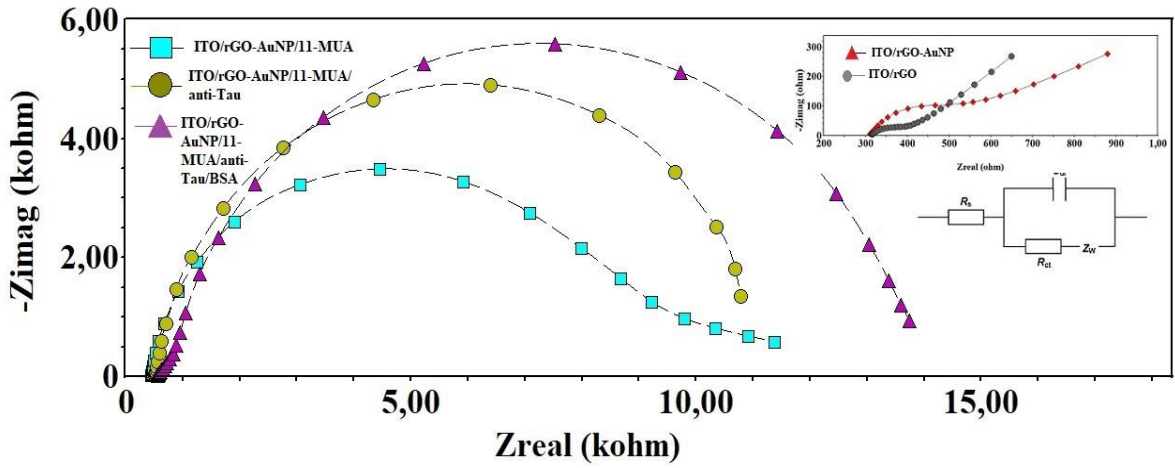
Şekil 4. 46. ITO elektrot yüzeyine altın nanopartikül kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar

rGO ile modifiye edilmiş ITO elektrotlar üzerine altın nanopartiküllerin elektrokimyasal biriktirilmesine ait voltamogramların yalın ITO elektrotlar üzerine altın nanopartikül biriktirilmesine ait voltamogramlardan farklı olduğu görülmektedir. Şekil 4.46' da pik daha yayvandır ve bu durum yüzeyin farklılığına bir işarettir. Ayrıca 1. döngüde Au'nun indirgenmesi, Ag / AgCl referans elektroduna karşı yaklaşık -960 mV'de meydana gelmiştir, ancak tekrarlayan tarama döngüleri ile birlikte indirgenme potansiyeli, birikim üzerindeki çekirdeklenmeye bağlı olarak, -1,020 V'a (içeri eklenmiş şekil) kaymıştır. Bu kayma yüzeyde altın nanopartikülün biriktiğinin göstergesidir ve bu değerler yalın elektrot üzerine biriken altın nanopartikülden kısmen farklıdır. Ayrıca, dikkat çekilmesi gereken bir diğer nokta AuCl_4^- katodik pik akımının azaldığıdır. Bu değişim, difüzyon tabakasındaki AuCl_4^- tüketimine bağlıdır.

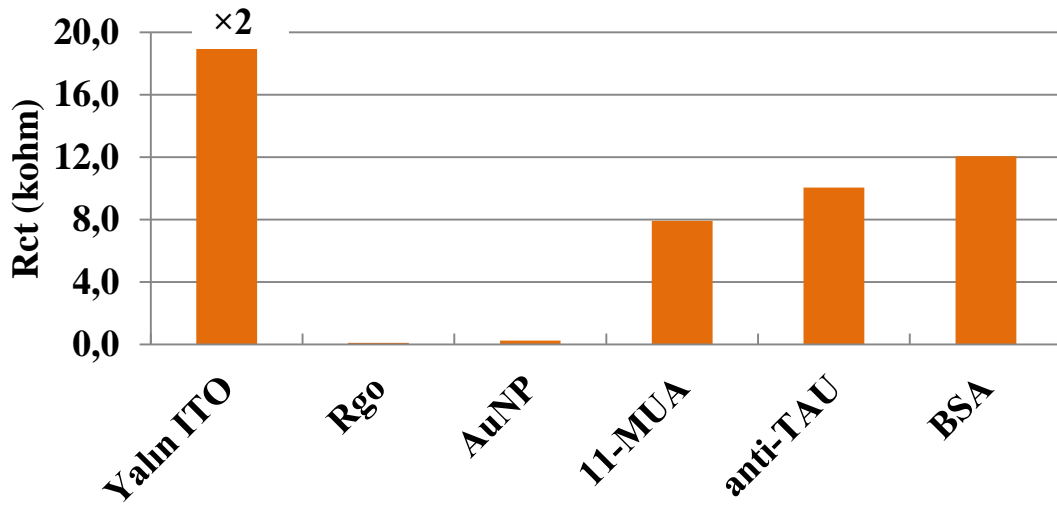
rGO-AuNP nanokompozit oluşturulmuş ITO elektrotlar 11-MUA çözeltisi ile gece boyu karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Oluşam SAMs tabakasında Au yüzeyle ile SH arasında kovalent etkileşim meydana gelirken, fonksiyonel -COO terminaller anti-Tau'nun immobilizasyonunda etkinlik göstermek üzere EDC-NHS ile muamele edilmiştir. EDC-NHS'nin anti-Tau ile 11-MUA'nın karboksilik asit grupları arasında sağladığı çapraz bağlanma anti-Tau'nun yüzeye immobilize olması ile neticelenmiştir.

İmpedimetrik biyosensörler sıklıkla analite eşlik eden biyomoleküllerin (örn. Proteinler) spesifik olmayan adsorpsiyonundan muzdariptirler. Spesifik olmayan adsorpsiyon fenomenini ve impedans ölçümleri üzerindeki etkisini en aza indirmek için çeşitli girişimlerde bulunmaktadır. İçlerinde en sıklıkla başvurulanı, sığır serum albümininin (BSA), proteinlerin spesifik olmayan bağlanmalarını azaltmak için immüno-sensing tabakasında ko-immobilize edilmesidir. Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün inşasına ait adımların EIS'dan alınan impedans spektraları, her adıma ait yük transfer değişimleri ve CV'den voltamogramları Şekil 4.47' de gösterilmiştir.

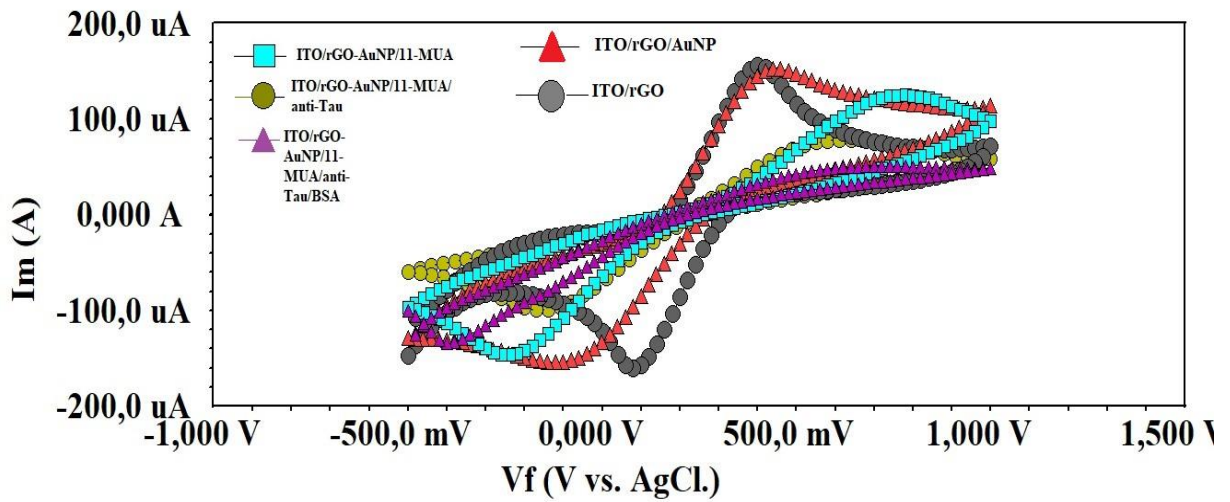
A



B



C



Şekil 4. 47.Tau-441 Nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) elektrokimyasal impedans spektrumu, (B) her adıma ait Rct değerleri (C) döngüsel voltamogramlar

Elektrokimyasal İmpedans spektroskopisi, modifiye elektrotların yüzey özelliklerinin değişimi hakkında ayrıntılı bilgi sağlar. Yüksek frekanslardaki yarım daire çapı, elektron transfer direncine (R_{ct}) karşılık gelirken düşük frekanslardaki lineer kısım, difüzyon prosesine karşılık gelmektedir. Şekil 4.47.A ve Şekil 4.47.B birlikte incelendiğinde yalın ITO elektrodun yalıtkan özelliğinden ötürü çok yüksek yük transfer direncine sahip olduğu (yaklaşık 40 kohm) görülmektedir. Bununla birlikte, RGO-AuNP nanokompoziti ITO üzerinde biriktirildikten sonra daha küçük bir R_{ct} gözlemlenmiştir. RGO – AuNPs kompozitleri mükemmel elektrik iletken malzeme olduğundan, elektron transferini hızlandırarak R_{ct} 'in düşmesine neden olmuşlardır. 11-merkaptoundekanoik asitin SH grupları ile altın yüzey arasındaki etkileşim sonrasında yüzeyde meydana gelen SAMs, fonksiyonel –COO⁻ terminallerinin redoks probunu itmesi ve difüzyonu zorlaştırmasından ötürü, yük transfer direncinin artmasına sebep olmuştur. Anti-Tau proteinin yüzeye kovalent immobilizasyonu neticesinde, protein tabakasının neden olduğu yalıtkan tabaka, ara yüzeyde elektron transferine mani olmakta bu da yük transfer direncine net bir artış olarak yansımaktadır (yaklaşık 10 kohm).

Redoks probunun heterojen elektron transfer hızı sabit değeri (k^0), nanokompozit filmde meydana gelen elektronik taşıma işlemi doğrulamak için kullanılan önemli bir faktördür. Yük transfer kinetiklerine göre, k^0 aşağıdaki gibi (**Puri, Niazi ve ark. 2014**) ifade edilir:

$$k^0 = RT/n_1^2 F^2 A R_{ct} C \quad (4.5)$$

R gaz sabiti, T; sıcaklık, n_1 ; elektrot reaksiyonuna katılan elektronların sayısı, F; Faraday sabiti, A elektrot alanıdır (0.25 cm^2) ve C, redoks probunun konsantrasyonudur.

Nöro-biyosensör sistemine ait adımların k^0 değerleri ile birlikte çözelti direnci ve kapasitanstaki değişiklik Çizelge 4.13' te verilmiştir.

Çizelge 4. 13 .Nöro-biyosensörün tasarım adımlarına ait impedimetrik parametreler

Nöro-biyosensör adımı	Ru (ohm)	C _{dl} (µF)	k ⁰ (m.s ⁻¹)
ITO/rGO	350,5±1,86	1025,5± 41,07	2,3×10 ⁻⁶
ITO/rGO/AuNP	308±2,238	16,42± 0,50	1,8×10 ⁻⁶
ITO/rGO/AuNP/11-MUA	466,7±3,226	2,31±0,02	2,69×10 ⁻⁷
ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-TAU	529,7±3,633	2,36±0,02	2,12×10 ⁻⁷

ITO elektrot yüzeyinde rGO ve akabinde altın nanopartikül biriktirilmesi oldukça yüksek bir k⁰ değeri göstermiştir ki bu durum artmış elektron taşınımının bir neticesidir. Akabinde anti-Tau'nun immobilizasyonu , k⁰ değerinde (2,12×10⁻⁷ m s⁻¹) belirgin bir düşüş gösterir bu; protein moleküllerinin yalıtım özelliğinden kaynaklanan yavaş elektron taşınımını ve biyoelektrotun oluşumunu doğrular niteliktedir.

rGO ve AuNP nanokompozitten oluşan nöro-biyosensör sisteminde ilerleyen adımlar ve nihayetinde anti-Tau'nun algılama yüzeyine immobilizasyonu, çift yüklü tabaka kalınlığını artırır ve redoks probunun ara yüzey elektrokimyasal sürecini inhibe eder. Elektrot kapasitansı, C_{dl} düşerken elektron transfer direnci, R_{ct} sırasıyla artmaktadır. Bu durum geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin verdiği impedimetrik davranışın neticesidir.

Nöro- biyosensör sisteminin adım adım gelişimi döngüsel voltametri ile de takip edilmiştir (Şekil 4.47.C).

Tau-441 tayinine yönelik nöro-biyosensör sistemi geliştirilirken anodik ve katodik dalgalar arasında meydana gelen pik potansiyel ayrımı şu eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\Delta E_p = (E_{pc} - E_{pa}) \quad (4.6)$$

Bu eşitliğe göre, 100 mV/s tarama hızında OH-lanmış Rgo ile modifiye edilmiş ITO elektrodun ΔE_p değeri 0,32 V iken altın nanopartikül biriktirildikten sonra ΔE_p değeri biraz artmış ve 0,46 V'a yükselmiştir. Rgo-AuNP nanokompozit yüzeyinde 11-MUA ile SAMs oluşturulduktan sonra ΔE_p değeri hızlı bir şekilde 1,02 V'a yükselmiştir ki elektron aktarım hızı ile ters orantılı olan pik potansiyeli ayrımı, elektrotun iletkenliğinin elektrokimyasal değerlendirmesi için kullanılır. Bu hızlı yükseliş 11-MUA SAMs tabakasının sahip olduğu

alifatik gruplara ek olarak, karboksilik terminallerden dolayı iletkenliği büyük oranda düşürdüğünün kanıtıdır.

Alkanetiollerin SAM'leri, elektrolit çözeltisinde çözünmüş elektrot ve elektroaktif redoks türleri arasındaki elektron transferini bloke edebilir: (i) uzun zincirli alkil mono tabakalar, heterojen elektron transferine ve iyon penetrasyonuna doğru etkili bir bariyer sağlayabilir; (ii) tek tabakada elektron tünelleme mevcut olmakla birlikte, yüzeydeki defektler maskeleyebilir (iii) terminal grupları elektron transferini etkiler (**Molinero ve Calvo 1998**).

Genel olarak, tek tabakada 2 tür defekt meydana gelebilir; pinhol ve çökük alan. Pinhol, redoks iyonlarından veya moleküllerinden daha büyük bir çapa sahip olduğunda, elektrot yüzeyine ulaşabilir ve sonuçta elektron transferinin kinetiğinde değişiklik olmadan voltamogram akımında bir azalma meydana gelir. Öte yandan defekt alanlarında redoks türleri elektrot yüzeyine tam kalınlıktaki bir tek tabakaya göre daha kısa bir mesafede yaklaşmaktadır (**García-Raya ve ark. 2008**).

SAM yüzeyindeki defektlerin/pinhollerin karakterizasyonu, EIS kullanılarak karakterize edilebilmektedir. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi özellikle pinhol karakterizasyonu için değerli bir araçtır, çünkü çözelti direncinin etkileri, çift katman yükü ve difüzyona bağlı akımlar ile SAM'da meydana gelen diğer süreçler birbirinden ayrılabilir (**Janek ve ark. 1998**).

Pinhol ve defektlere sahip elektrotların elektron transferi üç şekilde gerçekleşebilir: (1) elektronun tek katman halinde tünellenmesiyle; (2) redoks türlerinin elektrotta tek tabakaya nüfuz ederek elektron transferini etkilemesiyle; (3) elektroaktif bileşğin pinhol veya defekt bölgelerine difüzyonu ile (**Cannes ve ark. 2003; Chevallier ve ark. 2006**).

Elektrot yüzeylerinin dirençli bir tek tabaka ile modifikasyonu, pasivasyon ile sonuçlanır ve dolayısıyla, bu durum ac yanıtlarını değiştirir. Eşdeğer devre açısından, iki bileşen bu durumdan etkilenecektir: elektrot reaksiyonunun tamamen kinetik kontrollü olduğ u yüksek frekanslarda, elektron transfer oranının engellenmesi nedeniyle heterojen yük transfer direncinin artması beklenir; Düşük frekanslarda ise Warburg empedansının $\omega - 1 / 2$ 'ye doğrusal bağımlılıktan sapması beklenir. Bu sapma, tek tabaka içindeki defektlerin veya

pinhollerin, difüzyon tabakası kalınlığına kıyasla birbirinden uzak olduğu durumlarda meydana gelir. Bununla birlikte, pinholler ile difüzyon katmanları üst üste geldiğinde, düşük frekanslardaki ac tepkisi çıplak elektrotların davranışına benzemektedir (**García-Raya ve ark. 2008**).

rGO-AuNP modifiyeli elektrotların 11-MUA ile SAM oluşturması sonucunda yüzey kaplama değeri aşağıdaki eşitlikten belirlenebilir:

$$\theta_{EIS} = 1 - \left(\frac{R_{ct}^{AuNP}}{R_{ct}^{SAMS}} \right) \quad (4.7)$$

R_{ct} AuNP, altın nanopartikül kaplanmış adıma ait yük transfer direnci, R_{ct} SAMs ise altın kaplı elektrot yüzeyinde tek tabaka oluşumuna ait yük transfer direncidir. Bu veriler ışığında θ_{eis} değeri 0,975 bulunmuştur. Bununla birlikte Amatore ve ark.'ları (**Amatore, Savéant ve ark. 1983**) θ değerinin $\theta > 0,9$ 'a yaklaştığında eşitlik 4.7'den bulunmasının yeterli olmayacağını öne sürmektedir. Bu durumda, yüzey kaplama değeri, pinhol boyutuna dayalı bir model kullanılarak tahmin edilebilmektedir (**García-Raya, Madueño ve ark. 2008**).

$$\theta_{eis} = 1 - \left(\frac{\sigma_w}{m - \sigma_w} \right) \quad (4.8)$$

σ_w Warburg katsayısıdır ve AuNP kaplı elektrodun, eş değer devre modelinden elde edilen “ Y_o ” değerinden şu eşitlik yardımıyla hesaplanır (**Bard, Faulkner ve ark. 1980**):

$$\sigma = 1 / Y_o \cdot \sqrt{2} \quad (4.9)$$

m değeri ise 11-MUA ile modifiye edilmiş elektrottan elde edilen Z' ve $\omega^{-1/2}$ grafiğinin yüksek frekans bölgesinde gözlenen doğrusal aralığın eğimidir. Eşitlik 4.8 göre θ_{eis} değeri 0,9925 bulunmuştur.

Tek katmandaki defektlerin yarıçapı ve bunların arasındaki mesafe, Amatore ve arkadaşları tarafından önerilen mikrodizi modeli kullanılarak tahmin edilmiştir (**Amatore, Savéant ve ark. 1983**). Bu modele göre, pinhollerin tek biçimli yarıçaplı disk şeklinde aktif bölgeler olduğu ve tek tabakada eşit olarak dağıldığı varsayılmaktadır (**Diao, Guo ve ark.**

2001) Pinhol alanının kesiti ($1-\theta_{eis}$), pinhollerin büyüklüğü ve bitişik pinholler arasındaki mesafe denklemi ile ilişkili olabilir:

$$(1-\theta_{eis}) = \frac{ra^2}{rb^2} \quad (4.10)$$

Burada ra pinholün yarıçapı; rb ise elektrodu çevreleyen aktif olmayan alanın yarıçapıdır. Pinhol yarıçapı, $Z' - \omega^{-1/2}$ grafiğinde yüksek ve düşük frekans alanı arasındaki dönme noktasına karşılık gelen frekans değerinden yaklaşık olarak belirlenebilir ve bu frekans değeri, $Z'' - \omega^{-1/2}$ grafiğinin maksimumundan kolayca hesaplanır. Tokuda ve ark.'ları (**Tokuda, Gueshi ve ark. 1979**) bu maksimum frekans denklemleri ile ifadelendirmişlerdir:

$$\omega = \frac{q}{2} \quad (4.11)$$

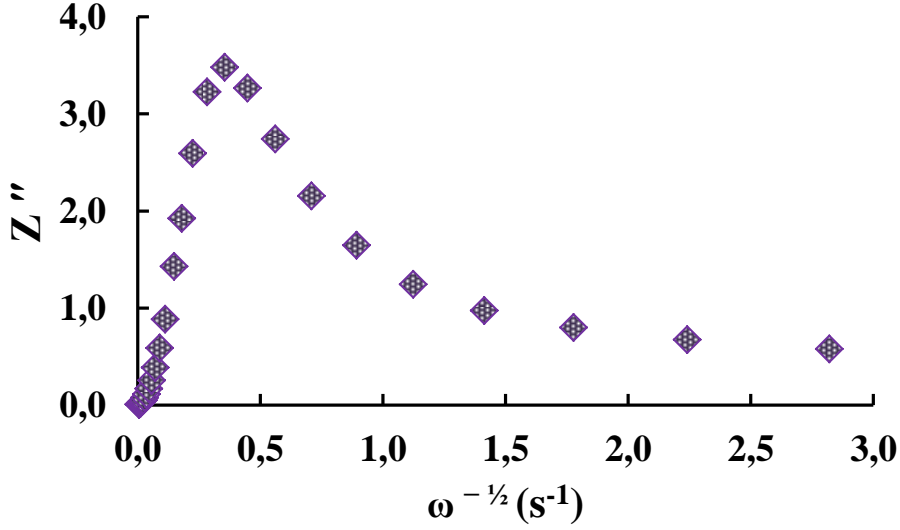
q geçiş radyal frekansıdır. Şekil 4.48' de 11-MUA ile modifiye edilmiş elektroda ait $Z'' - \omega^{-1/2}$ grafiğidir ve grafikten maksimum frekans 7,97 Hz olarak görülmektedir. Bu durumda ra ve rb şu eşitlikten hesaplanabilir:

$$q = \frac{D}{0,36 ra^2} \quad (4.12)$$

D redoks çiftinin difüzyon katsayısıdır ve $7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 'dir (**Gooding, Praig ve ark. 1998**).

$$1-\theta_{eis} = \left(\frac{\sigma_w}{m-\sigma_w} \right) = \frac{ra^2}{rb^2} \quad (4.13)$$

Bu denklemlere göre, 11-MUA SAM'in pinhol yarıçapı (ra) 1,1 μm olarak hesaplanırken, iki bitişik pinholün merkezleri (rb) 12,7 μm 'lik bir mesafededir. SAM kaplı pek çok elektrot için bu değerlerin sırasıyla 0.1–10 μm ve 1–100 μm aralığında olması beklenir bu bakımdan elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur (**Finklea 1996; Campuzano ve ark. 2006; García-Raya ve ark. 2008**).



Şekil 4. 48.11-MUA ile modifikasyon adımına ait $Z'' - \omega^{-1/2}$ grafiği

4.4.2. Tau-441 nörobiyosensörünün optimizasyon parametreleri

4.4.2.1. Optimum rGO konsantrasyonu

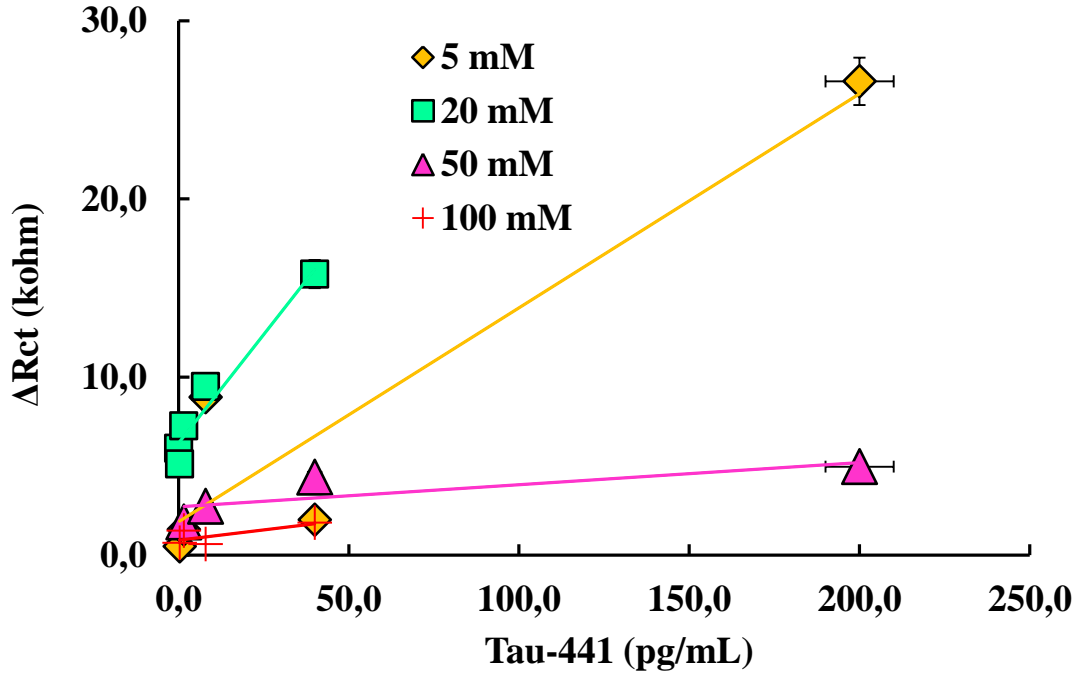
Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin biyoalgılama biriminin ilk adımı elektrotların rGO ile modifikasyonudur. Devamında altın nanopartiküllerin yüzeyde biriktirilmesi ve anti-Tau'nun başarılı bir şekilde immobilizasyonu için rGO'nun konsantrasyonunun optimize edilmesi oldukça önemlidir. 0,5 mg/mL, 1,5 mg/mL ve 2,5 mg/mL konsantrasyonlarda DMF içerisinde hazırlanan rGO dispersiyon çözeltileri temiz ITO elektrotların üzerine damlatılmış ve kurutulmaya bırakılmıştır. Yüksek konsantrasyona sahip rGO'lar yüksek kırılma gücüne sahip oldukları görülmüştür. İleri adımlara geçilemeden rGO'nun yüzeyden döküldüğü tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 0,5 mg/mL Rgo DMF içerisinde disperse olabilmekte fakat iletkenlik kapasitesi bakımından 1,5 mg/mL rGO'ya göre düşük kalmaktadır. 0,5 mg/mL rGO ile hazırlanan ITO elektrotlar yaklaşık 300 ohm civarında yük transfer direncine sahipken; 1,5 mg/mL ile hazırlanan elektrotların elektron transfer hızı daha fazladır. Dolayısıyla ileri adımlara 1,5 mg/mL rGO konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

rGO'nun anti-Tau nun immobilizasyonuna yaptığı katkıyı test etmek için, nöro-biyosensör sistemi Rgo olmadan hazırlanmıştır. Yalnız ITO elektrotlar üzerine altın

nanopartikül biriktirildikten sonra elektrotlar 11-MUA ile muamele edilmiş ve akabinde anti-Tau immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. rGO'suz yapılan çalışmada anti-Tau immobilizasyonuna ait yük transfer direncinin çok düşük olduğu (977 ohm) ve Tau ölçümü yapılırken oluşan immunokompleksin hızlıca doygunluğa eriştiği gözlemlenmiştir. Bu durum, rGO'nun yüzey alanını genişleterek sisteme yaptığı katkının nöro-biyosensörün geliştirilmesinde göz ardı edilemeyecek kadar önemli olduğunun kanıtıdır.

4.4.2.2. Optimum 11-MUA konsantrasyonu

rGO-AuNP nanokompozit modifiyeli ITO elektrotların yüzeyinde SAMs 11-MUA ile oluşturulmuştur. 11-MUA'nın optimal konsantrasyonun belirlenmesi anti-Tau proteinin yüzeye immobilizasyonunda en önemli etkidir. 11-MUA'da bulunan –COO terminaller, antikordaki amin gruplarıyla kovalent etkileşerek immobilizasyonu sağlar. Bu amaçla, Rgo-AunP ITO elektrotlar oda sıcaklığında gece boyunca farklı konsantrasyonlarda 11-MUA (5, 20, 50, 100 mM) ile inkübe edilmiştir. Yüzeydeki tabakanın istiflenmesi konsantrasyondan fazlaca etkilendiğinden, farklı MUA konsantrasyonları farklı impedimetrik davranışlar sergilemiştir. 11-MUA konsantrasyonları farklı ve sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki Tau-441 konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.49). Görüldüğü gibi, 5 mM 11-MUA ile hazırlanan nöro-biyosensör sistemi nispeten yüksek bir yük transfer direncine ve regresyon eğrisi üzerinde düşük bir belirleme katsayısına ($R^2: 0,873$) sahipken, 50 mM 11-MUA ile hazırlanan biyosensör düşük yük transfer direnci ve nispeten düşük bir belirleme katsayısına ($R^2: 0,6459$) sahiptir. Kalibrasyon grafiğinden de görüldüğü üzere, artan 11-MUA konsantrasyonu ile birlikte fazlaca artan alifatik zincirin sebep olduğu hidrofobik etkileşimler anti-Tau'nun immobilizasyonuna engel olmaktadır. Bununla birlikte 20 mM 11-MUA yüksek yük transfer direncine ve yüksek belirleme katsayısı sahiptir ($R^2: 0,9513$) ve ileri ki adımlara bu değer optimize edilerek devam edilmiştir.

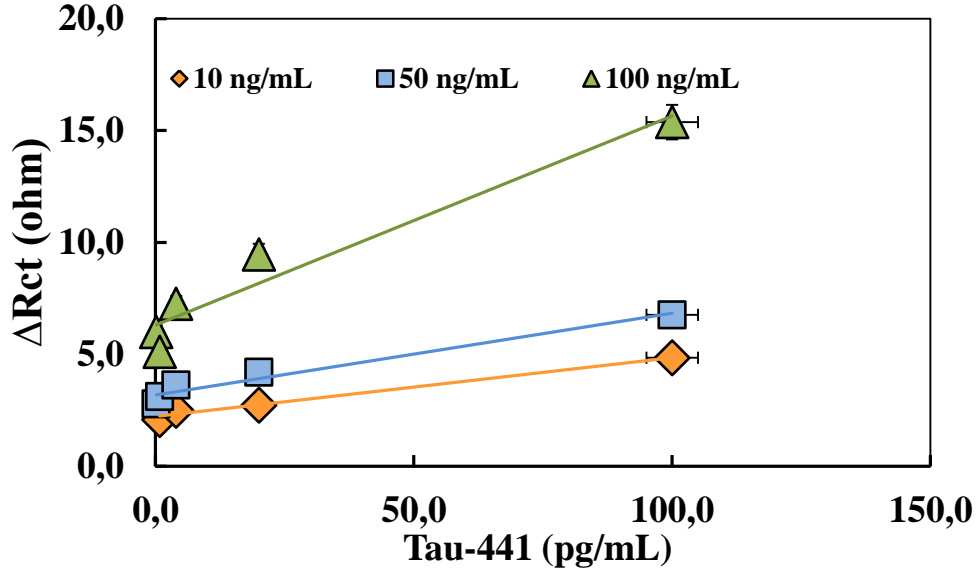


Şekil 4. 49. Farklı 11-MUA konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin Tau-441'e verdiği yanıt

4.4.2.3. Optimum anti-Tau konsantrasyonu

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında, anti-Tau konsantrasyonunun rGO-AuNP nanokompozit katkılı, 11-MUA modifiyeli biyoalgılama sistemi cevabı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, oda sıcaklığında 60 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda anti-Tau (10 ng / mL, 50 ng / mL ve 100 ng / mL) ile nöro-biyosensörler hazırlanmıştır. Anti-Tau konsantrasyonları farklılaştırılıp diğer parametreleri sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki Tau-441 konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.50).

Nöro-biyosensör sisteminin dizaynında düşük anti-Tau konsantrasyonu (10 ng/mL) kullanımının immobilizasyon için yeterli olmadığı sistemin sergilediği düşük yük transfer davranışından anlaşılmaktadır. Bununla birlikte Anti-Tau konsantrasyonu arttıkça (100 ng/mL) protein tabakasının sebep olduğu yalıtkan bariyer, yük transfer direncini net bir şekilde arttırmakta ve gösterdiği belirleme katsayısı ile ($R^2:0,9442$) Tau-441 tayininde yüksek hassasiyet sergilediği görülmektedir. Dolayısıyla ileri çalışmalara 100 ng/mL anti-Tau konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

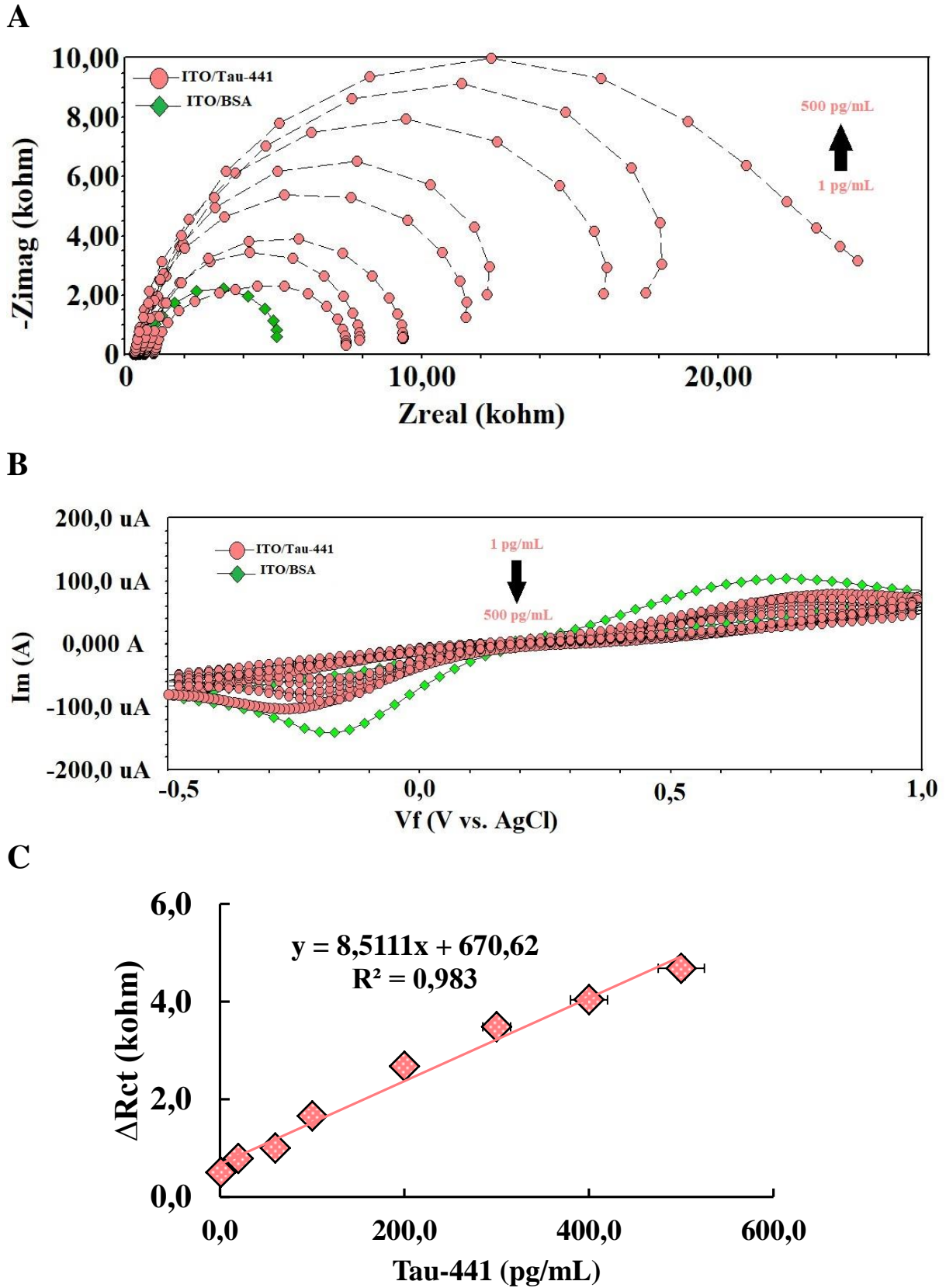


Şekil 4. 50. Farklı anti-Tau ile hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin Tau-441' e verdiği yanıt

4.4.3. Tau-441 nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri

4.4.3.1. Tau-441'in geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi

Optimum koşulları belirlenen indirgenmiş grafen oksit-altın nanopartikül nanokompozit katkılı, 11-MUA modifiyeli ITO nöro-biyosensör sistemiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart Tau-441 çözeltileri EIS ve CV teknikleriyle ölçülmüştür. Tau-441 konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki, Şekil 4.47.A' ya eklenen eşdeğer devre modeli ile belirlenmiştir.



Şekil 4. 51. Optimum koşullarda hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda Tau-441'e verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Biyosensör yüzeyinde, çok hızlı elektron transfer işlemleri olduğu durumda, impedans spektrumunun yarı çap kısmıyla birlikte doğrusal kısmı da Nyquist grafiğinde yer alır fakat Şekil 4.51.A' da görüldüğü gibi çok yavaş bir elektron transfer adımı, doğrusal kısmın olmadığı büyük bir yarı daire bölgesinde sonuçlanmaktadır.

Tau-441 nöro-biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklem kullanılarak çizilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{Tau-441}) - R_{ct}(\text{BSA}) \quad (4.14)$$

Elektron transfer direnci, R_{ct} , elektrot arayüzündeki redoks probunun elektron transfer kinetiğini kontrol eder. Böylece, elektrot üzerindeki yalıtıcı modifiyerin, ara yüzey elektron transfer kinetiklerini geciktirmesi ve elektron transfer direncini arttırması beklenir (**Katz ve Willner 2003**).

R_{ct} 'deki konsantrasyona bağlı artış, immünoreaksiyon üzerinde bir antijen-antikor kompleksi oluşumuna işaretler; ve bu durum biyoelektrot yüzeyinde ara yüzey elektron taşınmasını bozan kinetik bir bariyer oluşturur. EIS spektrumundan elde edilen verilerle çizilen kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.51C) geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin 1-500 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon verdiğini, bununla birlikte 500 pg/mL üzerindeki Tau-441 konsantrasyonlarında lineerliğin bozulduğu sistemin yük transfer direncinin bir platoya eriştiği görülmüştür (Şekil 4.51.C). Altın nanopartikül katkılı, poliglutamik asit modifiyeli nöro-biyosensör sisteminin Tau-441 için LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0,091 pg/mL ve 0,3 pg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, AuNP-rGO hibrit yapısının Tau-441 antikor-antijen bağlanması için mükemmel bir yakalama kabiliyeti olduğunu vurgulamaktadır.

Çift katman kapasitansı C_{dl} , ara yüzdeki çift katmanında depolanan yükten kaynaklanır. Yük transfer direnci R_{ct} , arayüzdeki redoks reaksiyonları tarafından üretilen akım akışını ifade eder ve Warburg impedansı, toplu çözeltiden ara yüze difüzyondan kaynaklanan akımın impedansının neticesidir. R_s , iyon konsantrasyonu ve hücre geometrisi tarafından sağlanan çözelti direncidir.

Elektrokimyasal çift katmanın (Cdl) kapasitansı, ağırlıklı olarak çözücü molekülleri, immobilize edilmiş biyomoleküller ve immobilizasyon ve saptama işlemlerini destekleyen filmlere; ara yüzeyde mevcut olan tüm bileşiklere bağlıdır. Dielektrik sabiti veya transdüser yüzeyindeki çift katmanın kalınlığı değiştiğinde bir kapasitans değişikliği indüklenir.

Kapasitif bir biyosensör oluşturulurken, elektrot yüzeyi genellikle faradayik akımları azaltmak için ilave bir yalıtım tabakası ile kaplanır (yani, kapasitansa paralel olarak yük transfer direncini arttırmak için). Biyolojik belirleme elemanı bu tabakanın üstünde immobilize olmuş durumdadır (**Lisdat ve Schäfer 2008**). Artan Tau-441 konsantrasyonu ile kapasitans azalırken, yük transfer direnci artmaktadır (Çizelge 4.14), bu durum geliştirilen biyoalgılama platformuyla Tau-441'in artan konsantrasyonlarının (1-500 pg/mL) ölçümlenebildiğinin impedimetrik kanıtıdır.

Çizelge 4. 14. Artan Tau-441 konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler

Elektrot	Rct (ohm)	Rs (ohm)	C _{dl} (µF)
Nöro-biyosensör	4460± 47,58	386,7± 2,738	2,86± 0,032
1 pg/mL Tau-441	5754± 52,66	999,7± 7,21	2,78± 0,012
20 pg/mL Tau-441	7145± 66,45	654,4± 4,388	2,64± 0,031
60 pg/mL Tau-441	8432± 68,21	677,9± 4,538	2,63± 0,030
100 pg/mL Tau-441	11080± 104,4	316,6± 2,236	2,62± 0,026
200 pg/mL Tau-441	12420± 133,4	374,7± 2,614	2,6± 0,027
300 pg/mL Tau-441	15920± 161,4	315,9± 2,268	2,31± 0,020
400 pg/mL Tau-441	17600± 175,4	496,1± 3,508	1,82± 0,017
500 pg/mL Tau-441	21640± 195	493,6± 4,031	0,44± 0,004

Tau-441 biyobelirtecinin 1-500 pg/mL konsantrasyon aralığında, döngüsel voltamogramlarından alınan sonuçlar şekil 4.51.B' de gösterilmiştir. Artan Tau-441 konsantrasyonuna bağlı olarak anodik ve katodik pik akımları azalmıştır. Bu durum, artan protein konsantrasyonu ile birlikte yüzeyde meydana gelen bariyerin yüzeye difüze olmaktan güçlük çeken elektronlara gösterdiği direncin tezahürüdür. Bu noktada, CV ve EIS sonuçları birbiri ile uyum içindedir.

Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin Kramers Kronig dönüşümlerine ait değerler Çizelge 4.15' te verilmiştir.

Çizelge 4. 15. Nörobiosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

Nöro-biyosensör adımı	Kramers Kronig Transform değeri (μ)
Yalın ITO	179,8
ITO/Rgo	20,72
ITO/Rgo/AuNP	3,123
ITO/Rgo/AuNP/11-MUA	9,3
ITO/Rgo/AuNP/11-MUA/anti-TAU	8,193
ITO/Rgo/AuNP/11-MUA/anti-TAU/BSA	0,4957

Prencip olarak, Kramers-Kronig ilişkileri, sistemin impedans spektrumunun, örneğin, enstrümantallerden veya zamana bağlı fenomenlerin neden olduğu yarıllıktan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kullanılmaktadır (**Agarwal ve ark. 1992**).

Kramers - Kronig dönüşümleri, verilerin yanlış olup olmadığını veya eşdeğer devre modelinin yetersiz olduğunu göstermek için kullanılabilir. Nedensellik ilkesine dayanan Kramers-Kronig ilişkileri, aşağıdaki koşulların yerine getirilmesi koşuluyla, herhangi bir adımın işlevinin gerçek ve hayali bölümünün birbirine bağlı olduğunu belirtir: (i) nedensellik: sistemin yanıtı sadece sinyal uyarımıyla ilgili olmalıdır; (ii) doğrusallık: yanıt sinyaline yalnızca birinci dereceden durumlar belli doğrultuda etkilemelidir, (iii) stabilite: sistemin yanıtı zamanla değişmemelidir (**Esteban ve Orazem 1991; Boukamp 1995**).

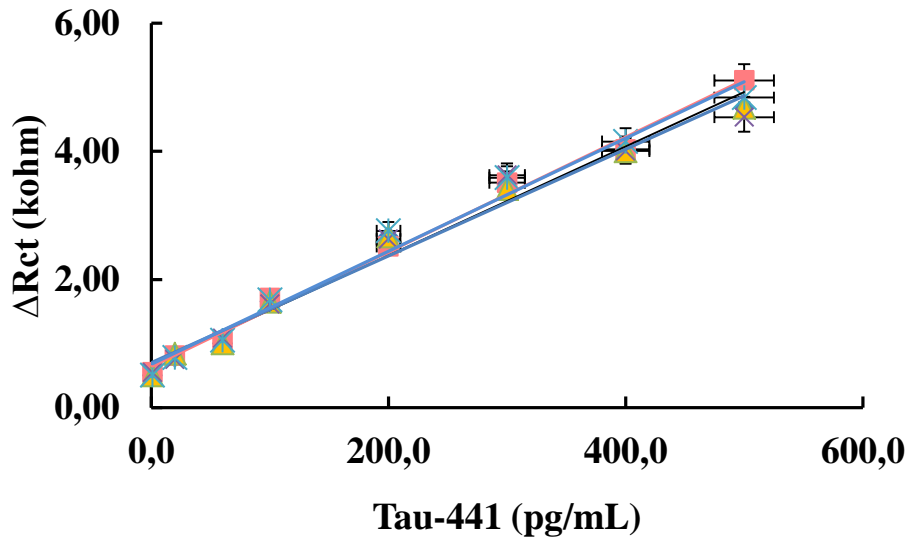
rGO-AuNP temelli nöro-biyosensörün K.K dönüşüm değerleri, geliştirilen sistemden elde edilen impedans verileri ile eşdeğer devre modelinin sunduğu verilerin uyum içinde olduğunu vurgulamaktadır. Sensörün gelişim adımları ilerledikçe daha lineer ve stabil bir K.K dönüşümüne ulaşıldığı görülmektedir.

4.4.3.2. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği

ITO temelli rGO-AuNP nanokompozit ve 11-MUA katkılı nöro- biyosensörünün tekrarlanabilirliği, benzer koşullar altında hazırlanan 20 kullan at elektrot ile hazırlanan aynı konsantrasyonda Tau-441 (100 pg / mL) analiz edilerek belirlenmiştir. Nöro - biyosensörün analizin varyasyon katsayısı % 6,38 ortalama değer ve standart sapması 105,95 ve 6,70 pg / mL olarak hesaplanarak oldukça iyi bir tekrarlanabilirlik kapasitesine sahip olduğu vurgulanabilir.

4.4.3.3. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği

İndirgeniş grafen oksit - altın nanopartikül kompozit katkılı, 11-MUA modifiyeli ITO temelli Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle farklı zamanlarda hazırlanan 6 biyosensör sisteminin 1-500 pg / mL tayin aralığındaki Tau-441 cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda 6 nöro-biyosensörün yanıtlarının Tau-441 için 1-500 pg / mL arasındaki benzer doğrusallığı gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.52' de gösterilen tekrar üretilebilirliğe ait eğimlerin ve interseptlerin relatif standart sapmaları sırasıyla % 3,02 ve % 3,41 olarak bulunmuştur. Tekrarüretilebilir sinyaller, nöro-biyosensörün yanıtı üzerine yapılan çıkarımda yüksek güvenilirlik ve sağlamlık değerlendirilmesinin yapılmasını sağlamaktadır.



Şekil 4. 52. Tau-441 nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirlik sonuçları

Tekrarüretilebilirlik çalışmalarında temel nokta biyoalgılama elemanının biyolojik aktivitelerini koruyarak sensör yüzeyine immobilize hale getirilmesi ve bu sayede tekrarlanan ölçümler alınabilmesidir. Anti-Tau'nun rGO-AuNP nanokompozitinden oluşan platform ve 11-MUA'dan oluşan SAMs tabakası ITO yüzeyine immobilizasyonu, kuvvetli kovalent etkileşimlerle sağlanmıştır. Bu durum nöro-biyosensörün yüksek tekrarüretilebilirlik karakteristiğine sahip olmasında temel etkindir.

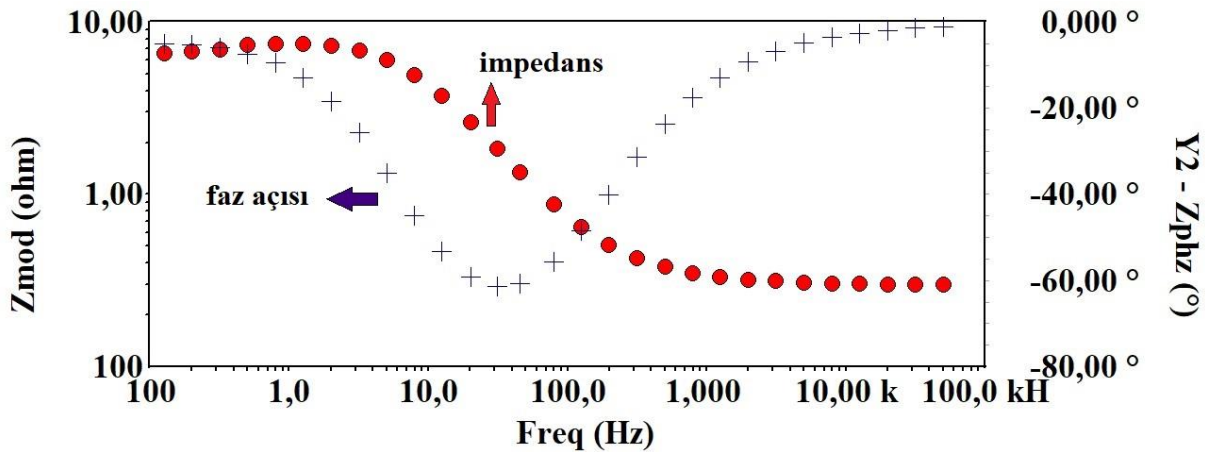
4.4.3.4. Tau-441 nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, Tau-441 antikor-antijen immüno-kompleksini ayrıştırmak için, nanokompozit katkılı 11-MUA modifiyeli ITO elektrotların 5 dakika boyunca 0,05 M pH 3,5 glisin-HCl tamponu içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar 4 döngü boyunca Tau-441'in 100 pg/mL konsantrasyonuna yaklaşık aynı impedimetrik yanıtı verirken, 4. Döngüden sonra elektrot yüzeyinden rGO materyali dökülmeye başlamıştır. Rgo yüzeyden dökülmesi immobilizasyon materyalinin kaybıyla sonuçlanacağından ötürü impedimetrik sinyal kuvvetle düşmüştür. Bu durum, rGO'nun ITO-PET yüzeye adsorbsiyonla tutunmasıyla açıklanabilir.

4.4.3.5. Sabit frekansta impedans analizi

Anti-Tau ile Tau-441 arasında oluşan immunokompleksin kinetiksel davranışı, sabit frekansta non faradayik ortamda impedanstaki ve faz açısındaki değişikliklerin zamana bağlı olarak takip edilmesiyle değerlendirilmiştir.

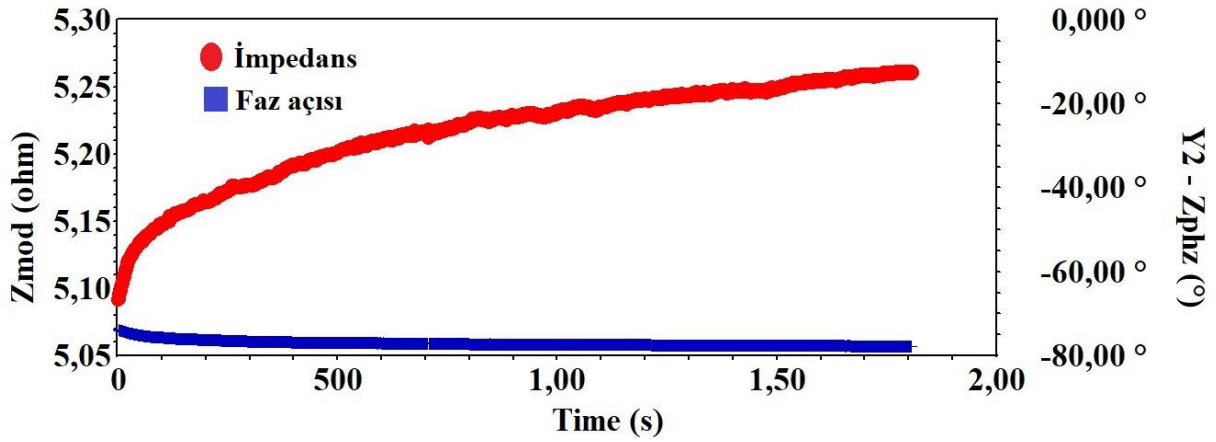
Sisteme uygulanacak frekansın (10 Hz) seçimi ve analizi Bode eğrisi yardımıyla belirlenmiştir. Şekil 4.53' te nöro-biyosensöre ait Bode eğrisini göstermektedir.



Şekil 4. 53.Tau-441 nöro-biyosensörünün bode grafiği

Bode grafikleri, uygulanan çeşitli frekanslarda, elektrot / çözelti arayüzünde meydana gelen kinetik hakkında bilgi sağlar. rGO-ile modifiye edilmiş elektrot, 10 ila 3.000 Hz frekans aralığında, <10 Hz frekansında kapasitif özellikler göstermiştir. Daha sonra anti-Tau ve

akabinde BSA'nın immobilizasyonu ile şekil 4.53'de görülen frekans aralığına kaymıştır, bu kayma immobilizasyonun bir göstergesidir.



Şekil 4. 54. Tau-441 nöro-biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

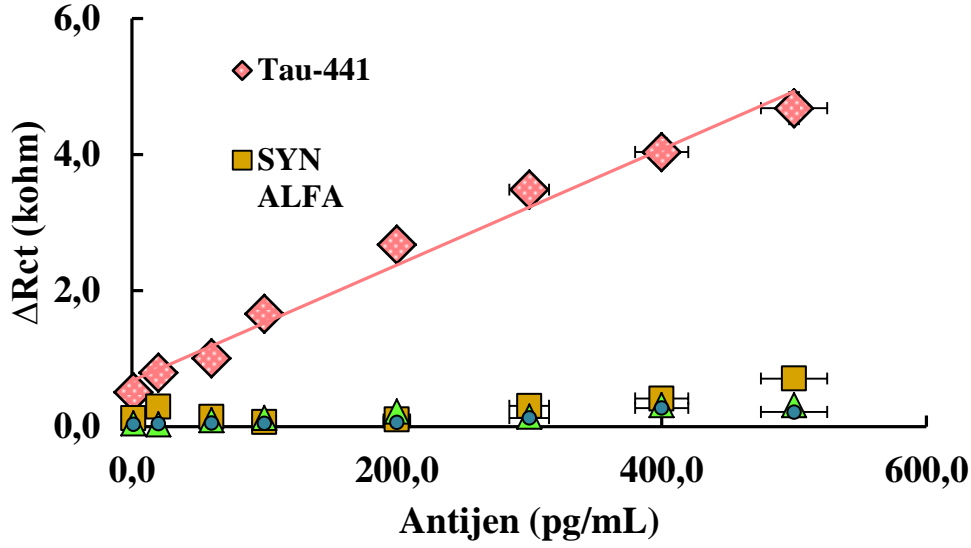
Anti-Tau ile Tau-441 arasındaki immunokompleksin oluşumuna dair 10 Hz'deki impedimetrik takip şekil 4.54'te görüldüğü gibidir. Yaklaşık 2000 s saniye civarında (35 dakika) immunokompleksin oluşumu tamamlanmaktadır. Bu süre sonunda, impedanstaki değişim yaklaşık 250 ohm iken faz açısındaki değişim 4°'dir.

SFI verileri Tau-441'in biyoalgılama platformuyla başarılı bir şekilde etkileşime girdiğinin kanıtlar niteliktedir.

Sabit frekanslı impedans analizi, tek bir frekansın, sinyal edinimi ve işlenmesindeki karmaşıklığı azaltmak için kullanılan bir EIS tekniğidir, bu da onu uygun, basit ve ucuz bir analiz tekniği haline getirmektedir. Böylece, hem klinik hem de saha deneyleri için hızlı yanıt, düşük maliyet ve yüksek analiz gücü gibi imkanlar sunmaktadır (Hühmer ve ark. 2006).

4.4.3.6. Tau-441 nörobiyosensörünün seçiciliği

Seçicilik, sensörün veya biyosensörün, analitik ortam veya numune matrisi olarak adlandırılan bir molekül grubundan hedef molekülü tercih ederek algılayabilme yeteneğidir (Njagi ve Kagwanja 2011).



Şekil 4. 55. Tau-441 nöro-biyosensörünün farklı antijenlere karşı gösterdiği seçicilik

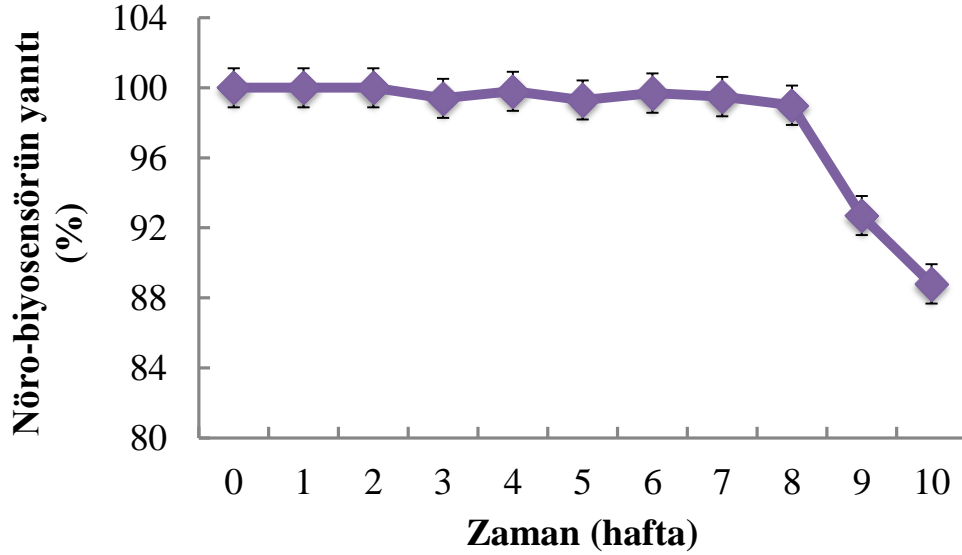
Şekil 4.55, HSP-70, SYN alfa ve RACK-1 ün nöro-biyosensöre spesifik olmayan çok küçük bir katkısı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte anti-Tau immobilize edilmiş altın nanopartikül-rGO nanokompozit katkılı yüzeye en çok afinitesi olan protein SYN alfa olmuştur. Tau-441 ile SYN alfa'nın bazı aminoasit kalıntılarının benzerliği bu afiniteye sebep olmuş olabilir. Nonspesifik etkileşimlerin toplam Rct yanıtına olan bu ihmal edilebilir katkısı, biyosensörün spesifik hedef Tau-441'e karşı iyi bir seçiciliğe işaret etmektedir.

Bir biyosensörün, bir hedef analiti karmaşık bir matriste diğer türlerden ayırt etme yeteneği, gerçek zamanlı izlemede başarılı uygulamasının anahtarıdır. İmmunokompleks oluşumu seçici olabilmesine rağmen, sinyal iletme süreci genellikle diğer istenmeyen maddelerin (müdahaleler) varlığı ve bunların elektron transfer yolu üzerindeki etkileri ile engellenir. Bu bakımdan, rGO-AuNP nanokompozit katkılı 11-MUA ile modifiyeli edilmiş algılama yüzeyinin sistemin seçiciliğine ciddi katkı sağladığı düşünülmektedir.

4.4.3.8. Tau-441 alfa nöro-biyosensörünün depo ömrü

Kararlılık - bir biyosensörün, zamanla aynı analit konsantrasyonu ile tekrar tekrar işlendiğinde aynı büyüklükteki sinyali üretme kabiliyetidir (operasyonel kararlılık). Ayrıca belirli bir depolama süresi boyunca (depolama veya uzun süreli stabilite) sensör hassasiyetini aralıklı olarak izleyerek de değerlendirilebilir.

rGO-AuNP ile nanokompozit oluşturulup 11-MUA ile modifiye edilerek geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin Tau-441'in aynı konsantrasyonu (100 pg/mL) ölçme kabiliyeti 10 hafta boyunca takip edilmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4. 56. Nöro-biyosensörün depolanma stabilitesi

Sistemin kararlılığını 8 hafta boyunca koruduğu, 9. Haftadan itibaren impedans sinyalinde minimal azalma meydana geldiği görülmüştür. Bu durum, geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin iyi bir depolama kapasitesi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte sinyalde meydana gelen azalmalar, yüzeyde adsorbe halde bulunan rGO'nun zaman için adsorbsiyon kuvvetini kaybetmesi ve dolayısıyla algılama biriminin bozulmasıyla ilgili olabilmektedir.

4.4.3.9. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamaları

Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik validasyonu, Namık Kemal Üniversitesi Nöroloji polikliniğine başvuran hastalar arasında random yöntemle toplanan beyin omurilik sıvısı (BOS- 4 adet) ve serum örneklerinde (6 adet) Tau-441 analizinin yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Üretilen nöro-biyosensörün fizibilite ve analitik güvenilirliğini değerlendirmek için gerçek örnekler, insan serebrospinal sıvısında ve serum sıvısında standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı Tau-441 konsantrasyonlarının (100 pg / mL ve 400 pg /

mL) BOS ve serum örneklerine eklenmesi ve EIS tespitinin ardından bağıl standart sapma ve geri elde analitiksel değerleri kalibrasyon grafiği yardımı ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 16. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminde BOS ve srum örneklerinde Tau-441' in tayin sonuçları

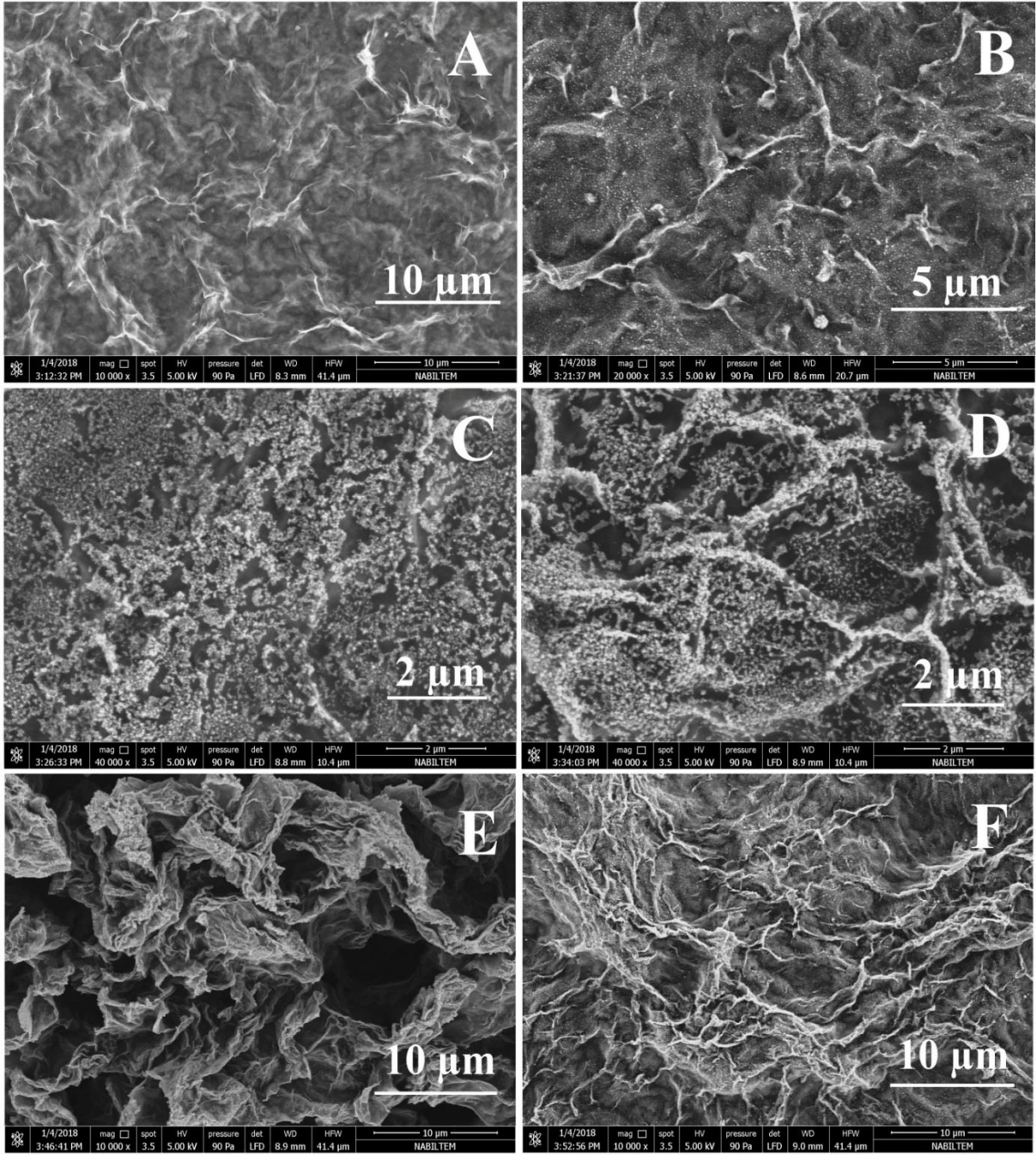
BOS örnek numarası	Tau-441 ölçülen miktarı (pg.mL-1)	Standart eklenen miktar (pg.mL-1)	Ölçülen miktar (pg.mL-1, n=3)	RSD (% , n=3)	Geri elde (%)
1	242	100	355,5 / 341,5 / 333,8	3,20	101,6
		400	695,5 / 633 / 648,8	4,93	102,6
2	188	100	302 / 295,5 / 277,7	4,31	101,29
		400	566 / 555,4 / 572,6	1,53	96,1
3	303,5	100	414,5 / 422,3 / 407,7	1,76	97,2
		400	705,5 / 717,7 / 726,6	1,47	102
4	395,7	100	501,1 / 492,5 / 523,3	3,14	101,99
		400	848 / 805,5 / 846,2	2,88	104,77
serum örnek numarası	Tau-441 ölçülen miktarı (pg.mL-1)	Standart eklenen miktar (pg.mL-1)	Ölçülen miktar (pg.mL-1, n=3)	RSD (% , n=3)	Geri elde (%)
1	11,5	100	120 / 115,5 / 119,6	2,10	106,15
		400	695,5 / 633 / 648,8	2,69	100,2
2	22,7	100	125,5 / 133,3 / 136	4,14	107,25
		400	425 / 433,5 / 420,6	1,52	100,9
3	10	100	115 / 122,2 / 107,7	6,30	104,5
		400	417,7 / 407,9 / 415	1,22	101
4	15,9	100	122 / 132,5 / 123,3	4,54	108,65
		400	422 / 415,5 / 426,2	1,27	101,3
5	25,5	100	132,5 / 132,5 / 143,3	4,58	108,4
		400	425,5 / 435,5 / 436,9	1,43	101,7

Tau'nun sağlıklı erkek ve kadınların BOS'taki ortalama değerinin 250 pg/mL (Sjögrenve ark. 2001) serumdaki ortalama değerinin 15 pg/mL (Chiu ve ark. 2017) olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar baz alındığında, örneklerde herhangi bir seyreltme işlemi yapılmamıştır. Standart ekleme yöntemi ile alınan sonuçlar çizelge 4.16' da gösterildiği gibidir.

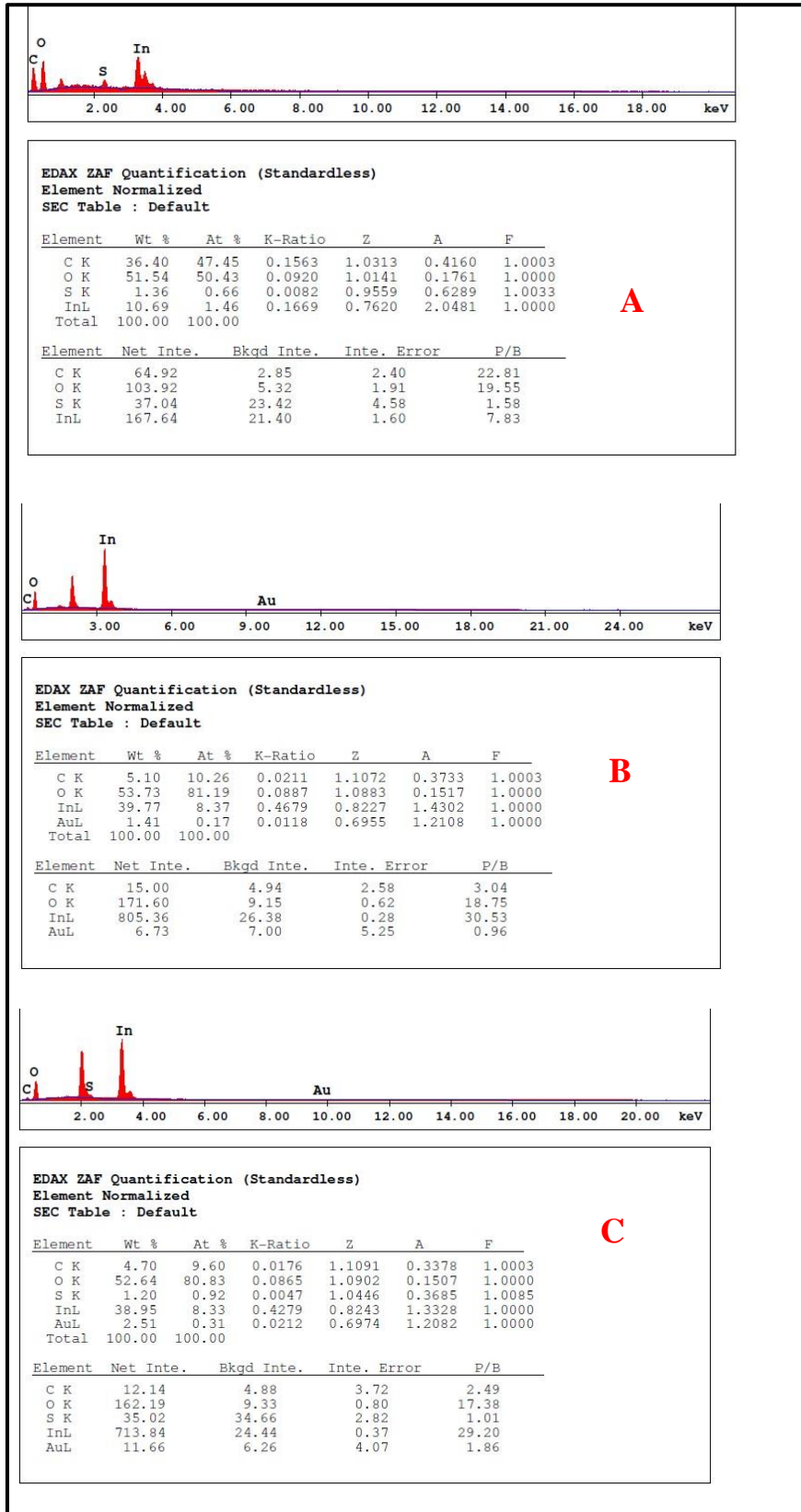
Çizelge incelendiğinde geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin BOS ortamında daha hassas yanıtlar verdiği görülmektedir. Bununla birlikte serum ortamında düşük Tau-441 (100 pg/mL) eklenmesi standart sapmaya pozitif yönde etkilemekte, eklenen konsantrasyon arttıkça (400 pg/mL) sensörün ölçüm hassasiyeti artmaktadır. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde rGO-AuNP nanokompozit-11-MUA modifiyeli nöro-biyosensör sisteminin Alzheimer biyobelirteci olan Tau-441'in klinik alanda kullanımı hususunda umut vaat ettiği belirtilebilir.

4.4.3.10. SEM görüntüleri

Nöro-biyosensör sisteminin adım adım geliştirilmesi esnasında yüzeyde meydana gelen morfolojik değişiklikler taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.57). Şekil A, yalın ITO yüzeyinde rGO'nun adsorbsiyonunu göstermektedir. Bu görüntü literatürdeki rGO çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (**Liu ve ark. 2012; Liu ve ark. 2014**). rGO adsorbe edilmiş yüzeyde altın nanopartikül biriktirildikten sonra oluşan çilli görüntü, nanopartiküllere işaret etmektedir (B). rGO-AuNP kompozit yapısı 11-MUA ile muamele edilince yüzeyin formasyonu tekrar değişmiş şekil C deki halini almıştır. Anti-Tau'nun yüzeye immobilizasyonu neticesinde yapının kazandığı globüler form D'de açıkça görülmektedir. BSA'nın non-spesifik adsorbsiyonları önlemek amacıyla yüzeye immobilize edildiği adımda, yüzeyin morfolojisi Şekil E'ye dönüşmüştür. Tau-441'in yüzeyle olan immuno etkileşimi yüzeyin morfolojisini Şekil F'de görüldüğü üzere dallı budaklı görüntüye kavuşturmuştur.



Şekil 4. 57. Nöro-biyosensör tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO/rGO, (B) ITO/rGO/AuNP, (C) ITO/rGO/AuNP/11-MUA, (D) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/Anti-Tau, (E) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/Anti-Tau/BSA, (F) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/Anti-Tau/BSA/Tau-441

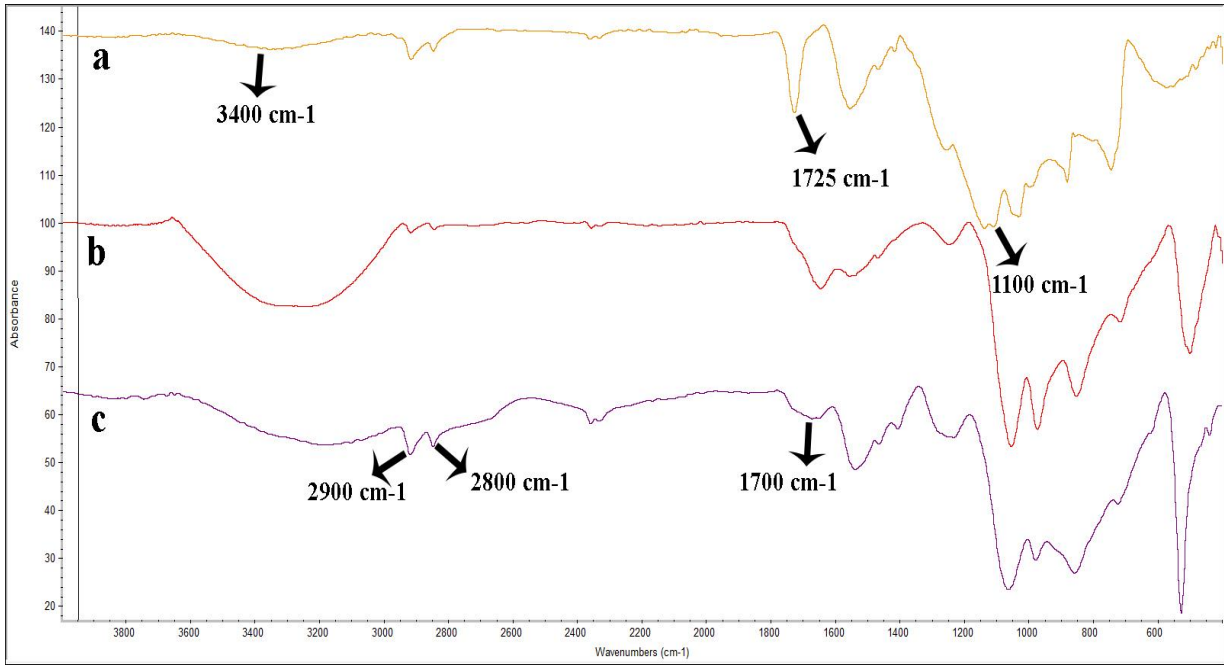


Şekil 4. 58. rGO, AuNP ve 11-MUA adımlarına ait EDX spektrumları

EDX spektrumları, tek kullanımlık ITO-PET elektrotlar yüzeyinde sırasıyla rGO, AuNP ve 11-MUA'nın oluştuğunu desteklemektedir.

4.4.3.11. FTIR sonuçları

Tau-441 tayinine yönelik nöro-biyosensör geliştirilirken, oluşan bağlar FTIR ile takip edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.59' da gösterilmektedir.



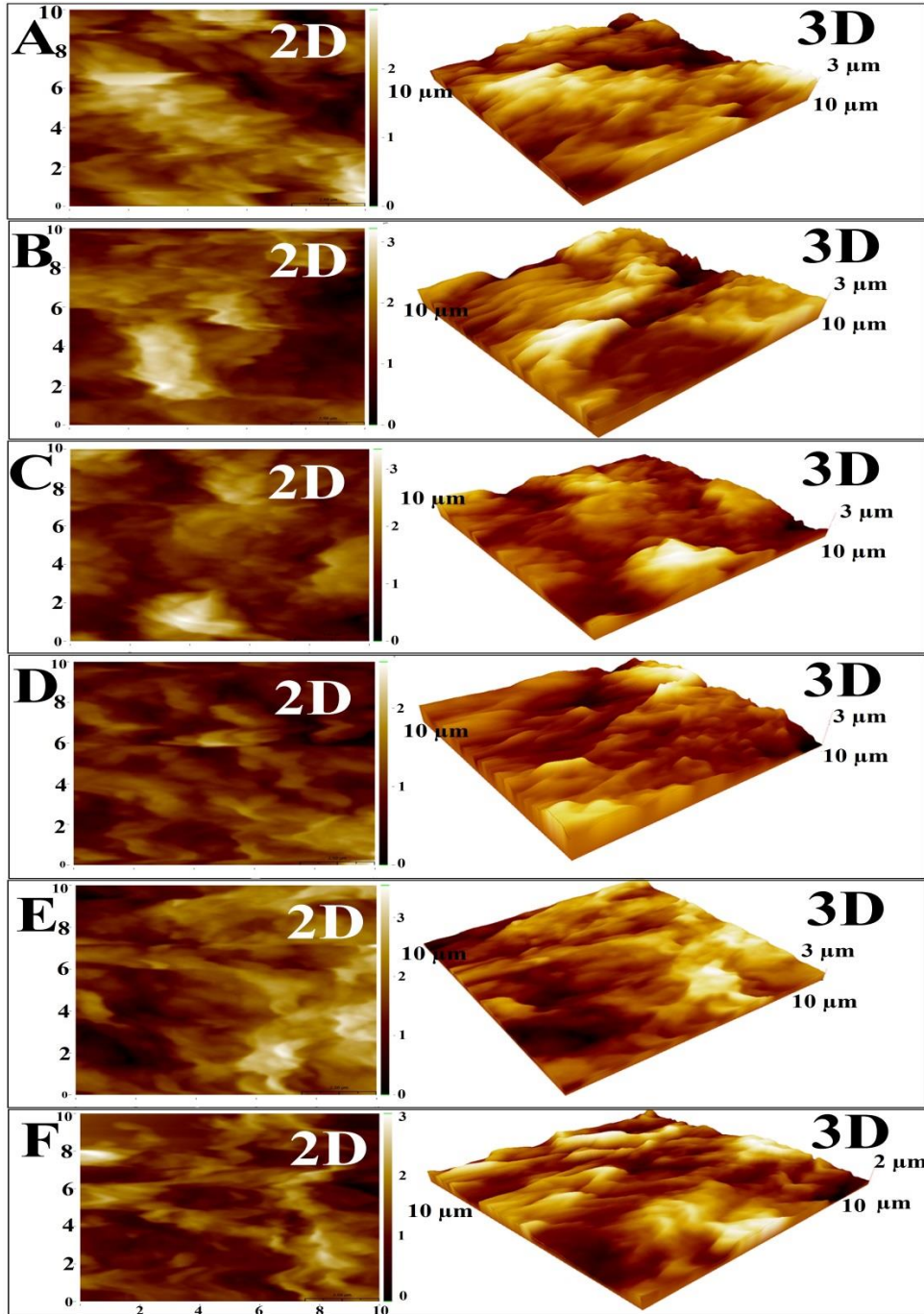
Şekil 4. 59. Tau-441 nöro-biyosensörünün FTIR spektrumu

Şekil a rGO adımına ait, b AuNP adımına ait ve c ise 11-MUA adımına ait FTIR spektrumlarıdır. a'daki 3400 cm⁻¹ deki bant -OH'a ait gerilme bvedır. 1725 cm⁻¹deki bant C=O 'ya ait olduğu düşünülmektedir. 1100 cm⁻¹deki pik C-O bağına ait piktir. Tüm bunlar, yapının rGO'ya ait olduğunu destekler niteliktedir.

Şekil c, yüzeyde 11-MUA ile SAM oluşturulduktan sonra elde edilen FTIR spektrumudur. 2900 cm⁻¹ deki pik C-H bağına ait gerilme pikidir, 2800 cm⁻¹de pik ise CH₂-S'e ait piktir ve bunların birlikte analizlenmesi yapının bir alkoksitiyol olduğunun göstergesidir. 1700 cm⁻¹deki pik ise -COO gruplarının spesifik pikidir. Tüm bu analizler, yapının 11-MUA içerdiğini destekler niteliktedir.

4.4.3.12. AFM sonuçları

Tau-441 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin yüzey morfolojisi, AFM ile de değerlendirilmiştir (Şekil 4.60).



Şekil 4. 60. Tau-441 nöro-biyosensörünün tasarım adımlarına ait AFM görüntüleri (A) ITO/rGO, (B) ITO/rGO/AuNP, (C) ITO/rGO/AuNP/11-MUA, (D) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau441, (E) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau441/BSA, (F) ITO/rGO/AuNP/11-MUA/anti-Tau441/BSA/Tau-441

Tau-441 nöro-biyosensörü geliştirilirken yüzey pürüzlülüğünde meydana gelen değişiklikler yüzey pürüzlülüğünün karekök ortalaması (rsm) ile değerlendirilmiştir. rGO ile yüzeyin iletkenlik kazandığı adıma ait rsm değeri 0,54 μm iken, yüzeyde altın nanopartikül biriktirildikten sonra 0,48 μm olmuştur. Anti-Tau'nun immobilizasyonu ile yüzeyde yalıtkan bir tabakanın oluşması rsm değerine 0,32 μm olarak yansımıştır. En son adımda Tau-441'in biyoalgılama birimi ile etkileşmesi neticesinde rsm değeri 0,29 μm gerilemiştir. Tüm bu veriler ve AFM görüntüleri yüzeyde nöro-biyosensör oluşumunu destekler niteliktedir.

4.4.3.13. Tau-441 Nöro-biyosensörünün literatürdeki yeri

Tasarlanan Tau-441 Nöro-biyosensörünün literatürle kıyaslaması Çizelge 4.17' de verilmiştir.

Alzheimer hastalığında Tau proteinin agregasyonu ve yumaklar oluşturması, hastalığın kilit noktalarındandır. Bu proteinin vücut sıvılarındaki miktarının hastalığın erken tanısında önemli olabileceğini rapor eden pek çok çalışma mevcuttur. Fakat, literatürde Tau tayinine yönelik elektrokimyasal temelli biyosensör sistemi oldukça azdır. Bu doktora tezi kapsamında geliştirilen Tau-441 tayinine yönelik nöro-biyosensör sisteminin bu bakımdan literatüre katkısı açıktır. Ayrıca biyosensörün dizaynında kullanılan algılama platformu Tau-441'in tayin sınırını 0,091 pg/mL olarak elde edilmesini sağlamıştır ki bu noktada literatürdeki çalışmalardan öne çıkmaktadır. Ayrıca geliştirilen nöro-biyosensör sistemi hem serum ortamında hem de BOS ortamında bulunan Tau-441 miktarlarını analizleyerek, klinik uygulanabilirlik potansiyelini ispatlamıştır. Bu bakımdan oldukça kıymetli olan bu çalışma, umut vaat edicidir.

Çizelge 4. 17. Literatürde bildirilen çeşitli Tau biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması.

Elektrot konfigürasyonu	İmmobilizasyon yöntemi	Ölçüm yöntemi	Tayin Aralığı	LOD	Referans
Altın nanopartikül modifiye	tau-tau etkileşimi	EIS	0.2 -1.0 uM	0,001 µm	(Esteves-Villanueva ve ark. 2014)
Altın mikroband elektrot	Protein G tabakası	EIS ve CV	0,0001 - 1000 pM	0,03 pM	(Wang, Acha ve ark. 2017)
Altın film	3-MPA SAMs	DPV	1000 pg/mL-100000 pg/mL		(Katz ve Willner 2003)
rgo-Aump katkılı ITO elektrot	11-MUA ile SAMs	EIS ve CV	1-500 pg/mL	0,091 pg/mL	

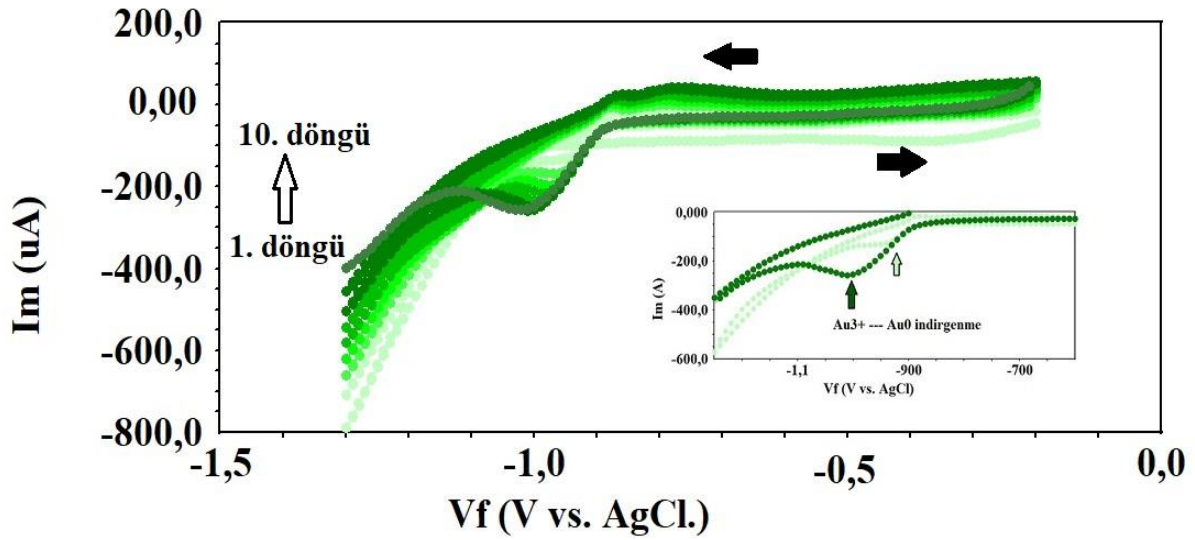
4.5. PARK-7 (DJ-1) tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sistemi

4.5.1. Nöro-biyosensörün üretim adımlarının EIS ve CV ile ispatı

Parkinson hastalığının önemli bir biyobelirteci olan PARK-7 (DJ-1) tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin ilk adımı elektrotların daha önceki başlıklarda belirtilen şekillerde temizlenmesidir. Temizlenen ve iyice kurutulan elektrotlar yüzeyinde aktif- OH grupları ve akabinde altın nanopartikül birikimi daha önceki başlıklarda bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Altın nanopartikül katkılı ITO elektrotlar yüzeyinde 11-AUT ile SAMs tabakası gece boyunca inkübasyon neticesinde oluşturulmuştur. Daha sonra amino-tiyol fonksiyonelli elektrotlar sulu SDS çözeltisinde sonikasyonla disperse edilen çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) (EDC-NHS ile aktifleştirilmiş) ile muamele edilmiştir. Altın nanopartiküller, elektronları elektroaktif biyolojik tür ile elektrot arasında transfer etme yeteneğine sahiptir. Altın nanopartikülleri bir nevi elektron servislerine benzetmek mümkündür; biyoaktif türün redoks merkezine redoks reaksiyonuna katılan elektronları elektrota transfer ederek yaklaşabilir. Çok duvarlı karbon nanotüp ise biyosalgılama biriminin aktif bölgesine yaklaşmak ve onu elektrota bağlamak için, gelişmiş kapasitelere sahiptir. Dahası, kolayca fonksiyonelleştirilebilmesi, biyomoleküller için spesifik yerleşim yerleri veya biyoelektrokimyasal reaksiyonların redoks aracılığıyla gibi nanoyapılı elektrotlara yeni özellikler getirmektedir (**Holzinger ve ark. 2014**). MWCNT'nin redoks merkezine yaklaşabilmesi hızlı ve etkili elektron transferinin önünü açmaktadır. MWCNT ile modifiye edilmiş elektrotta anti- PARK-7'nin immobilizasyonunda itici güç hidrofobik etkileşimlerdir.

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen bu nöro-biyosensör sisteminde SAMs tabakasının (11-AUT ile) moleküler düzende sergilediği kusursuz paketlenme özelliğinden; altın nanopartikülün iletken özelliği sayesinde redoks aracılığı rolünden ve MWCNT'nin ise sahip olduğu yüksek yüzey-hacim oranı, düşük konsantrasyonlarda dahi PARK-7'nin çok hızlı bir şekilde tespit edilmesini mümkün kılması özelliğinden faydalanması amacıyla bir araya getirilmiştir.

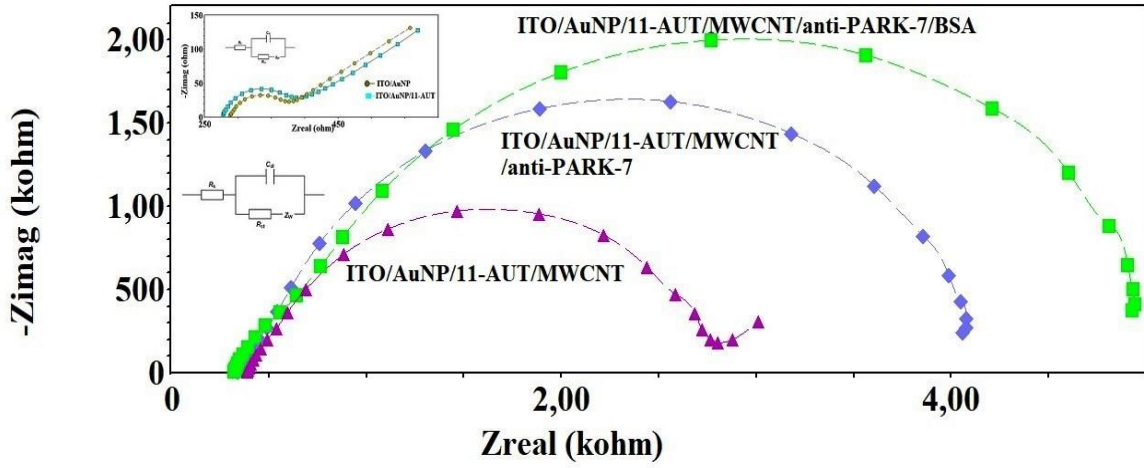
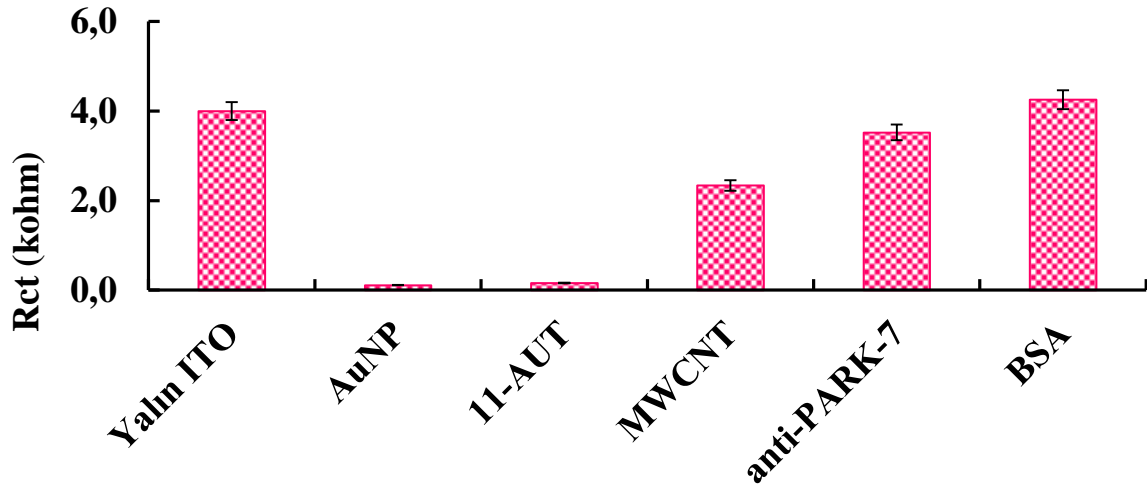
Şekil 4.61 ITO yüzeye elektrokimyasal biriktirme işlemi ile Au nanopartiküllerin elektrokimyasal sentezi sırasında kaydedilen döngüsel voltammogramları açıkça göstermektedir.



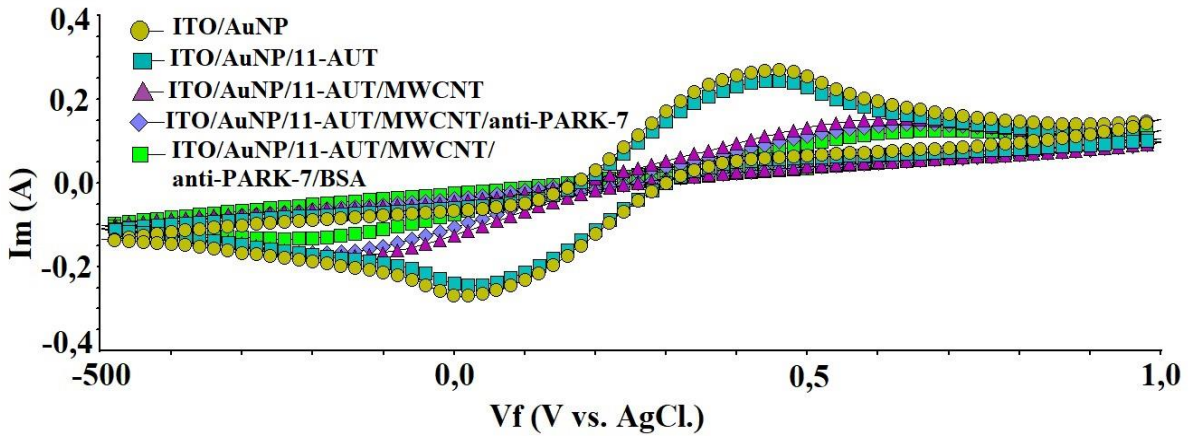
Şekil 4. 61. ITO elektrot yüzeyine altın nanopartikül kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar ve ilerleyen döngü sayısı ile birlikte kayan indirgenme potansiyeli

Başlangıçta (1.döngüde), Au'nun indirgenmesi, Ag / AgCl referans elektroduna karşı yaklaşık -935 mV'de meydana gelmiştir, ancak tekrarlayan tarama döngüleri ile birlikte indirgenme potansiyeli, birikim üzerindeki çekirdeklenmeye bağlı olarak, son döngüde -1,005 V'a (Şekil 4.61) kaymıştır. Bu kayma yüzeyde altın nanopartikülün biriktiğinin göstergesidir.

ITO-PET yüzeyinde altın nanopartiküller elektrokimyasal olarak biriktirildikten sonra, yüzeyde SAM tabakası 11-aminoundekanetiol ile oluşturulmuştur. Au ile- SH fonksiyonel grubu arasında kovalent etkileşim gece boyu inkübasyonla sağlanmıştır. Daha sonra elektrotlar EDC-NHS ile aktifleştirilmiş –MWCNT ile muamele edilip, yüzeyde fonksiyonel –COO gruplarının oluşması sağlanmıştır. Anti-PARK7, MWCNT modifiyeli yüzeye immobilize edildikten sonra, aktif terminal uçları nihayetledirme ve non-spesifik bağlanmaların önüne geçmek için BSA kullanılmıştır. PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensörün inşasına ait adımların EIS'dan alınan impedans spektralleri, her adıma ait yük transfer değişimleri ve CV alınan voltamogramları Şekil 4.62' de gösterilmiştir.

A**B**

Nöro-biyosensörün fonksiyonelleştirilmesi

C

Şekil 4. 62. PARK-7 nöro-biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının gösterimi (A) elektrokimyasal impedans spektrumu, (B) her adıma ait Rct değerleri (C) döngüsel voltamogramlar

ITO-PET elektrotların yüksek yalıtkan özellikleri elektron transferine izin vermemektedir bu durum yük transfer direncinin yüksek olmasına sebep olur (yaklaşık 40 kOhm, Şekil 4.62B). Elektrotların yüzeyinde elektrokimyasal olarak altın nanopartikül biriktirilmesi, elektrotlara iletkenlik kazandırarak, yük transfer direncinin azalmasını sağlamıştır (yaklaşık 100 ohm). Altın nanopartiküllerin iletkenlik özellikleri proteinlerin ve elektrotların aktif merkezleri arasındaki elektron transferini güçlendirir ve böylece elektron transferinde “elektron telleri” olarak işlev görür. Düz altın yüzeylerle karşılaştırıldığında, altın nanopartiküller daha yüksek bir yüzey alanına sahiptir; daha büyük miktarda proteinin yüklenmesine izin verir ve potansiyel olarak daha hassastır (**Li ve ark. 2010**). Düz ve yapılandırılmış altın yüzeylere ek olarak, tiyol modifiyeli nanopartiküller, hem bimoleküler antikörlerin son derece seçici tanıma özelliklerini hem de nanopartiküllerin benzersiz elektronik ve fotonik özelliklerini taşıyan bir hibrid nanomateryal geliştirerek moleküler tanıma sistemleri oluşturarak platformlar olarak kullanılabilir (Spampinato ve ark. 2016). 11-aminoundekanethiol ile muameleden sonra altın nanopartikül kaplı ITO elektrotların yük transfer direnci çok az artmıştır (Şekil 4.62A-B). Sülfür ve altın arasındaki etkileşimin, tiyol (-SH) grubunun metalik altın yüzeye oksidatif olarak eklenmesi ve ardından hidrojenin indirgenmesi ile devam ettiği düşünülmektedir (**Santiago-Rodríguez, ve ark. 2010**). Tiyol molekülleri Au üzerinde güçlü bir tiyolat - Au bağı (40-50 kcal) ile kemisorbiye edilir. Hidrokarbon zincir omurgasındaki CH₂ birimlerinin (n) sayısındaki artış, SAM oluşumunu önemli ölçüde artırır (**Pensa ve ark. 2012**). Au-S etkileşiminde başka bir olasılık ise, hidrojenin suya oksidatif dönüşümüdür. Tek tabakanın ara parçası bileşeni, adsorbe edilen molekülün iskeletidir ve diğer komşu moleküller ile van der Waals etkileşimi ve bazı durumlarda hidrojen veya p-p etkileşimleri ile etkileşir. Ara parçalar arasındaki bu etkileşimler, tek tabakanın organizasyonuna katkıda bulunur. Kuyruk grubu, tek tabaka formasyonun ardından yüzeye maruz bırakılan molekülün terminal grubunu ifade eder. Bu kısım müteakip reaksiyonlarda yer alır ve aynı zamanda yüzey özelliklerinin değiştirilmesine de katkıda bulunur. Bu nöro-biyosensörde kullanılan 11-AUT ajanında terminal grup; amin gruplarıdır. Pozitif amino grupları negatif redoks probunu çekerek, elektronların yüzeye difüzyonunu oldukça olanaklı kılmış, bu durum yük transfer direncinin altın nanopartikül adımına göre neredeyse hiç değişmemesi olarak neticelenmiştir (Şekil 4.62A).

11-AUT ile modifiye edilen elektrotlar EDC-NHS ile karboksilat grupları aktifleştirilmiş MWCNT ile muamele edilmiştir. 11-AUT ta bulunan amino terminal gruplar ile MWCNT bulunan aktif -COO gruplarının bir kısmı amit bağı oluştururken, bağ

oluşturmayan aktif –COO grupları redoks probunun yüzeye difüzyonunu kısmen zorlaştırmıştır, bu durum yük transfer direncinde artışa sebep olmuştur (Şekil 4.62B). Altın elektrot yüzeyinde 11-AUT ile SAM oluşturulması akabinde MWCNT ile elektron transferinin şu şekilde gerçekleşme ihtimali söz konusudur: (1) altından MWCNT'lere elektron tünelleri, (2) MWCNT'ler içinde elektron transferi ve (3) MWCNT'lerin yan duvarlarından ve uçlarından elektroaktif türlere elektron transferi. MWCNT'lerdeki büyük p-konjuge sistemi, yapının elektron alıcıları ve donörleri olarak hareket etmelerini sağlamaktadır (Diao ve ark. 2002).

ITO elektrotlar yukarıda belirtildiği şekilde modifiye edildikten sonra, anti-PARK-7'nin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aktif –COO grupları ile –NH₂ arasındaki amit bağı, yüzeyde iyi bir paketlenmeye eşlik ederek elektronların transferini güçleştirmiştir. İmpedans spektrumunda da görüleceği üzere, alınan bu sonuç anti-PARK-7'nin hibrit yüzeye başarılı bir şekilde immobilizasyonunu destekler niteliktedir. Fonksiyonel terminaller ve non spesifik bağlanmalarının önüne BSA ile muamele ile geçilmesi hedeflenmiştir ve bu durum oluşan protein bariyerinden ötürü yük transfer direncinin bir kez daha artırmıştır. (Şekil 4.62A)

Redoks probunun heterojen elektron transfer hızı sabiti değeri (k^0), nanokompozit filmde meydana gelen elektronik taşıma işlemi doğrulamak için kullanılan önemli bir faktördür. Nöro-biyosensörün üretim adımlarına ait k^0 değeri eşitlik 4.5.'e göre hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 18. Nöro-biyosensörün tasarım adımlarına ait impedimetrik parametreler

Nöro-biyosensör adımı	Ru (ohm)	C _{dl} (µF)	k ⁰ (m.s ⁻¹)
ITO/AuNP	308,7±2,162	12,12± 0,8191	2,11×10 ⁻⁸
ITO/AuNP/11-AUT	293,6± 2,276	4,05± 0,264	1,34×10 ⁻⁷
ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT	416,9±2,861	3,42±0,0513	9,1×10 ⁻⁹
ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7	374,2±2,559	3,05±0,047	6,0×10 ⁻⁹
ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7/BSA	358±2,409	2,58±0,061	5,0×10 ⁻⁹

Çizelge 4.18' de görüleceği üzere, ITO elektrot yüzeyinde altın nanopartikül biriktirilmesi ve akabinde 11-AUT ile SAM oluşumu yüksek bir k^0 değeri göstermiştir ki bu durum artmış elektron taşınımının bir neticesidir. Akabinde anti-PARK-7'nin immobilizasyonu, k^0 değerinde ($6,0 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}$) belirgin bir düşüş gösterir bu; protein moleküllerinin yalıtım özelliğinden kaynaklanan yavaş elektron taşınımını ve biyoalgılama biriminin oluşumunu doğrular niteliktedir.

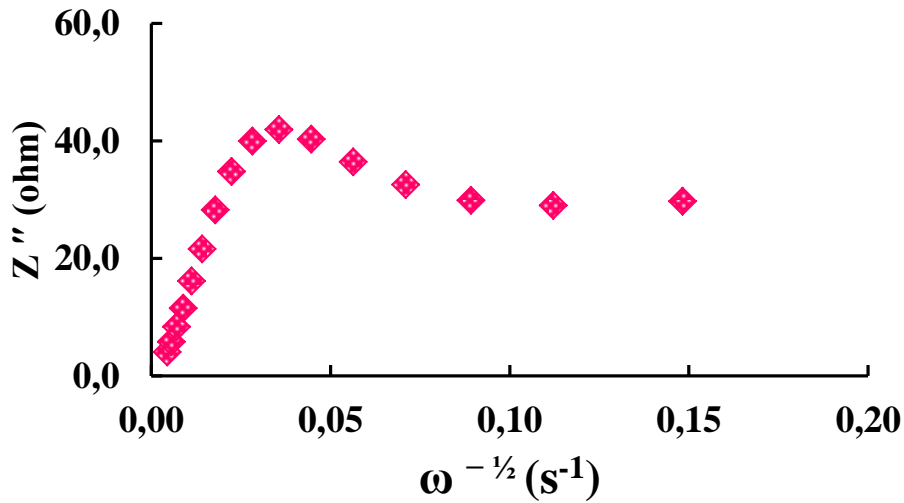
AuNP, 11-AUT, MWCNT'den oluşan nöro-biyosensör sisteminde ilerleyen adımlar ve nihayetinde anti-PARK-7'nin algılama yüzeyine immobilizasyonu, çift yüklü tabaka kalınlığını artırır ve redoks probunun ara yüzey elektrokimyasal sürecini inhibe eder. Elektrot kapasitansı, C_{dl} düşerken elektron transfer direnci, R_{ct} sırasıyla artmaktadır. Bu durum geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin verdiği impedimetrik davranışın neticesidir.

Nöro- biyosensör sisteminin adım adım gelişimi döngüsel voltametri ile de takip edilmiştir (Şekil 4.62C).

PARK-7 tayinine yönelik nöro-biyosensör sistemi geliştirilirken anodik ve katodik dalgalar arasında meydana gelen pik potansiyel ayrımı eşitlik 4.6'ya göre hesaplanmıştır: Bu eşitliğe göre, 100 mV/s tarama hızında altın nanopartikül kaplanması ardından 11-AUT ile modifiye edilen elektrodun ΔE_p değeri 0,43 V iken, MWCNT ile modifiye edildikten sonra ΔE_p değeri artmış ve 0,78 V'a yükselmiştir ki elektron aktarım hızı ile ters orantılı olan pik potansiyeli ayrımı, elektrotun iletkenliğinin elektrokimyasal değerlendirmesi için kullanılır. Bu yükseliş MWCNT tabakasının sahip olduğu aktif karboksilik terminallerden dolayı iletkenliği büyük orvea düşürdüğünün kanıtıdır. Anti-PARK-7'nin immobilizasyonundan sonra ise ΔE_p değeri 0,88 V'a yükselerek, immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini döngüsel voltametri tekniği açısından destekler niteliğe kavuşmuştur.

Şekil 4.62A içine yerleştirilen impedans spektrumundan görüleceği üzere, altın nanopartikül biriktirilen elektrodun, yüksek frekans bölgesinde küçük bir yarım daire şeklinde düşük frekanslı bir düz çizgi göstermesi, elektron transfer işleminin esas olarak difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte aynı yüzeyde 11-AUT ile SAM oluşturulduktan sonra redoks türüne karşı kısmi bir bloklama etkisi olduğu görülmektedir.

İmpedans verileri, tek tabakalı elektrotların yüzey kaplamasının ve diğer kinetik parametrelerinin belirlenmesinde faydalı araçlardır. Yüzeyinde altın nanopartikül elektrokimyasal olarak biriktirilen ITO elektrotların 11-AUT ile SAM oluşturması aşamasından sonra yüzey kaplama değeri ve pinhol sonuçları EIS verilerinden faydalanılarak başlık 4.4.1 altında verilen eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır. Buna göre 11-AUT ile SAM oluşturulduktan sonra θ_{eis} değeri 0,9946 olarak bulunmuştur. Pinhollerle ilgili veriler $Z'' - \omega^{-1/2}$ grafiği yardımı ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.63). Pinholün yarı çapı 1,63 μm bulunurken iki pinhol arası mesafe 22,18 μm olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerlerle 11-AUT ile yüzeyin çok iyi kapladığı ve minimum oranda defekt içerdiği sonucuna varılabilir. Yüzeyin düzenli ve minimum defektle paketlenmesi, Au-S arasındaki bağın kuvvetine ve 11-AUT ta bulunan fazla $-\text{CH}_2$ gruplarının yapıyı stabilize etmesi ile açıklanabilir. SAM tabakası oluşturulacak alkaetiyollerde karbon sayısı azaldıkça defekt ve pinhollerin arttığı, yüzey kaplama oranının azaldığı rapor edilmiştir (Campuzano, Pedrero ve ark. 2006; Ganesh, Pveey ve ark. 2008).



Şekil 4. 63. 11-AUT ile modifikasyon adımı için $Z'' - \omega^{-1/2}$ grafiği

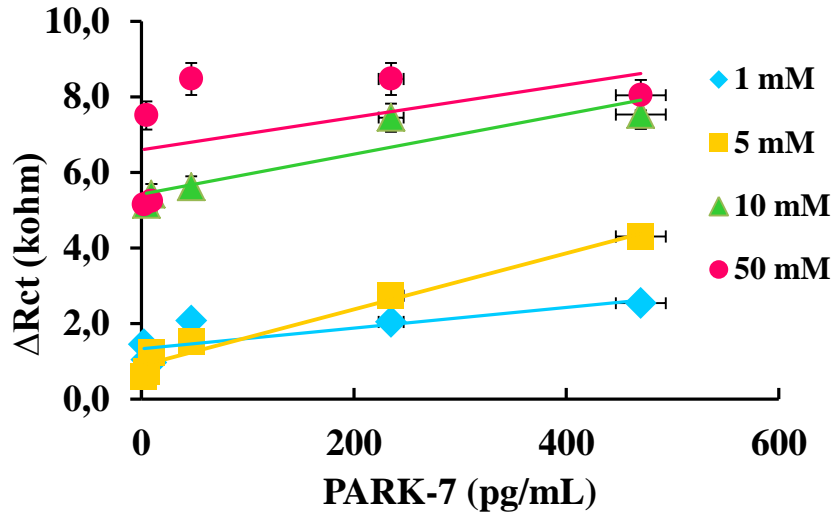
4.5.2. PARK-7 nörobiyosensörünün optimizasyon parametreleri

4.5.2.1. Optimum 11-AUT konsantrasyonu

11- AUT molekülünün substrat için sahip olduğu kimyasal afinite, bir SAM oluşumu için ana itici güçtür. SAM'lar sundukları birçok avantajdan dolayı kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır; kolay bir şekilde üretilmesi, yoğun bir şekilde paketlenmesi, iyi yönlendirilmiş ve yüksek orvea üretilen tek tabakalar olması gibi özellikler sayılabilir. Ayrıca, SAM'lerin kalınlığı kolaylıkla kontrol edilebilir ve SAM'lerin özellikleri sentetik yöntemlerle değiştirilebilir. Ek olarak, güçlü zincirler arası etkileşimler (van der-Wall etkileşimleri), kimyasal algılama da dahil olmak üzere çeşitli uygulamalara yol açan sıkı paketlenme ve stabilite sağlayan tekli katmanların elde edilmesini sağlamaktadır (**Chaki ve Vijayamohanan 2002**).

İdeal algılama matrisi, kinetik ve sterik kısıtlamaları en aza indirmek için onları yönlendiren ve onları konumlandırarak inert bir matriste desteklenen reseptör moleküllerinden oluşmaktadır. Sistem iyi bir şekilde organize olmadığında, reseptör molekülünün uygun olmayan reaktif bölgeleri açığa çıkabilir ve bu nedenle daha spesifik olmayan adsorpsiyonlar kaçınılmaz olur. Bu durumun önüne geçmek adına ilk adım, 11-AUT konsantrasyonunun optimize edilmesidir. Bu amaçla, AuNP kaplı ITO elektrotlar oda sıcaklığında gece boyunca farklı konsantrasyonlarda 11-AUT (1, 5, 10, 50 mM) ile inkübe edilmiştir. Yüzeydeki tabakanın istiflenmesi konsantrasyondan fazlaca etkilendiğinden, farklı AUT konsantrasyonları farklı impedimetrik davranışlar sergilemiştir. 11-AUT konsantrasyonları farklılaştırılıp diğer parametreler sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki PARK-7 konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir. Şekil 4.64' de görüldüğü gibi, 50 mM 11-AUT ile hazırlanan nöro-biyosensör sistemi nispeten yüksek bir yük transfer direncine ve regresyon eğrisi üzerinde oldukça düşük bir belirleme katsayısına sahipken, 1 mM 11-AUT ile hazırlanan biyosensör düşük yük transfer direnci ve nispeten yüksek bir belirleme katsayısına ($R^2: 0,6788$) sahiptir. Kalibrasyon grafiğinden de görüldüğü üzere, artan 11-AUT konsantrasyonu ile birlikte fazlaca artan alifatik zincirin sebep olduğu hidrofobik etkileşimler anti-PARK-7'nin başarılı bir şekilde immobilizasyonuna engel olmakta ve non spesifik bağlanmalara sebep olarak yük transferini artırmaktadır. Bununla birlikte 5 mM 11-

AUT nispeten yüksek yük transfer direncine ve yüksek belirleme katsayısı sahiptir ($R^2: 0,9709$) ve ileriki adımlara bu değer optimize edilerek devam edilmiştir.



Şekil 4. 64. Farklı 11-AUT konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 konsantrasyonlarına verdiği yanıt

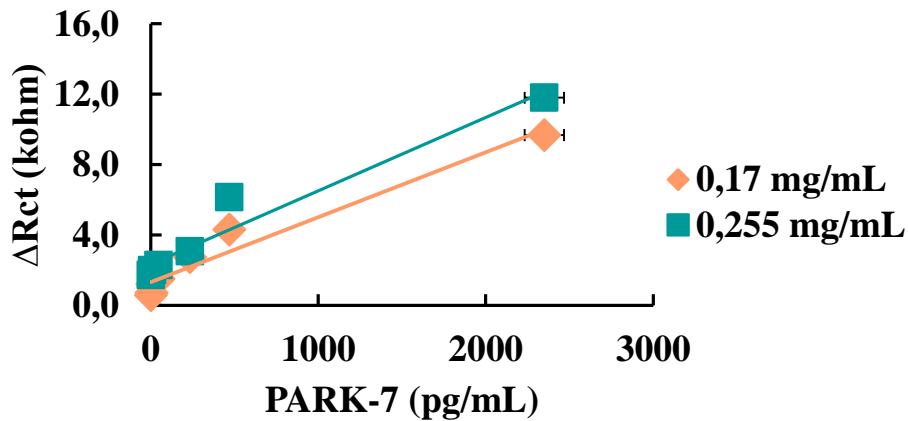
4.5.2.2. Optimum MWCNT konsantrasyonu

MWCNT, ultra yüksek özgül yüzey alanı ve olağanüstü elektriksel, mekanik ve elektrokimyasal özellikleri sayesinde öne çıkan materyaller haline gelmişlerdir. MWCNT'ler malzeme özelliklerinin (örn. Elektriksel veya optik), biyomoleküllere maruz kaldığında çok duyarlı olmasından ötürü biyosensörler için algılama elemanları olarak kullanılmayı cazip hale getirmiştir. MWCNT'nin yüksek yüzey-hacim oranı, düşük konsantrasyonlarda biyolojik türlerin çok hızlı bir şekilde tespit edilmesini mümkün kılmaktadır. MWCNT, ikiden fazla kıvrıkcık grafit tabakadan oluşur ve çapı 2–30 nm aralığındadır ve her tabaka arasındaki mesafe yaklaşık 0,42 nm'dir. Geleneksel katı karbon biyosensörleri ile karşılaştırıldığında, işlevselleştirilmiş MWCNT'lerden yapılan biyosensörler daha yüksek hassasiyet, daha hızlı tepki ve daha geniş algılama aralığına sahiptir (**Yang ve ark. 2015**). Yüzey mikro-ortamının farkı, MWCNT'lerin yüzey enerjisinin farklı dağılımı ile sonuçlanır ve bu, işlevselleştirilmiş MWCNT'lerin biyomoleküller için iyi katalitik aktiviteye sahip olmasını sağlamak için çok sayıda aktif bölge sağlayabilir (**Pavlidis ve ark. 2012**). Yüksek yüzey aktivitesi, protein (anti-PARK7) ve MWCNT arasındaki elektron transferine avantaj sağlamaktadır bu da

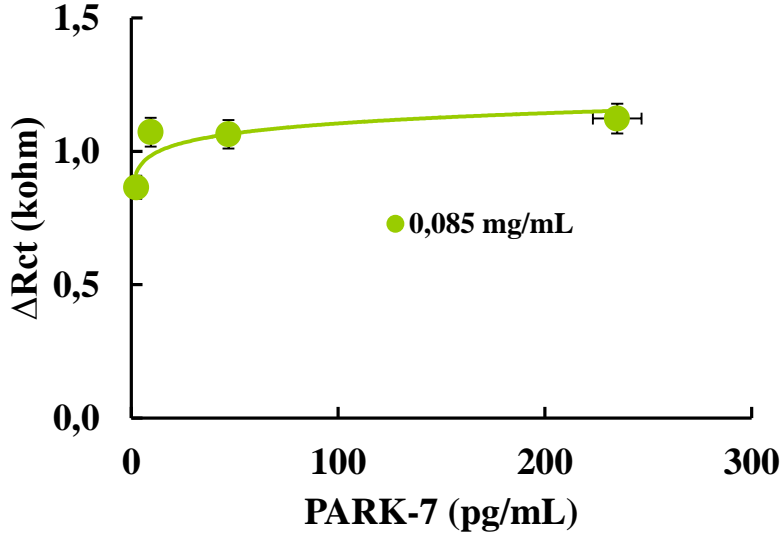
MWCNT'nin doğrudan bir elektronik iletme ulaşmasını sağlamaktadır. Öte yandan, MWCNT'lerin benzersiz nanoyapılarından dolayı, elektronları biyolojik algılama materyallerinin redoks merkezine aktarmak için “moleküler teller” olarak hareket edebilirler (Wooten ve ark. 2013).

MWCNTs yapısı, büyük intertube çekim enerjileri nedeniyle çok stabildir, böylece çoğu solventte çözünmez. Bu nedenle, biyosensörler için MWCNT'lerin hazırlanması için büyük bir sorun, MWCNT'lerin çözünürlüğüdür (Yogeswaran ve Chen 2008). Bu nöro-biyosensör hazırlanırken MWCNT'nin çözünme sorunu sulu SDS çözeltisinde hazırlanan dispersiyon ile aşılmıştır.

EDC/NHS ile aktiveleştirilen MWCNT'ler ile 11-AUT arasında amit bağı oluşarak yapı fonksiyonellik kazanmıştır. Kovalent modifikasyon, MWCNT'lerin özelliklerini belirli bir dereceye kadar iyileştirebilmekle birlikte, MWCNT'lerin sp² yapısı tahrip olduğundan ötürü stabilite kısmen etkilenir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MWCNT'ler (0,085; 0,17; 0,255 mg/mL) ile nöro-biyosensörün verdiği impedimetrik yanıt takip edilmiştir. 0,085 mg/mL MWCNT ile hazırlanan fonksiyonel yapının anti-PARK immobilizasyonundan sonra PARK-7'nin ölçümlendiği adımda hızlıca doygunluk noktasına eriştiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 0,17 mg/mL ve 0,255 mg/mL MWCNT ile hazırlanan nöro-biyosensörlerden benzer yanıtlar elde edilmiştir (Şekil 4.65-66). Dolayısıyla ileriki adımlara 0,17 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan MWCNT ile devam edilmiştir.



Şekil 4. 65. Farklı MWCNT konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 konsantrasyonlarına verdiği yanıt

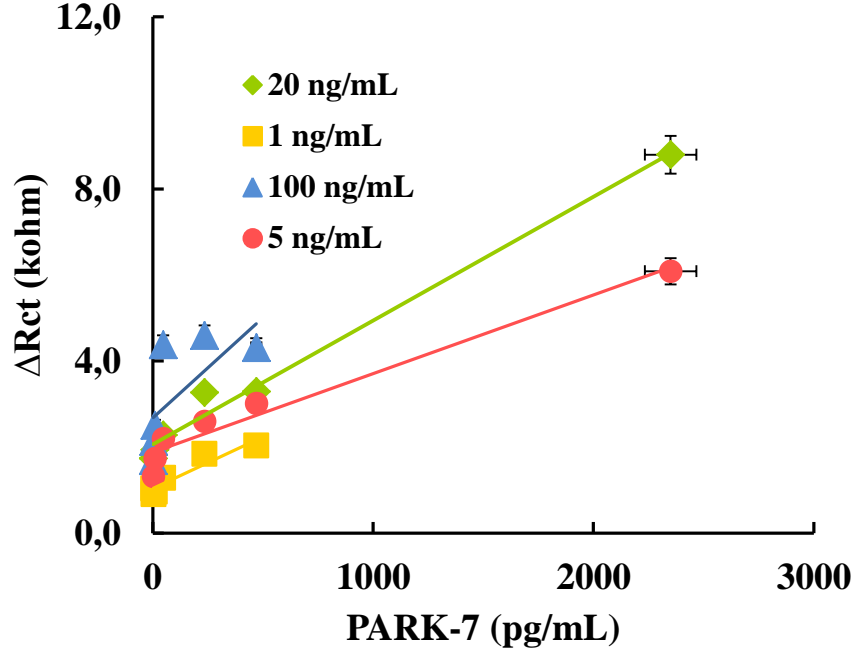


Şekil 4. 66. 0,085/mL MWCNT ile hazırlanan nöro-biyosensörün doygunluk eğrisi

4.5.2.3. Optimum anti-PARK-7 optimizasyonu

Bir kendiliğinden oluşan tek tabaka üzerinde biyomoleküllerin immobilizasyonu için gerekli miktar genellikle çok azdır ve istenen analitler çeşitli transdüksiyon modları ile kolayca tespit edilebilir. Uygun bir SAM'ın kullanılması, biyomoleküllerin yönlendirilmiş ve kontrollü immobilizasyonuna yardımcı olur. (Arya ve ark. 2009). Bu çalışmada 11-AUT ile oluşturulan SAM tabakasının optimum konsantrasyonunun belirlenmesi ve akabinde MWCNT ile modifikasyon, anti-PARK-7'nin başarılı bir şekilde immobilize edilmesinde kilit rol oynamaktadır. 11-AUT için uygun konsantrasyonun belirlenmiş olması biyomolekülün (anti-PARK-7) elektrot üzerinde denatürasyonunu önlemek ve stabilitesini arttırmak için de önem arz etmektedir.

Optimizasyon çalışmalarının son adımı biyoalgılama biriminin konsantrasyonunun belirlenmesidir. Bu amaçla, oda sıcaklığında 60 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda anti-PARK-7 (1, 5, 20 ve 100 ng / mL) ile nöro-biyosensörler hazırlanmıştır. Anti-PARK-7 konsantrasyonları farklılaştırılıp diğer parametreleri sabit tutulan nöro-biyosensör ile, belirli aralıktaki PARK-7 konsantrasyonlarına değişimine bağlı olarak yük transfer direncindeki değişim EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri ile takip edilmiştir (Şekil 4.67).



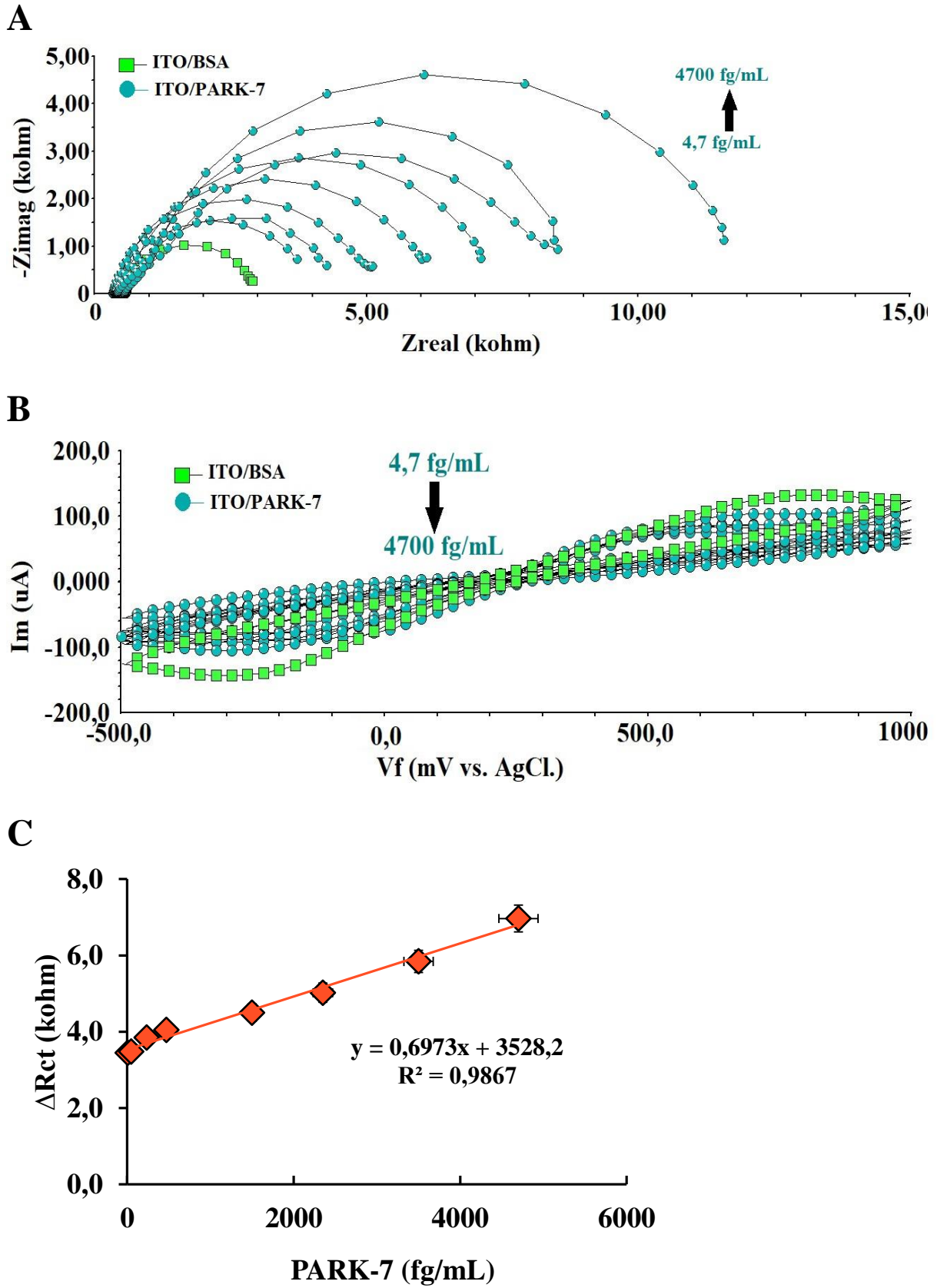
Şekil 4. 67. Farklı anti-PARK-7 konsantrasyonlarında hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 konsantrasyonlarına verdiği yanıt

1 ng/mL anti-PARK konsantrasyonu kullanılarak dizayn edilen nöro-biyosensörün yüksek konsantrasyonlarda PARK-7 ölçümlerinden yetersiz kaldığı, bununla birlikte 100 ng/mL anti-PARK-7 konsantrasyonu kullanıldığında ise sistemin lineer yanıt veremediği (R^2 : 0,4621) görülmektedir. 5 ng/mL ve 20 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan nöro-biyosensör sistemleri benzer regresyon katsayısına sahipken (sırasıyla R^2 : 0,9651 ve 0,9876) konsantrasyonun 20 ng/mL'e çıkarılması oluşan protein bariyerinin etkinliğinden ötürü yük transfer direncini arttırmıştır. Dolayısıyla ideal bir nöro-biyosensör sistemi anti-PARK-7 konsantrasyonu 20 ng/mL olarak optimize edilmiştir.

4.5.3. PARK-7 nöro-biyosensörünün analitik karakteristikleri

4.5.3.1. PARK-7'nin geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile belirlenmesi

Optimum koşulları belirlenen AuNP/ 11-AUT / MWCNT temelli ITO nöro-biyosensör sistemiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart PARK-7 çözeltileri EIS ve CV teknikleriyle ölçümlenmiştir. PARK-7 konsantrasyonu ile elektron transfer direnci arasındaki ilişki, Şekil 4.62A 'ya eklenen eşdeğer devre modeli ile belirlenmiştir.



Şekil 4. 68. Optimum koşullarda hazırlanan nöro-biyosensör sisteminin farklı konsantrasyonlarda PARK-7'ye verdiği yanıt (A) EIS, (B) CV, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

İmpedans eğrilerinden elde edilen bir yarım daire çapının, yük transfer direncinin (Rct) bir ölçüsü olduğu bilinmektedir, ki farklı konsantrasyonlarda antijen ilave edildikten sonra elde edilen impedans spektrumları, Şekil 4.68'de Nyquist grafikleri olarak gösterilmiştir, burada Zr, gerçek parçadır ve Zim, karmaşık impedansın hayali kısmıdır. Düşük frekanslarda, impedans modülü PARK-7 konsantrasyonunun artmasıyla açıkça artar, bu da PARK-7'nin daha büyük miktarda biyo-fonksiyonel yüzey ile etkileştiğini ve bu etkileşim neticesinde oluşan kompleksin elektron transferinin inhibisyonundan sorumlu olduğunu göstermektedir.

Artan PARK-7 konsantrasyonu yük transfer direnci arasındaki ilişkinin 4,7 fg/mL-4700 fg/mL PARK-7 konsantrasyonu aralığında doğrusal bir regresyona ulaştığı gözlemlenmiştir. (şekil 4.68C). AuNP/11-AUT/MWCNT modifiyeli nöro-biyosensör sisteminin PARK-7 için LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0,5 fg/mL ve 1,65 fg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen hibrit yapının PARK-7 antikör-antijen bağlanması için mükemmel bir yakalama kabiliyeti olduğunu vurgulamaktadır.

EIS, modifiye elektrotun elektriksel özelliklerini, yani elektrota immobilize bir antikör ilgili antijeni ile reaksiyona girdiğinde analiz etmek için oldukça uygun bir tekniktir. Bu etkileşim, elektrot yüzeyindeki kapasitans ve direnç gibi elektriksel özelliklerin değişmesine ve dolayısıyla biyoalgılamaya izin verir. Çizelge 4.19 artan PARK-7 konsantrasyonuna bağlı çözelti direncindeki ve kapasitanstaki değişiklikleri göstermektedir.

Çizelge 4. 19. Artan PARK-7 konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler

Elektrot	Rct (ohm)	Rs (ohm)	Cdl (µF)
Nöro-biyosensör	2283±22,59	486 ± 3,102	7,87±0,1242
4,7 fg/mL PARK-7	3194±41,45	426,9±2,722	8,52±0,14
47 fg/mL PARK-7	3438± 41,45	573,8± 4,033	7,15±0,15
235 fg/mL PARK-7	4418±37,86	339,9±2,259	5,58±0,063
470 fg/mL PARK-7	5296± 48,08	388,6±2,576	5,06±0,0568
1500 fg/mL PARK-7	6180±60,91	588,1±3,7	4,96±0,0847
2350 fg/mL PARK-7	6583±63,32	558,5±3,671	4,79±0,0582
3500 fg/mL PARK-7	7287±84,56	589,8±3,748	4,63±0,08
4700 fg/mL PARK-7	9970±92,63	465,9±3,077	4,52±0,062

Sistemin toplam kapasitansın azalması, analitin spesifik reseptörüne bağlanmasının neticesidir. Geniş bir dinamik aralıkta hassas bir sensör tasarlamak için, yalıtım tabakası yeterince ince ve / veya yüksek bir dielektrik sabiti bulunmalıdır. Aksi takdirde, analitin reseptöre bağlanmasından kaynaklanan kapasitans değişiklikleri, toplam kapasiteye hakim olmayabilir. Ek olarak, yalıtım tabakası, zamanla kararlı olmalı ve reseptörün immobilizasyonu için fonksiyonel gruplar sağlamalıdır. Kapasitif immünosensörlerde sinyal değişiklikleri, aynı zamanda, dielektrik özelliklerdeki değişiklikler, yük dağılımı veya hatta immobilize edilmiş biyomolekül tabakasının analit ile etkileşimi üzerine konformasyonel değişiklikleriyle de indüklenebilir (**Prodromidis 2010**). PARK-7 konsantrasyonunun artışıyla Rct ve kapasitanstaki değişiklikler yüzeyde antijen-antikor kompleksinin konsantrasyona bağımlı oluşumunun impedimetrik verilerle destekleyicisidir.

PARK-7 biyobelirtecinin 4,7- 4700 fg/mL konsantrasyon aralığında, döngüsel voltamogramlarından alınan sonuçlar Şekil 4.68.B’ de gösterilmiştir. Artan PARK-7 konsantrasyonuna bağlı olarak anodik ve katodik pik akımları azalmıştır. Bu durum, artan protein konsantrasyonuyla birlikte yüzeyde elektron transferinin güçleştiğini destekler niteliktedir. Bu açıdan EIS ve CV sonuçları uyum içindedir.

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin Kramers Kronig dönüşümlerine ait değerler Çizelge 4.20’ de verilmiştir.

Çizelge 4. 20. Nöro-biyosensörün gelişim adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

Nöro-biyosensör adımı	Kramers Kronig Transform değeri (μ)
Yalın ITO	179,8
ITO/AuNP	6,73
ITO/AuNP/11-AUT	1,15
ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT	4,006
ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7	9,83
ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7/BSA	50,64

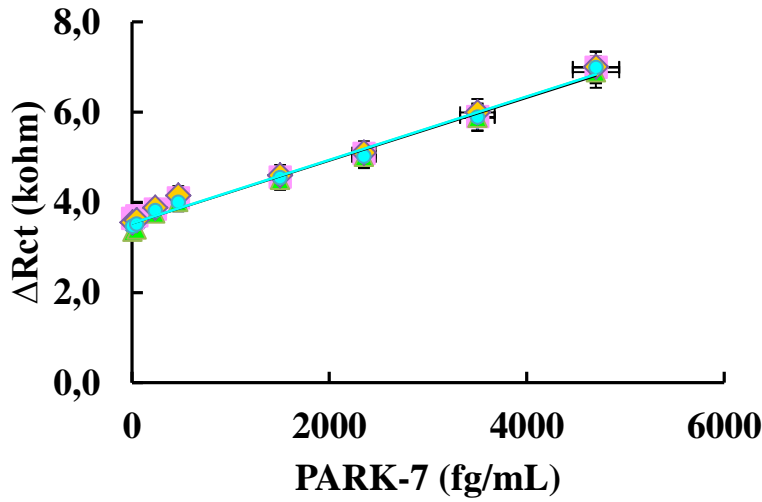
Kramers – Kronig dönüşümleri karmaşık bir transfer fonksiyonunun gerçek ve hayali bileşenlerini ilişkilendirir ve EIS verilerini doğrulamak için güçlü bir araçtır. Transfer fonksiyonunun kararlı, nedensel ve lineer sistem olup olmadığını kontrol etmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, bunlar sadece yeterli koşullar sağlandığında K.K.T açısından değerlendirilebilmektedir. Pek çok çalışma K.K.T'nin nedensellik ve stabilite ihlallerine genellikle duyarlı olduğu vurgulanmıştır (**Fasmin ve Srinivasan 2015**).

4.5.3.2. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrarlanabilirliği

ITO temelli AuNP/11-AUT/MWCNT katkılı nöro- biyosensörünün tekrarlanabilirliği, benzer koşullar altında hazırlanan 15 kullan-at elektrot ile hazırlanan aynı konsantrasyonda PARK-7 (470 fg / mL) analiz edilerek belirlenmiştir. Nöro - biyosensörün analizin varyasyon katsayısı % 1,88 ortalama değer ve standart sapması 476,75 ve 9,01 fg / mL olarak hesaplanarak oldukça iyi bir tekrarlanabilirlik kapasitesine sahip olduğu vurgulanmıştır.

4.5.3.3. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

AuNP/11-AUT/MWCNT modifiyeli ITO temelli PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrar-üretilebilirliği, aynı prosedürle farklı zamanlarda hazırlanan 6 biyosensör sisteminin 4,7-4700 fg / mL tayin aralığındaki PARK-7 cevaplarının izlenmesi ile değerlendirilmiştir. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları sonucunda 6 nöro-biyosensörün yanıtlarının PARK-7 için 4,7-4700 fg / mL arasında benzer doğrusallığı gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.69' da gösterilen tekrar üretilebilirliğe ait eğimlerin ve interseptlerin relatif standart sapmaları sırasıyla % 1,73 ve % 2,16 olarak bulunmuştur. Tekrarüretilebilir sinyaller, geliştirilen nöro-biyosensörün PARK-7 yanıtı üzerine koşullar değiştiğinde dahi yüksek güvenilirlik ve sağlamlık gösterdiği değerlendirilmesinin yapılmasını sağlamıştır.



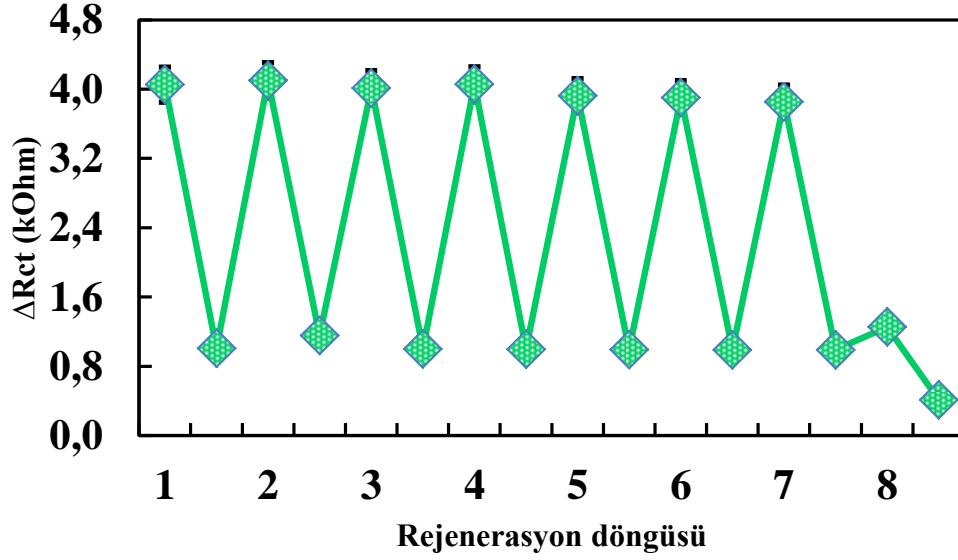
Şekil 4. 69. PARK-7 nöro-biyosensörünün tekrar üretilebilirlik sonuçları

4.5.3.4. PARK-7 nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi

Biyosensörlerin rejenerasyonu, tekrar kullanılabilirliğe ve sensörlerin ticari canlılığını artırmaya yardımcı olmaktadır. Biyosensörlerin rejenerasyonu için, çözücü ortamının, analit / reseptör bağlanması zayıflayacak şekilde değiştirilmesi gerektiği gözlenmiştir.

Geliştirilen nöro-biyosensörün rejenerasyonu, PARK-7 antikor-antijen immüno-kompleksini ayrıştırmak için, AuNP/11-AUT/MWCNT modifiyeli ITO elektrotların 3 dakika 5 mM HCl içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Her rejenerasyon sonrasında elektrotlar iyice yıkanıp tekrar PARK-7 ile muamele edilmiştir

Elektrotlar 7 döngü boyunca PARK-7'nin 470 fg/mL konsantrasyonuna yaklaşık aynı impedimetrik yanıtı verirken, 7. Döngüden sonraki ilk PARK-7 muamelesiyle sinyal artışının düşüşe geçtiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.70).



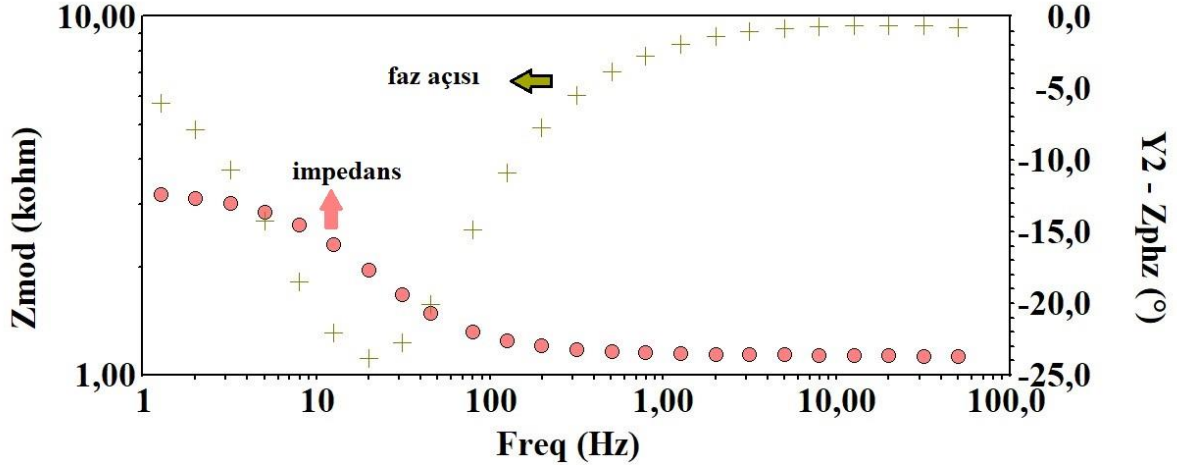
Şekil 4. 70. PARK-7 nöro-biyosensörünün rejenerasyon kapasitesi

Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin asidik ortamda sergilediği bu yüksek rejenerasyon kapasitesi, çok duvarlı karbon nanotüpün sahip olduğu uzun dayanıklılık kabiliyetine atfedilebilir. Bununla birlikte hibrit yapı içerisinde gösterdiği uyum nöro-biyosensör sistemiyle PARK-7 proteinin 7 döngü rejeneredilebilmesini sağlamıştır.

4.5.3.5. Sabit frekansta impedans analizi

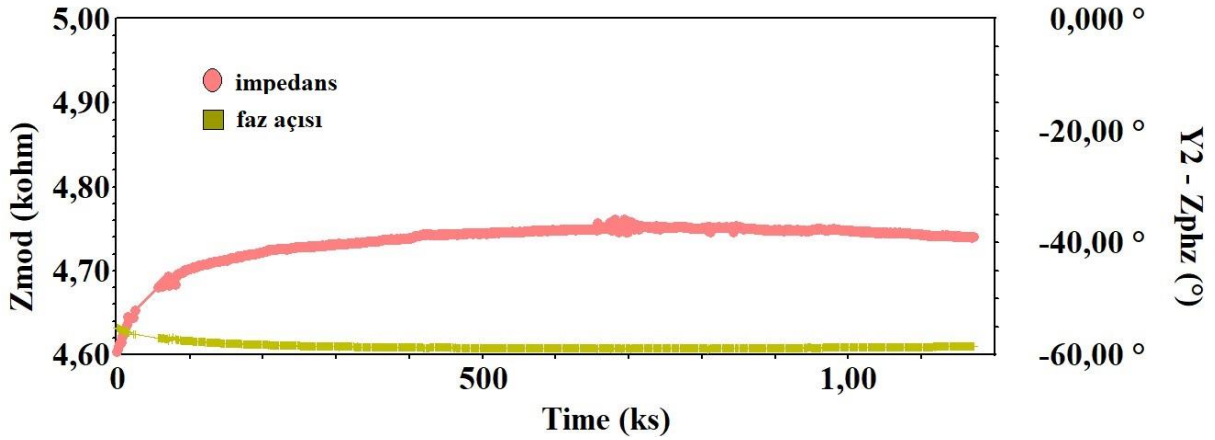
Anti-PARK-7 ile PARK-7 arasında oluşan immunokompleksin kinetiksel davranışı, sabit frekansta non faradayik ortamda impedanstaki ve faz açısındaki değişikliklerin zamana bağlı olarak takip edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Sisteme uygulanacak frekansın (5 Hz) seçimi ve analizi Bode eğrisi yardımıyla yapılmıştır. Şekil 4.71' de nöro-biyosensöre ait Bode grafiği göstermektedir.



Şekil 4. 71. PARK-7 nöro-biyosensörünün Bode grafiği

Bode grafiği, mutlak impedansın ($|Z|$) hem logaritması hem de faz kayması (ϕ), uyarım frekansının logaritmasına karşı çizilmiştir.

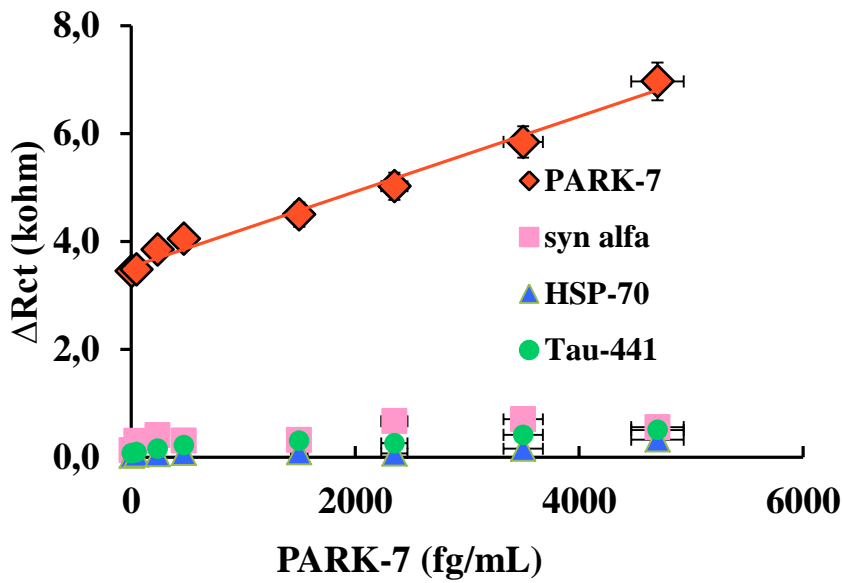


Şekil 4. 72. PARK-7 nörobiyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

Anti-PARK-7 ile PARK-7 immunokompleks oluşum sürecinin kinetiksel takibi frekanstan bağımsız, zamana bağımlı olarak SFI ile takip edilmiştir. Şekil 4.72' de görüldüğü üzere 20 dakika civarında immunokompleks oluşumun tamamlandığı belirlenmiştir. Bu süre sonunda impedanstaki değişim yaklaşık 150 ohm iken faz açısındaki azalma $4,5^\circ$ 'dir. Bu impedimetrik değişimler yüzeyde anti-PARK7-PARK-7 biyokompleksinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini destekler niteliktedir.

4.5.3.6. PARK-7 nöro-biyosensörünün seçiciliği

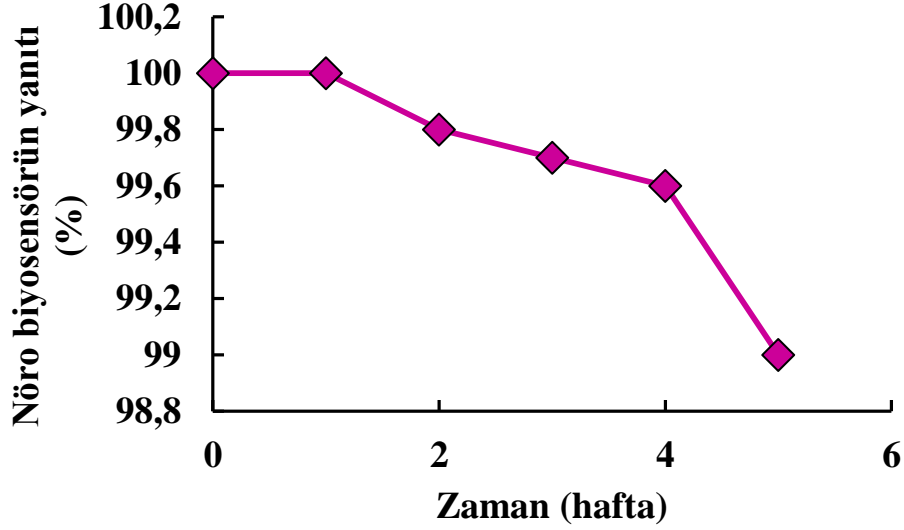
AuNP/11-AUT/MWCNT modifiyeli ITO temelli kullan-at PARK-7 nörobiyosensörün başka proteinlere karşı gösterebileceği afinite, Alzheimer tipi demansın önemli bir biyobelirteci olan Tau-441, Parkinson tipi demansın bir diğer önemli belirteci SYN-alfa ve HSP-70 adlı proteinler varlığında izlenmiştir. Biyoalgılama kompleksinin bu proteinlere karşı olan ilgisi PARK-7 için belirlenen lineer tayin aralığında (4,7 fg/mL-4700 fg/mL) takip edilmiştir. Geliştirilen kompleksin yük transfer direncine katkısı göz ardı edilebilir miktarda olmakla birlikte, sistemin en yüksek ilgiyi SYN-alfa proteinine karşı gösterdiği (şekil 4.73) görülmektedir. Tasarlanan nörobiyosensör sisteminin bu yüksek seçicilik özelliği yapıda kullanılan MWCNT'nin biyoelektrokatalitik aktiviteye sağladığı artıştan kaynaklanması muhtemeldir. AuNP/11-AUT/MWCNT kombine platformunun sergilediği uyum yüksek seçicilik ile sonuçlanmıştır.



Şekil 4. 73. PARK-7 nörobiyosensörünün farklı antijenlere karşı gösterdiği seçicilik

4.5.3.7. PARK-7 nöro-biyosensörün depo ömrü

PARK-7 tayinine yönelik geliştirilen nöro-biyosensör 5 hafta boyunca kuru olarak muhafaza edilmiş ve depolanma stabilitesi aynı konsantrasyonda PARK-7'yi ölçümlemek suretiyle değerlendirilmiştir. Sensör sisteminin 5 hafta boyunca (35 gün) tamamen stabil kaldığı görülmüştür (Şekil 4.74).



Şekil 4. 74. PARK-7 nöro-biyosensörünün depolanma stabilitesi

Biyomolekülün (anti-PARK-7) AuNP modifiyeli ITO yüzeyine immobilizasyonu, biyo-uyumluluk ve AuNP'nin yüksek yüzey serbest enerjisi nedeniyle biyoaktivitelerini ve stabiliteyi koruyabilmesinde başlıca rolü oynamıştır. Bununla birlikte kendiliğinden oluşan tek tabakalar ve karbon nanotüpler stabilitesi yüksek malzemelerdir; bu nöro-biyosensör sisteminde bu üstünlüklerin bir araya getirilmesi PARK-7 yanıtında zamana bağlı bir değişim olmamasıyla neticelenmiştir.

4.5.3.8. Geliştirilen nöro-biyosensör sisteminin klinik uygulamaları

Geliştirilen nöro-biyosensörün klinik validasyonu, Namık Kemal Üniversitesi Nöroloji polikliniğine başvuran hastalar arasında random yöntemle toplanan beyin omurilik sıvısı (BOS- 5 adet) ve gönüllülerden alınan tükürük örneklerinde PARK-7 analizinin yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Üretilen nöro-biyosensörün fizibilite ve analitik güvenilirliğini değerlendirmek için gerçek örnekler, insan serebrospinal sıvısında ve tükürük sıvısında standart ekleme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı PARK-7 konsantrasyonlarının (235 fg / mL ve 3500 fg / mL) BOS ve tükürük örneklerine eklenmesi ve EIS tespitinin ardından bağıl standart sapma ve geri elde analitiksel değerleri kalibrasyon grafiği yardımı ile hesaplanmıştır.

PARK-7'nin Parkinson tanısı almamış erkek ve kadın bireylerde tükürükteki ortalama değerinin 4 ng/mL (**Kang ve ark. 2014**) BOS'taki ortalama değerinin 38 ng/mL (**Hong ve ark. 2010**) olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar baz alındığında, örneklerde 10⁶ kat seyreltme işlemi yapılmıştır. Standart ekleme yöntemi ile alınan sonuçlar Çizelge 4.21' de gösterildiği gibidir.

Çizelge 4. 21. Geliştirilen nöro-biyosensör sistemi ile BOS ve tükürük örneklerinde bulunan PARK-7 konsantrasyonlarının belirlenmesi

Tükürük örnek numarası	PARK-7 ölçülen miktarı (fg.mL-1)*	Standart eklenen miktar (fg.mL-1)	Ölçülen miktar (fg.mL-1, n=3)*	RSD (% n=3)	Geri elde (%)
1	1609	235	1850 / 1915,5 / 1905,5	2,10	102,16
		3500	5110 / 5212,2 / 5111	1,13	100,68
2	5,2	235	238,8 / 242 / 255,5	3,74	102,08
		3500	3550/3542 / 3512,5	0,55	100,82
3	4,9	235	242,5 / 266,6 / 301,5	10,97	112,63
		3500	3492,5 / 3495,5 / 3406,6	1,45	99
4	5,7	235	242,7 / 255,9 / 222,2	7,06	99,82
		3500	3601 / 3550 / 3505	1,35	101,4
5	6,2	235	255,3 / 212,5 / 223,4	9,65	95,66
		3500	3612,2 / 3412,9 / 3511	2,83	100,17
6	223,5	235	466,5 / 459,5 / 424	5,06	98,15
		3500	3750 / 3705,5 / 3710,6	0,65	100,04

* 10⁶ kat seyreltme sonucu elde edilen sonuçlardır.

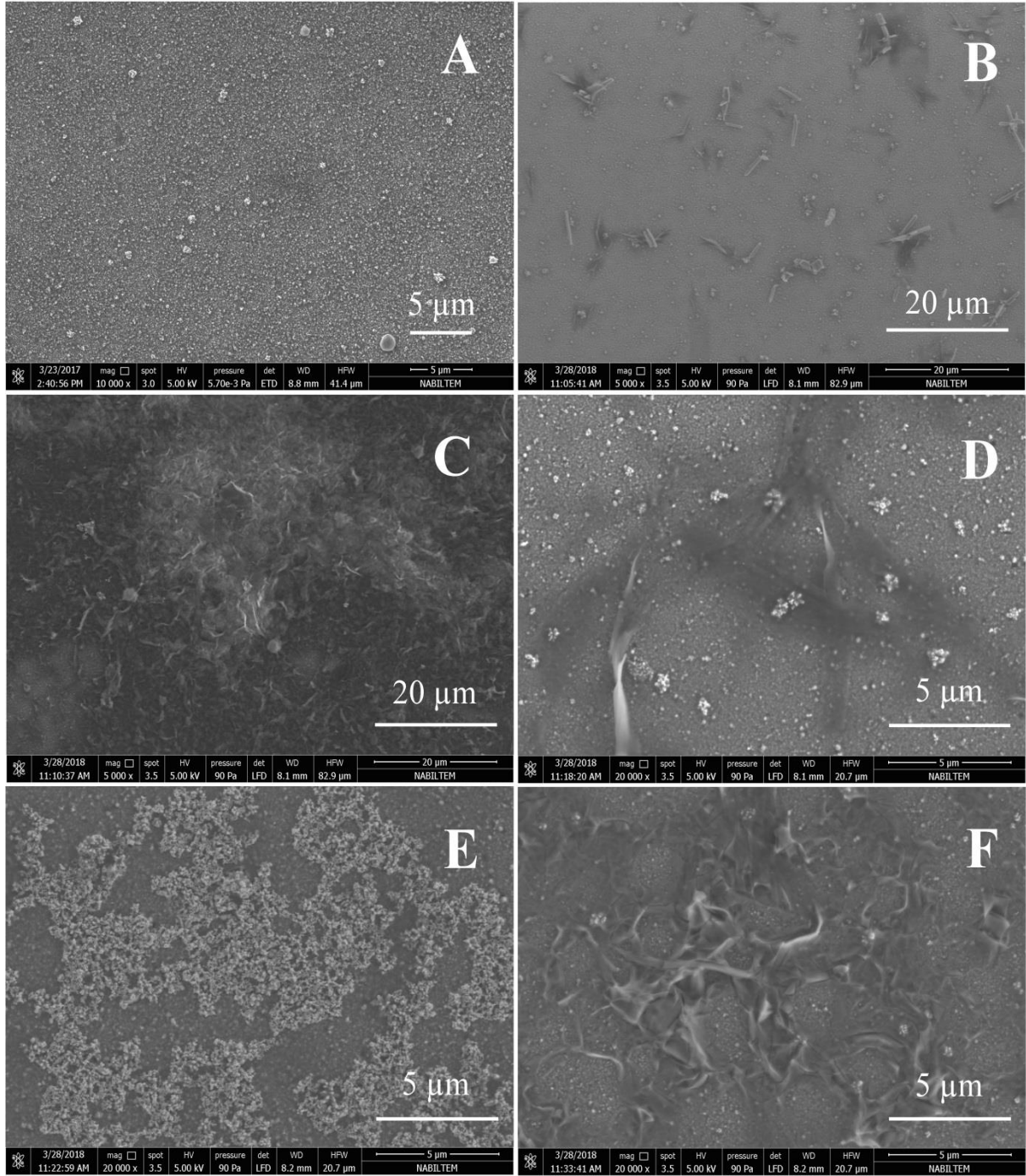
BOS örnek numarası	PARK-7 ölçülen miktarı (fg.mL-1)*	Standart eklenen miktar (fg.mL-1)	Ölçülen miktar (fg.mL-1, n=3)	RSD (% n=3)	Geri elde (%)
1	18,5	235	250,5 / 262,7 / 260,1	2,49	101,38
		3500	3520 / 3555 / 3456,6	1,42	99,76
2	36,5	235	281,5 / 256,6 / 252,4	5,96	97,06
		3500	3540 / 3555,5 / 3548,8	0,21	100,34
3	15,5	235	250,5 / 262,4 / 278,8	5,38	105,56
		3500	3514,4 / 3502 / 3571	1,04	104
4	24,4	235	269,9 / 277,1 / 264,9	2,26	104,32
		3500	3520 / 3555 / 3456,6	0,25	102,26
5	12,7	235	245,5 / 240,5 / 238,8	1,44	97,49
		3500	3550 / 3621 / 3615,5	1,09	102,36

* 10⁶ kat seyreltme sonucu elde edilen sonuçlardır.

Klinik örneklerden alınan sonuçlar göstermektedir ki, ITO temelli AuNP/11-AUT/MWCNT modifiyeli kullan at tip nöro-biyosensör sistemi komplike fizyolojik ortamlarda dahi hedef proteini olan PARK-7'nin değerlendirilmesine karşı yüksek hassasiyet göstermiştir. Hiç şüphe yok ki; bu hassasiyetin elde edilmesinde nanomalzemelerden faydalanmasının (AuNP-MWCNT) rolü yadsınılamaz. Bu sonuçlar ışığında, kullanımı kolay, hazırlanma maliyeti düşük, yanıt hızı yüksek, depolanma stabilitesi kayda değer olan bu tek kullanımlık nöro-biyosensör sisteminin klinik alvea potansiyel uygulamalara açık olması umut vaat edicidir. Ayrıca altı çizilmesi gereken nokta, Parkinson tipi demansın önemli bir belirteci olan PARK-7 proteininin belirlenmesine yönelik literatürde henüz bir teknik rapor edilmemiştir. Bu bakımdan da çalışmamız literatürdeki bir boşluğu doldurarak, bilimsel literatüre katkı sağlamaktadır.

4.5.3.9. SEM görüntüleri

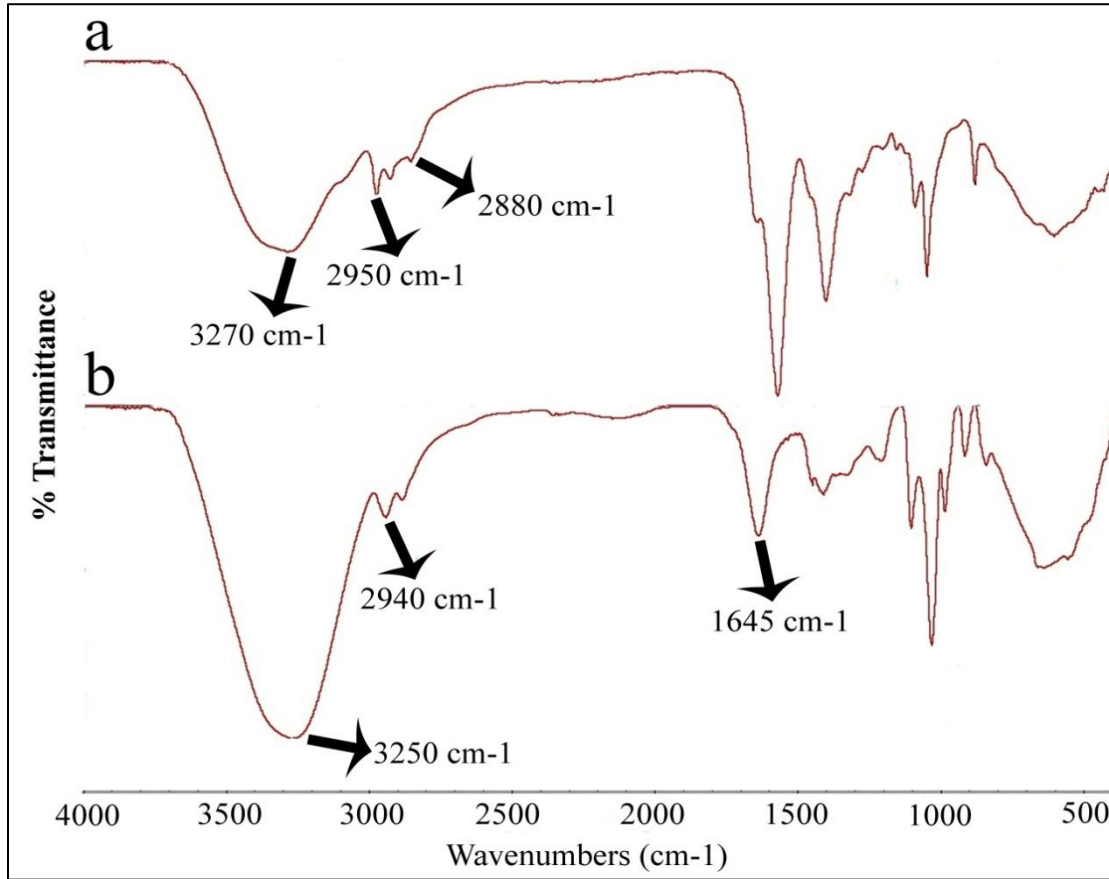
Nöro-biyosensör sisteminin adım adım geliştirilmesi esnasında yüzeyde meydana gelen morfolojik değişiklikler taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.75). Şekil A, ITO yüzeyinin altın nanopartikül biriktirildikten sonraki durumudur. Altın nanopartikül biriktirildikten sonra, amino tiyol ile oluşan tek tabaka filmi şekil B'de görüldüğü gibidir. Monotabakada yer yer çubuksal birikimler oluşmuştur. 11-AUT üzerine MWCNT'nin kovalent etkileşimi neticesinde elektrot yüzeyindeki karbon nanotüpün morfolojik değişimi şekil C'de görüldüğü gibi olmuştur. Anti-PARK-7'nin yüzeye immobilizasyonu neticesinde yapının kazandığı globüler form D'de açıkça görülmektedir. BSA'nın non-spesifik adsorbsiyonları önlemek amacıyla yüzeye immobilize edildiği adımda, yüzeyin morfolojisi şekil E'ye dönüşmüştür. PARK-7'nin yüzeye olan immuno etkileşimi yüzeyin morfolojisini şekil F'de görüldüğü üzere ağırsı bir görüntüye kavuşturmuştur.



Şekil 4. 75. PARK-7 nöro-biyosensörlerinin tasarım adımlarına ait SEM görüntüleri (A) ITO/AuNP (B) ITO/AuNP/11-AUT (C) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT (D) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7 (E) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7/BSA, (F) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/ anti-PARK-7/BSA

4.5.3.10. FTIR sonuçları

PARK-7 tayinine yönelik nöro-biyosensör geliştirilirken, oluşan bağlar FTIR ile takip edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.76' da gösterilmektedir.

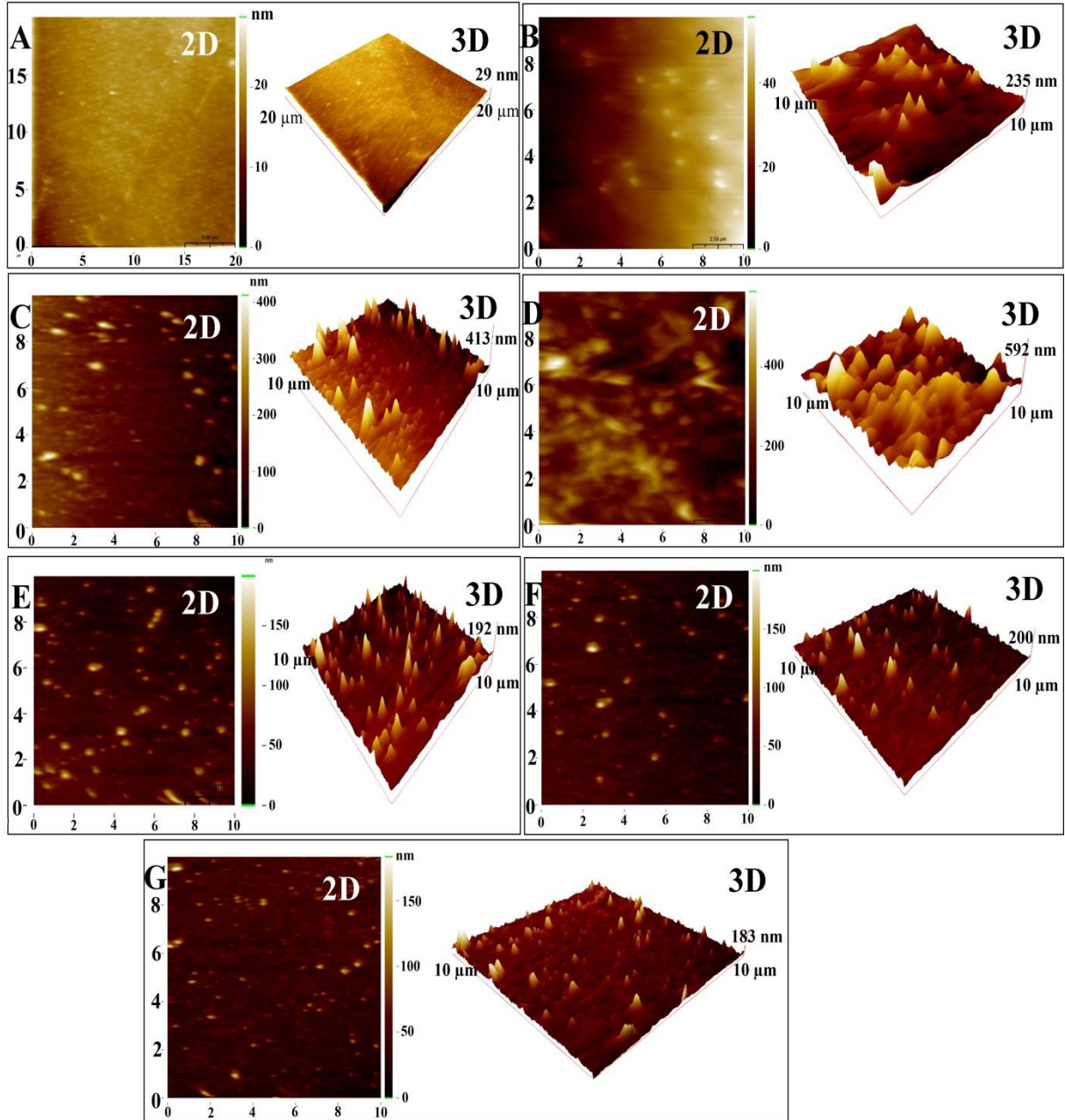


Şekil 4. 76. PARK-7 nöro-biyosensörünün FTIR spektrumları (a) 11-AUT, (b) anti-PARK-7

Şekil A, altın nanopartikül biriktirilmiş yüzeyde 11-AUT ile SAM tabakası oluşturulduktan sonra oluşan bağlara ait spektrumdur. 3270 cm^{-1} 'deki yayvan pik serbest N-H grubuna ait titreşim pikidir. 2950 cm^{-1} 'deki küçük titreşim bandı C-H alifatik bağının ait olması muhtemeldir. 2800 cm^{-1} civarındaki zayıf pik ise serbest halde bulunan S-H gruplarına ait olabilir. Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde, yapı 11-AUT'u işaret etmektedir. Anti-PARK-7'nin immobilizasyonundan sonra alınan FTIR sonuçları şekil B'deki gibidir. 3250 cm^{-1} deki titreşim bandı, protein yapısında bulunması muhtemel N-H gruplarına aittir. Immobilizasyonun olduğu dair en net FTIR bilgisi 1645 cm^{-1} 'deki pike aittir. Bu pik; NH_2 ile COO grupları arasında gerçekleşen amit bağına işaret etmekte ve immobilizasyonu destekler niteliktedir.

4.5.3.11. AFM sonuçları

Nöro-biyosensörün tasarım adımları gerçekleşirken yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler AFM ile de takip edilmiştir (Şekil 4.77).



Şekil 4. 77. PARK-7 nöro-biyosensörünün tasarım adımlarına ait AFM görüntüleri (A) ITO, (B) ITO/AuNP, (C) ITO/AuNP/11-AUT, (D) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT, (E) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK-7, (F) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK/BSA (G) ITO/AuNP/11-AUT/MWCNT/anti-PARK/BSA/PARK-7

PARK-7 nöro-biyosensör yüzeyinin fonksiyonelleştirilmesi yüzey morfolojisinde değişikliklere sebep olmuştur. Yalın ITO elektrodun neredeyse pürüzsüz yüzeyinin ilerleyen modifikasyonlarla birlikte geçirdiği değişiklikler AFM'den elde edilen sonuçlar ile desteklenmektedir. Yüzey pürüzlülüğüne ait karekök ortalaması değerleri (rsm) incelendiğinde, yalın ITO elektrot 2,18 nm pürüzlülüğe sahipken, AuNP, 11-AUT ve MWCNT ile modifikasyonlar neticesinde sırasıyla 136,78 nm, 56,84 nm, 83,52 nm değerlerine ulaşmıştır. Yüzeydeki tüm bu değişiklikler, nöro-biyosensörün algılama platformunun oluştuğunu destekler niteliktedir. Anti-PARK-7 immobilizasyonu ile rsm değerinin 17,53 nm düşmesi yüzeyde anti-PARK'nin bariyer etkisi oluşturduğuna ve daha sonrasında PARK-7'nin immobilizasyonu ile da 13,80 nm'e düşmesi bariyer etkisinin giderek arttığına işaret etmektedir.

5. SONUÇ

Nörodejeneratif hastalıklar çatısı altında değerlendirilen iki önemli demans tipi Alzheimer ve Parkinson hastalığının ardındaki bilimsel sebepler oldukça karmaşık ve zorlayıcıdır. Bu iki hastalığın sebep olduğu duygusal travma ve dünya genelinde bu hastalıklardaki artış ile bunun sağlık hizmetleri üzerinde oluşturduğu muazzam yük, Alzheimer ve Parkinson hastalığının erken tanı ve tedavisine yönelik çalışan bilim insanları üzerinde bir an önce yeni yöntemler geliştirilmesi açısından etki oluşturmaktadır. Sonuçta Alzheimer ve Parkinson “21. Yüzyılın vebası” sayılmaktadır. Bu ihtiyaçtan yola çıkan doktora tezi, Alzheimer ve Parkinson için önemli ve potansiyeli yüksek olan biyobelirteçleri belirleyerek bunların erken tanısının tespitine yönelik yenilikçi sistemler geliştirmeyi hedeflemiştir. Muhakkak ki erken tanı, hastalığın seyrine yön veren birincil faktördür. Yine bilimsel literatür göstermektedir ki, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları klinik belirtiler ortaya çıkmadan çok önce, merkezi sinir sisteminde yerini almaya başlamaktadır. Dolayısıyla, hastalığın erken tanısının yapılabilmesi, tedavinin seyrini, hastanın bireysel anlamda yaşam şeklini değiştirmesi gibi noktalara önemli derecede katkı sağlayacaktır. Erken tanı materyalleri geliştirilirken, şu çerçeve çizilmiştir: maliyeti mümkün oldukça düşük, tek kullanımlık, hassasiyeti ve tekrar üretilebilirliği yüksek, depolanma stabilitesi olan ve en önemlisi fizyolojik sıvılarda hedef proteinine karşı yüksek hassasiyet sergilemesi. Bütün sistemler geliştirilirken ITO kaplı tek kullanımlı PET elektrotlardan faydalanılmıştır. Literatürde çalışma grubumuz haricinde bu elektrot tipi ile çalışılmış biyosensör sistemi karşılaşılmamıştır. ITO-PET elektrotlar hazırlanışı kolay ve maliyeti maaddelerine göre düşük elektrotlardır. Geliştirilen 5 ayrı nöro-biyosensör sistemlerinin hepsi elektrokimyasal temellidir ve sonuçlar EIS, CV, SWV gibi tekniklerle takip edilmiştir. Bunun yanı sıra antikolar ve antijenler arasındaki kinetiksel davranış, “sabit frekansta impedans” tekniği ile gerçek zamanlı olarak değerlendirilmiştir. SFI tekniğinin bu amaçla kullanımına dair literatürde -çalışma grubumuz hariç- herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Alzheimer hastalığında inflamasyonun rolü açıktır dolayısıyla inflamasyon sürecinin başındaki belirteç olan C-reaktif protein için iki ayrı biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemler gösterdikleri femtogram düzeyindeki hassasiyetle, literatürde rapor edilen çalışmalara kıyasla öne çıkmaktadır. Ayrıca CRP tayinine yönelik tasarlanan sistemlerde yenilikçi materyaller kullanılmış ve bilimsel literatüre katkı sağlanılmıştır.

Klinikte hali hazırda CRP'ye inflamasyon sürecinin bir belirteci olmasından ötürü sıklıkla başvurulmaktadır. Geliştirilen sistem analitik performans bakımından hali hazırda kullanılan tekniklerin pek çoğundan üstündür ve bu anlamda umut vaat edicidir. ITO-PET hazırlanan biyosensör sisteminin maliyeti de ELISA gibi pahalı tekniklerin yanında oldukça uygundur. Örneğin CRP tayinine yönelik geliştirilen CPTMS temelli bir biyosensör sistemi maliyeti yaklaşık 0,0032 euro'dur.

Alzheimer hastalığı sürecinde, merkezi sinir sisteminde Tau adlı proteinin birikmesi ve hastalığın sorumlularının başında gelmesi uzun süredir bilinen bir durumdur. Bununla birlikte literatürde Tau proteinin tayinine yönelik nöro-biyosensör sistemleri oldukça kısıtlıdır. Bu doktora tezi kapsamında, Tau-441 proteinine yönelik yenilikçi materyallerle dizayn edilmiş geniş tayin aralığına sahip, tekrarlanabilir sonuçları öne çıkan, depo ömrü ve rejenerasyon kapasitesi olan ve hedef proteini Tau-441'i hem beyin omurilik sıvısında hem de serum sıvısında yüksek hassasiyetle ölçümleyebilen bir nöro-biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Klinik örneklerde alınan bu umut vaat edici sonuçlar geliştirilen sistemin ileri uygulamalarında araştırılmasını olanaklı kılmaktadır.

Parkinson hastalığında synuclein alfa adlı proteinin plaklar halinde biriktiği ve hastalıktan sorumlu olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. SYN alfa ve PARK-7 (DJ-1) adlı proteinlerin konsantrasyonlarının hastalığın erken evrelerinde arttığı bildirilmiştir. Tüm bunlar gözönünde bulundurularak synuclein alfa ve PARK-7 için iki ayrı nöro-biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemler femto ve pikogram düzeyinde gösterdikleri geniş tayin aralıkları ile proteinin konsantrasyonundaki en ufak bir değişimi dahi yakalayabilecek biyoalgılama probuna sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca, uzun depolanma stabilite, farklı proteinlere karşı gösterdiği zayıf afinite, tekrarlanabilir sonuçlar ve nihayetinde beyin omurilik sıvısı, serum sıvısı ve tükürük sıvısında ilgili analiti ölçümledikleri yüksek duyarlılıkları ile öne çıkmaktadır. Literatürde SYN alfa tayinine yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur, bu bakımdan literatüre önemli bir katkı sağlamıştır öte yvean PARK-7 (DJ-1) tayinine yönelik henüz hiçbir biyosensör sistemi mevcut değildir ELISA kitleri ise oldukça pahalıdır. Düşük maliyetli, hızlı yanıt süreli ve tek kullanımlık bu sistemler sundukları avantajlarla ileri kullanımlar açısından umut vaat etmektedir.

Daha önce de belirtildiği üzere ITO-PET elektrotlar sağladıkları elektrokimyasal özelliklerinden ötürü modifikasyonlara açık malzemelerdir. Elektrot yüzeyinde yapılan

modifikasyonlar bir biyosensörün sahip olması gereken pek çok önemli niteliği karşılaması gerekir. Bu doktora tezi kapsamında ITO elektrotların modifikasyonu için çok yeni silanlama ajanları (CPTMS, CUTMS) bunlarla kombine edilmiş dendrimerler (PAMAM), nanomalzemeler (altın nanopartikül, Rgo, MWCNT) ve bunlardan oluşan yenilikçi platformlar, SAMs ajanları (11-MUA, 11-AUT) polimerler (poliglutamik asit) faydalanmış ve bu malzemelerin her biri tek kullanımlık ITO-PET elektrotlarla mükemmel bir uyum sağlamıştır, Bu açıdan ITO-PET elektrotların kullanılması çok avantajlıdır. Öte yandan, elektrotların ölçülerinin belirlenmesi ve elektrokimyasal hücreye entegrasyonu tamamen çalışma standartlarında olup endüstriyel standartta değildir haliyle bu durum geliştirilen bazı nöro-biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğine sınırlama getirebilmektedir. İleriki çalışmalarda bu hveikapın aşılması çalışmanın ileri boyutlara taşınmasına yardımcı olacaktır. Bununla birlikte her bir nörobiyosensör sistemi ile analitler BOS, serum ve tükürük sıvısı gibi gerçek örneklerle de (rastgele toplanan) analizlenmiş fakat hasta ve sağlıklı grup ayrımı yapılmamıştır. Hasta ve sağlıklı gruplardan ayrı ayrı alınan fizyolojik örneklerle ölçümler yapıp çapraz istatistiki değerlendirilmelerin yapılması çalışmanın klinik anlamda kullanılabilirliğini daha netleştirebilir.

21. yüzyılın vebası olarak nitelendirilen iki hastalık –Alzheimer ve Parkinson- un erken tanısında önem arz eden biyobelirteçlerine (CRP- SYN ALFA, Tau-441, PARK-7) yönelik geliştirilen 5 ayrı nöro-biyosensör sistemi sergiledikleri analitik performanslar ve kliniksel uygulamalarla çalışmanın hedefine ulaştığını açıkça göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abou- Sleiman, P. M., D. G. Healy, ve ark. (2003). "The role of pathogenic DJ- 1 mutations in Parkinson's disease." *Annals of neurology* 54(3): 283-286.
- Abraham, C. R., D. J. Selkoe, ve ark. (1988). "Immunochemical identification of the serine protease inhibitor α 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease." *Cell* 52(4): 487-501.
- Aftab, M. F. ve R. S. Waraich (2012). "A review of biochemical markers for early diagnosis of Alzheimer's disease." *American Journal of Neuroscience* 3(2): 54-62.
- Agarwal, P., M. E. Orazem, ve ark. (1992). "Measurement models for electrochemical impedance spectroscopy I. Demonstration of applicability." *Journal of the electrochemical society* 139(7): 1917-1927.
- Agrawal, A., A. K. Shrive, ve ark. (2001). "Topology ve structure of the C1q-binding site on C-reactive protein." *The Journal of Immunology* 166(6): 3998-4004.
- AJ, J. A., W. A. Colburn, ve ark. (2001). "Biomarkers ve surrogate endpoints: preferred definitions ve conceptual framework." *Clinical pharmacology ve therapeutics* 69(3): 89-95.
- Alexopoulos, P., L.-S. Gleixner, ve ark. (2017). "Plasma levels of soluble amyloid precursor protein β in symptomatic Alzheimer's disease." *European archives of psychiatry ve clinical neuroscience*: 1-6.
- Allin, K. H. ve B. G. Nordestgaard (2011). "Elevated C-reactive protein in the diagnosis, prognosis, ve cause of cancer." *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 48(4): 155-170.
- Amatore, C., J. M. Savéant, ve ark. (1983). "Charge transfer at partially blocked surfaces: a model for the case of microscopic active ve inactive sites." *Journal of electroanalytical chemistry ve interfacial electrochemistry* 147(1-2): 39-51.
- An, C., X. Pu, ve ark. (2018). "Expression of the DJ-1 protein in the serum of Chinese patients with Parkinson's disease." *Neuroscience letters* 665: 236-239.
- An, Y., X. Jiang, ve ark. (2012). "Sensitive electrochemical immunosensor for α -synuclein based on dual signal amplification using PAMAM dendrimer-encapsulated Au ve enhanced gold nanoparticle labels." *Biosensors ve Bioelectronics* 32(1): 224-230.
- An, Y., L. Tang, ve ark. (2010). "A Photoelectrochemical Immunosensor Based on Au-Doped TiO₂ Nanotube Arrays for the Detection of α - Synuclein." *Chemistry-A European Journal* 16(48): 14439-14446.
- Anoop, A., P. K. Singh, ve ark. (2010). "CSF biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis." *International journal of Alzheimer's disease* 2010.

- Ariga, H. ve S. M. Iguchi-Ariga (2017). DJ-1/PARK7 Protein: Parkinson's Disease, Cancer ve Oxidative Stress-Induced Diseases, Springer.
- Arya, S. K., P. R. Solanki, ve ark. (2009). "Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices." *Biosensors ve Bioelectronics* 24(9): 2810-2817.
- Ashby, E. L., P. G. Kehoe, ve ark. (2010). "Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease ve vascular dementia." *Brain research* 1363: 1-10.
- Association, A. s. (2017). "2017 Alzheimer's disease facts ve figures." *Alzheimer's & Dementia* 13(4): 325-373.
- Atik, A., T. Stewart, ve ark. (2016). "Alpha- Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease." *Brain Pathology* 26(3): 410-418.
- Avila, J., J. S. Jiménez, ve ark. (2016). "Tau Structures." *Frontiers in aging neuroscience* 8: 262.
- AYÇİÇEK, G. Ş. (2017). "Alzheimer Hastalığı." *Turkiye Klinikleri Journal of Geriatrics-Special Topics* 3(1): 16-24.
- Babaei, Z., D. Moslemi, ve ark. (2015). "Relationship of obesity with serum concentrations of leptin, CRP ve IL-6 in breast cancer survivors." *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 27(4): 223-229.
- Bailey, P. (2007). "Biological markers in Alzheimer's disease." *Canadian journal of neurological sciences* 34(S1): S72-S76.
- Bard, A. J., L. R. Faulkner, ve ark. (1980). *Electrochemical methods: fundamentals ve applications*, wiley New York.
- Bartlett, J. ve C. Frost (2008). "Reliability, repeatability ve reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables." *Ultrasound in obstetrics & gynecology* 31(4): 466-475.
- Baskin, F., R. Rosenberg, ve ark. (2000). "Platelet APP isoform ratios correlate with declining cognition in AD." *Neurology* 54(10): 1907-1909.
- Beach, T. G. (2017). "A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease: Will They Swing Us Across the Valley?" *Neurology ve therapy* 6(1): 5-13.
- Bell, K. M. ve S. E. Kornguth (2007). "Biosensors for Neurological Disease." *Hvebook of Biosensors ve Biochips*.
- Benvidi, A., A. Dehghani-Firouzabadi, ve ark. (2015). "Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of levodopa, uric acid ve folic acid." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 736: 22-29.

- Benvidi, A., N. Rajabzadeh, ve ark. (2014). "Simple ve label-free electrochemical impedance Amelogenin gene hybridization biosensing based on reduced graphene oxide." *Biosensors ve Bioelectronics* 58: 145-152.
- Bergström, J. ve M. Ingelsson (2016). "Alpha-Synuclein as a Diagnostic Biomarker for Parkinson's Disease." *Immunotherapy ve Biomarkers in Neurodegenerative Disorders*: 215-234.
- Bhalla, N., P. Jolly, ve ark. (2016). "Introduction to biosensors." *Essays in biochemistry* 60(1): 1-8.
- Black, S., I. Kushner, ve ark. (2004). "C-reactive protein." *Journal of Biological Chemistry* 279(47): 48487-48490.
- Blennow, K. (2017). "A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood." *Neurology ve therapy* 6(1): 15-24.
- Blennow, K., H. Hampel, ve ark. (2010). "Cerebrospinal fluid ve plasma biomarkers in Alzheimer disease." *Nature Reviews Neurology* 6(3): 131.
- Blennow, K., N. Mattsson, ve ark. (2015). "Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease." *Trends in pharmacological sciences* 36(5): 297-309.
- Bouden, S., A. Dahi, ve ark. (2016). "Multifunctional Indium Tin Oxide Electrode Generated by Unusual Surface Modification." *Scientific reports* 6: 36708.
- Boukamp, B. A. (1995). "A Linear Kronig- Kramers Transform Test for Immittance Data Validation." *Journal of the electrochemical society* 142(6): 1885-1894.
- Bourigua, S., M. Hnaïen, ve ark. (2010). "Impedimetric immunosensor based on SWCNT-COOH modified gold microelectrodes for label-free detection of deep venous thrombosis biomarker." *Biosensors ve Bioelectronics* 26(4): 1278-1282.
- Braak, H. ve E. Braak (1997). "Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories." *Neurobiology of aging* 18(4): 351-357.
- Bredesen, D. E. (2009). "Neurodegeneration in Alzheimer's disease: caspases ve synaptic element interdependence." *Molecular neurodegeneration* 4(1): 27.
- Bryan, T., X. Luo, ve ark. (2013). "An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood." *Biosensors ve Bioelectronics* 39(1): 94-98.
- Butterfield, D. A., T. Reed, ve ark. (2011). "Roles of 3-nitrotyrosine-ve 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression ve pathogenesis of Alzheimer's disease." *Free radical research* 45(1): 59-72.
- Campuzano, S., M. Pedrero, ve ark. (2006). "Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 586(1): 112-121.

- Cannes, C., F. Kanoufi, ve ark. (2003). "Cyclic voltammetry ve scanning electrochemical microscopy of ferrocenemethanol at monolayer ve bilayer-modified gold electrodes." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 547(1): 83-91.
- Chahine, L. M., M. B. Stern, ve ark. (2014). "Blood-based biomarkers for Parkinson's disease." *Parkinsonism & related disorders* 20: S99-S103.
- Chaki, N. K. ve K. Vijayamohanan (2002). "Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications." *Biosensors ve Bioelectronics* 17(1-2): 1-12.
- Chalaris, A., C. Garbers, ve ark. (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation ve role in inflammation ve cancer." *European journal of cell biology* 90(6-7): 484-494.
- Chaudhuri, T. K. ve S. Paul (2006). "Protein- misfolding diseases ve chaperone- based therapeutic approaches." *The FEBS journal* 273(7): 1331-1349.
- Chen, A. ve B. Shah (2013). "Electrochemical sensing ve biosensing based on square wave voltammetry." *Analytical Methods* 5(9): 2158-2173.
- Chevallier, F. G., L. Jiang, ve ark. (2006). "Mathematical modelling ve numerical simulation of cyclic voltammetry at an electrode covered with an insulating film containing cylindrical micropores." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 587(2): 254-262.
- Chintamaneni, M. ve M. Bhaskar (2012). "Biomarkers in Alzheimer's disease: a review." *ISRN pharmacology* 2012.
- Chiu, M.-J., L.-Y. Fan, ve ark. (2017). "Plasma Tau Levels in Cognitively Normal Middle-Aged ve Older Adults." *Frontiers in aging neuroscience* 9: 51.
- Choi, J., M. C. Sullards, ve ark. (2006). "Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson ve Alzheimer diseases." *Journal of Biological Chemistry* 281(16): 10816-10824.
- Choi, Y.-H., H. Ko, ve ark. (2015). "Development of a sensitive SPR biosensor for C-reactive protein (CRP) using plasma-treated parylene-N film." *Sensors ve Actuators B: Chemical* 207: 133-138.
- Clark, C., D. Pratico, ve ark. (2006). "Biochemical biomarkers of late-life dementia." *Alzheimers Dement* 2(4): 287-293.
- Colin L. Masters, Rveall Bateman, ve ark. (2015). "Alzheimer's Disease." *Nature Reviews Disease Primers* 1.
- Comyn, J., F. De Buyl, ve ark. (2002). "Kinetics of cure, crosslink density ve adhesion of water-reactive alkoxy silicone sealants." *International journal of adhesion ve adhesives* 22(5): 385-393.
- Dani, M., D. Brooks, ve ark. (2016). "Tau imaging in neurodegenerative diseases." *European journal of nuclear medicine ve molecular imaging* 43(6): 1139-1150.

- Daniels, J. S. ve N. Pourmve (2007). "Label free impedance biosensors: Opportunities ve challenges." *Electroanalysis* 19(12): 1239-1257.
- Davie, C. A. (2008). "A review of Parkinson's disease." *British medical bulletin* 86(1): 109-127.
- de Lau, L. M., P. J. Koudstaal, ve ark. (2005). "Serum uric acid levels ve the risk of Parkinson disease." *Annals of neurology* 58(5): 797-800.
- DeKosky, S. T., M. D. Ikonovic, ve ark. (2003). "Plasma ve cerebrospinal fluid α 1-antichymotrypsin levels in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive impairment." *Annals of neurology* 53(1): 81-90.
- Delenclos, M., D. R. Jones, ve ark. (2016). "Biomarkers in Parkinson's disease: Advances ve strategies." *Parkinsonism & related disorders* 22: S106-S110.
- Demirbakan, B. ve M. K. Sezgintürk (2017). "A sensitive ve disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1." *Talanta* 169: 163-169.
- Devic, I., H. Hwang, ve ark. (2011). "Salivary α -synuclein ve DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease." *Brain* 134(7): e178-e178.
- Dezayee, Z. M. I. ve M. S. M. Al-Nimer (2016). "Saliva c-reactive protein as a biomarker of metabolic syndrome in diabetic patients." *Indian Journal of Dental Research* 27(4): 388.
- Diamveis, E. P., G. M. Yousef, ve ark. (2000). "Human kallikrein 6 as a biomarker of Alzheimer's disease." *Clinical biochemistry* 33(8): 663-667.
- Diao, P., M. Guo, ve ark. (2001). "Characterization of defects in the formation process of self-assembled thiol monolayers by electrochemical impedance spectroscopy." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 495(2): 98-105.
- Diao, P., Z. Liu, ve ark. (2002). "Chemically Assembled Single- Wall Carbon Nanotubes ve their Electrochemistry." *ChemPhysChem* 3(10): 898-991.
- Dickson, D. ve R. O. Weller (2011). *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia ve movement disorders*, John Wiley & Sons.
- Donev, R., M. Kolev, ve ark. (2009). "Neuronal death in Alzheimer's disease ve therapeutic opportunities." *Journal of cellular ve molecular medicine* 13(11- 12): 4329-4348
- Du Clos, T. W. ve C. Mold (2004). "C-reactive protein." *Immunologic research* 30(3): 261-277.
- Dua, T. (2004). *Atlas: Country Resources for Neurological Disorders 2004: Results of a Collaborative Study of the World Health Organization ve the World Federation of Neurology*, World Health Organization.

- Dursun, E., D. Gezen-Ak, ve ark. (2015). "The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 ve alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease." *Journal of neuroimmunology* 283: 50-57.
- Eikelenboom, P., E. Van Exel, ve ark. (2010). "Neuroinflammation—an early event in both the history ve pathogenesis of Alzheimer's disease." *Neurodegenerative Diseases* 7(1-3): 38-41.
- El Kadmiri, N., N. Said, ve ark. (2017). "Biomarkers for Alzheimer disease: Classical ve novel cveidates' review." *Neuroscience*.
- Emamzadeh, F. N. (2016). "Alpha-synuclein structure, functions, ve interactions." *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 21.
- Emilien, G., C. Durlach, ve ark. (2012). *Alzheimer disease: neuropsychology ve pharmacology*, Birkhäuser.
- Esfve, R. ve D. A. Tomalia (2001). "Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery ve biomedical applications." *Drug discovery today* 6(8): 427-436.
- Esteban, J. M. ve M. E. Orazem (1991). "On the Application of the Kramers- Kronig Relations to Evaluate the Consistency of Electrochemical Impedance Data." *Journal of the electrochemical society* 138(1): 67-76.
- Esteves-Villanueva, J. O., H. Trzeciakiewicz, ve ark. (2014). "A protein-based electrochemical biosensor for detection of tau protein, a neurodegenerative disease biomarker." *Analyst* 139(11): 2823-2831.
- Evtugyn, G. A., T. Hianik, ve ark. (2017). "Biosensors for Detection of Neurotransmitters ve Neurodegenerative Related Diseases." *Frontiers in Clinical Drug Research-CNS ve Neurological Disorders* 5: 184.
- Fagan, A. M. ve D. M. Holtzman (2010). "Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease." *Biomarkers in medicine* 4(1): 51-63.
- Fasmin, F. ve R. Srinivasan (2015). "Detection of nonlinearities in electrochemical impedance spectra by Kramers–Kronig Transforms." *Journal of Solid State Electrochemistry* 19(6): 1833-1847.
- Fernández-Bergés, D., L. Consuegra-Sánchez, ve ark. (2014). "Metabolic ve inflammatory profiles of biomarkers in obesity, metabolic syndrome, ve diabetes in a mediterranean population. DARIOS inflammatory study." *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 67(8): 624-631.
- Finklea, H. (1996). "Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes." *ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY: A SERIES OF ADVANCES, VOL 19* 19: 109-335.

- Forman, M. S., J. Q. Trojanowski, ve ark. (2004). "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs." *Nature medicine* 10(10): 1055-1063.
- Foster, N. L., J. L. Heidebrink, ve ark. (2007). "FDG-PET improves accuracy in distinguishing frontotemporal dementia ve Alzheimer's disease." *Brain* 130(10): 2616-2635.
- Galasko, D. ve T. J. Montine (2010). "Biomarkers of oxidative damage ve inflammation in Alzheimer's disease." *Biomarkers in medicine* 4(1): 27-36.
- Galimberti, D. ve E. Scarpini (2008). *Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease*, Nova Science.
- Ganesh, H. V., A. M. Chow, ve ark. (2016). "Recent advances in biosensors for neurodegenerative disease detection." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 79: 363-370.
- Ganesh, V., R. R. Pveey, ve ark. (2008). "Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of thiophenol ve aminothiophenols on polycrystalline Au: Effects of potential cycling ve mixed SAM formation." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 619: 87-97.
- Gao, L., H. Tang, ve ark. (2015). "Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review ve meta-analysis." *International Journal of Neuroscience* 125(9): 645-654.
- García-Raya, D., R. Madueño, ve ark. (2008). "Electrochemical characterization of a 1, 8-octanedithiol self-assembled monolayer (ODT-SAM) on a Au (1 1 1) single crystal electrode." *Electrochimica Acta* 53(27): 8026-8033.
- Garnett, E., G. Firnau, ve ark. (1983). "Dopamine visualized in the basal ganglia of living man." *Nature* 305(5930): 137.
- Geng, X., H. Lou, ve ark. (2011). " α -Synuclein binds the KATP channel at insulin-secretory granules ve inhibits insulin secretion." *American Journal of Physiology-Endocrinology ve Metabolism* 300(2): E276-E286.
- Genius, J., H. Klafki, ve ark. (2012). "Current application of neurochemical biomarkers in the prediction ve differential diagnosis of Alzheimer's disease ve other neurodegenerative dementias." *European archives of psychiatry ve clinical neuroscience* 262(2): 71-77.
- Gitler, A. D., P. Dhillon, ve ark. (2017). *Neurodegenerative disease: models, mechanisms, ve a new hope*, The Company of Biologists Ltd.
- Glenner, G. G. ve C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification ve characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochemical ve biophysical research communications* 120(3): 885-890.
- Goldblatt, D. (2001). "Affinity of antigen-antibody interactions." eLS.

- Goldman, J. S., S. E. Hahn, ve ark. (2011). "Genetic counseling ve testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics ve the National Society of Genetic Counselors." *Genetics in Medicine* 13(6): 597.
- Goldschmidt, L., P. K. Teng, ve ark. (2010). "Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(8): 3487-3492.
- Gómez-Río, M., M. M. Caballero, ve ark. (2016). "Diagnosis of neurodegenerative diseases: the clinical approach." *Current Alzheimer Research* 13(5): 469-474.
- Gong, C., D. Wei, ve ark. (2016). "A meta-analysis of C-reactive protein in patients with Alzheimer's disease." *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias* 31(3): 194-200.
- Goode, J., J. Rushworth, ve ark. (2014). "Biosensor regeneration: a review of common techniques ve outcomes." *Langmuir* 31(23): 6267-6276.
- Gooding, J., V. Praig, ve ark. (1998). "Platinum-catalyzed enzyme electrodes immobilized on gold using self-assembled layers." *Analytical chemistry* 70(11): 2396-2402.
- Gooding, J. J. ve S. Ciampi (2011). "The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies." *Chemical Society Reviews* 40(5): 2704-2718.
- Gozes, I., G. Höglinger, ve ark. (2017). "Tau diagnostics ve clinical studies." *Journal of Molecular Neuroscience* 63(2): 123-130.
- Grochowska, K., K. Siuzdak, ve ark. (2015). "Properties of an Indium Tin Oxide Electrode Modified by a Laser Nanostructured Thin Au Film for Biosensing." *European Journal of Inorganic Chemistry* 2015(7): 1275-1281.
- Growdon, J., D. Selkoe, ve ark. (1998). "Consensus report of the Working Group on Biological markers of Alzheimer's disease.[Ronald ve Nancy Reagan Institute of the Alzheimer's Association ve National Institute on Aging Working Group on Biological Markers of Alzheimer's Disease]." *Neurobiol Aging* 19: 109-116.
- Guo, T., W. Noble, ve ark. (2017). "Roles of tau protein in health ve disease." *Acta neuropathologica* 133(5): 665-704.
- Gupta, R. K., A. Periyakaruppan, ve ark. (2014). "Label-free detection of C-reactive protein using a carbon nanofiber based biosensor." *Biosensors ve Bioelectronics* 59: 112-119.
- Gupta, V. K., R. Jain, ve ark. (2011). "Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—a review." *Analytical biochemistry* 408(2): 179-196.
- Haensch, C., S. Hoepfner, ve ark. (2010). "Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions." *Chemical Society Reviews* 39(6): 2323-2334.

- Hall, S., A. Öhrfelt, ve ark. (2012). "Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia ve/or parkinsonian disorders." *Archives of neurology* 69(11): 1445-1452.
- Hampel, H., K. Blennow, ve ark. (2010). "Total ve phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease." *Experimental gerontology* 45(1): 30-40.
- HANAĞASI, H. A. (2012). "Alzheimer Hastalığının Genetik Kökeni ve Biyobelirteçleri." *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics* 5(3): 11-17.
- Hardy, J. ve D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress ve problems on the road to therapeutics." *science* 297(5580): 353-356.
- Harris, J. J. ve M. L. Bruening (2000). "Electrochemical ve in situ ellipsometric investigation of the permeability ve stability of layered polyelectrolyte films." *Langmuir* 16(4): 2006-2013.
- Hasanzadeh, M., N. Shadjou, ve ark. (2014). "Dendrimer-encapsulated ve cored metal nanoparticles for electrochemical nanobiosensing." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 53: 137-149.
- He, R.-X. ve D.-W. Zha (2017). "Cyclic voltammetry ve voltabsorptometry studies of redox mechanism of lumazine." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 791: 103-108.
- Hecht, S. ve J. M. Fréchet (2001). "Dendritic encapsulation of function: applying nature's site isolation principle from biomimetics to materials science." *Angewwete Chemie International Edition* 40(1): 74-91.
- Heneka, M. T., M. J. Carson, ve ark. (2015). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." *The Lancet Neurology* 14(4): 388-405.
- Henriksen, K., S. E. O'Bryant, ve ark. (2014). "The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease." *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 10(1): 115-131.
- Henriques, A. D., A. L. Benedet, ve ark. (2018). "Fluid ve imaging biomarkers for Alzheimer's disease: Where we stve ve where to head to." *Experimental gerontology*.
- Hezard, T., K. Fajerweg, ve ark. (2012). "Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg (II) trace analysis." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 664: 46-52.
- Hillebrvet, H. ve M. Tanaka (2001). "Electrochemical Characterization of Self-Assembled Alkylsiloxane Monolayers on Indium– Tin Oxide (ITO) Semiconductor Electrodes." *The Journal of Physical Chemistry B* 105(19): 4270-4276.
- Holzinger, M., A. Le Goff, ve ark. (2014). "Nanomaterials for biosensing applications: a review." *Frontiers in chemistry* 2: 63.
- Hong, S., Y. Kang, ve ark. (2012). "Elevated serum C-reactive protein as a prognostic marker in small cell lung cancer." *Yonsei medical journal* 53(1): 111-117.

- Hong, Z., M. Shi, ve ark. (2010). "DJ-1 ve α -synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease." *Brain* 133(3): 713-726.
- Humpel, C. (2011). "Identifying ve validating biomarkers for Alzheimer's disease." *Trends in biotechnology* 29(1): 26-32.
- Huynh, R. A. ve C. Mohan (2017). "Alzheimer's disease: biomarkers in the genome, blood, ve cerebrospinal fluid." *Frontiers in neurology* 8: 102.
- Hühmer, A. F., R. G. Biringer, ve ark. (2006). "Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress ve future challenges." *Disease markers* 22(1-2): 3-26.
- Iqbal, K., F. Liu, ve ark. (2016). "Tau ve neurodegenerative disease: the story so far." *Nature Reviews Neurology* 12(1): 15.
- Iqbal, K., F. Liu, ve ark. (2010). "Tau in Alzheimer disease ve related tauopathies." *Current Alzheimer Research* 7(8): 656-664.
- Isaac, M., S. Vamvakas, ve ark. (2017). "Diagnostic biomarkers for Alzheimer's disease: a regulatory view." *The Lancet Neurology* 16(8): 580-581.
- Janek, R. P., W. R. Fawcett, ve ark. (1998). "Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au (111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes." *Langmuir* 14(11): 3011-3018.
- Jankovic, J. (2003). "Pathophysiology ve clinical assessment of parkinsonian symptoms ve signs." *Neurological Disease ve Therapy* 59: 71-108.
- Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features ve diagnosis." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 79(4): 368-376.
- Jellinger, K. A. (2009). "Recent advances in our understveing of neurodegeneration." *Journal of neural transmission* 116(9): 1111-1162.
- Jin, H., A. Kanthasamy, ve ark. (2011). " α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity." *Journal of Neuroscience* 31(6): 2035-2051.
- Kang, J.-H., D. J. Irwin, ve ark. (2013). "Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, ve α -synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease." *JAMA neurology* 70(10): 1277-1287.
- Kang, M. K., J. Lee, ve ark. (2015). "Label-free detection of ApoE4-mediated β -amyloid aggregation on single nanoparticle uncovering Alzheimer's disease." *Biosensors ve Bioelectronics* 72: 197-204.
- Kang, W.-Y., Q. Yang, ve ark. (2014). "Salivary DJ-1 could be an indicator of Parkinson's disease progression." *Frontiers in aging neuroscience* 6: 102.

- Kapaki, E., G. P. Paraskevas, ve ark. (2013). "The diagnostic value of CSF α -synuclein in the differential diagnosis of dementia with Lewy bodies vs. normal subjects ve patients with Alzheimer's disease." *PloS one* 8(11): e81654.
- KARA, İ. (2008). "İnflamasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar." *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 28(6): 115-118.
- Katz, E. ve I. Willner (2003). "Probing biomolecular interactions at conductive ve semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA- sensors, ve enzyme biosensors." *Electroanalysis* 15(11): 913-947.
- Kaushik, S. ve A. M. Cuervo (2015). "Proteostasis ve aging." *Nature medicine* 21(12): 1406.
- Kerman, K., D.-K. Kim, ve ark. (2008). "Detection of Alzheimer's tau protein using localised surface plasmon resonance-based immunochip." *Talanta* 74(4): 1038-1042.
- Kerman, K. ve E. Tamiya (2006). "The study of Alzheimer's disease biomarkers." *NanoBiotechnology* 2(1-2): 5-16.
- Kester, M. I., C. E. Teunissen, ve ark. (2015). "Neurogranin as a cerebrospinal fluid biomarker for synaptic loss in symptomatic Alzheimer disease." *JAMA neurology* 72(11): 1275-1280.
- Khan, M. Z. H. (2016). "Effect of ITO surface properties on SAM modification: A review toward biosensor application." *Cogent Engineering* 3(1): 1170097.
- Khatri, A., N. Punjabi, ve ark. (2018). "Detection ve differentiation of α -Synuclein monomer ve fibril by chitosan film coated nanogold array on optical sensor platform." *Sensors ve Actuators B: Chemical* 255: 692-700.
- Knopman, D. S., S. T. DeKosky, ve ark. (2001). "Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review) Report of the Quality Stveards Subcommittee of the American Academy of Neurology." *Neurology* 56(9): 1143-1153.
- Korolev, I. O. (2014). "Alzheimer's disease: a clinical ve basic science review." *Medical Student Research Journal* 4: 24-33.
- Köhler, G. ve C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495.
- Kravitz, B. A., M. M. Corrada, ve ark. (2009). "Elevated C-reactive protein levels are associated with prevalent dementia in the oldest-old." *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 5(4): 318-323.
- Kruse, N., W. J. Schulz-Schaeffer, ve ark. (2012). "Development of electrochemiluminescence-based singleplex ve multiplex assays for the quantification of α -synuclein ve other proteins in cerebrospinal fluid." *Methods* 56(4): 514-518.

- Layek, R. K. ve A. K. Nvei (2013). "A review on synthesis ve properties of polymer functionalized graphene." *Polymer* 54(19): 5087-5103.
- Le, W., J. Dong, ve ark. (2017). "Can Biomarkers Help the Early Diagnosis of Parkinson's Disease?" *Neuroscience bulletin* 33(5): 535-542.
- Lee, S. H., S. Choi, ve ark. (2017). "A photothermal biosensor for detection of C-reactive protein in human saliva." *Sensors ve Actuators B: Chemical* 246: 471-476.
- Lee, S. H., J. H. Sung, ve ark. (2012). "Nanomaterial-based biosensor as an emerging tool for biomedical applications." *Annals of biomedical engineering* 40(6): 1384-1397.
- Lehmann, S., C. Delaby, ve ark. (2013). "Biomarkers of Alzheimer's disease: the present ve the future." *Revue neurologique* 169(10): 719-723.
- Leoni, V. ve C. Caccia (2011). "Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases." *Chemistry ve physics of lipids* 164(6): 515-524.
- Lev, N., D. Roncevich, ve ark. (2006). "Role of DJ-1 in Parkinson's disease." *Journal of Molecular Neuroscience* 29(3): 215-225.
- Lewczuk, P., H. Kamrowski-Kruck, ve ark. (2010). "Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study." *Molecular psychiatry* 15(2): 138.
- Li, Y., H. J. Schluesener, ve ark. (2010). "Gold nanoparticle-based biosensors." *Gold Bulletin* 43(1): 29-41.
- Lisdat, F. ve D. Schäfer (2008). "The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing." *Analytical ve bioanalytical chemistry* 391(5): 1555.
- Liu, C., D. Jiang, ve ark. (2014). "An electrochemical DNA biosensor for the detection of mycobacterium tuberculosis, based on signal amplification of graphene ve a gold nanoparticle–polyaniline nanocomposite." *Analyst* 139(21): 5460-5465.
- Liu, X., L. Luo, ve ark. (2011). "Poly-glutamic acid modified carbon nanotube-doped carbon paste electrode for sensitive detection of L-tryptophan." *Bioelectrochemistry* 82(1): 38-45.
- Liu, X., L. Xie, ve ark. (2012). "Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide ve Au nanoparticles entrapped in chitosan/silica sol–gel hybrid membranes for determination of dopamine ve uric acid." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 682: 158-163.
- Liu, Z., W. Li, ve ark. (2014). "Towards label-free impedance biosensors: CRP probe based on thiol Schiff-nickel complex modified gold nanoparticles." *Journal of the electrochemical society* 161(5): B75-B80.
- Lix, L. M., D. E. Hobson, ve ark. (2010). "Socioeconomic variations in the prevalence ve incidence of Parkinson's disease: a population-based analysis." *Journal of Epidemiology & Community Health* 64(4): 335-340.

- Lu, H., X.-C. Zhu, ve ark. (2015). "Body fluid biomarkers in Alzheimer's disease." *Annals of translational medicine* 3(5).
- Luo, X., A. Morrin, ve ark. (2006). "Application of nanoparticles in electrochemical sensors ve biosensors." *Electroanalysis* 18(4): 319-326.
- Lyman, M., D. G. Lloyd, ve ark. (2014). "Neuroinflammation: the role ve consequences." *Neuroscience research* 79: 1-12.
- Ma, W., L.-X. Qin, ve ark. (2013). "Ubiquinone-quantum dot bioconjugates for in vitro ve intracellular complex I sensing." *Scientific reports* 3: 1537.
- Ma, Y., J. Di, ve ark. (2009). "Direct electrodeposition of gold nanoparticles on indium tin oxide surface ve its application." *Biosensors ve Bioelectronics* 24(5): 1480-1483.
- Macdonald, J. R. ve E. Barsoukov (2005). "Impedance spectroscopy: theory, experiment, ve applications." *History* 1(8).
- Mahlknecht, P., A. Hotter, ve ark. (2010). "Significance of MRI in diagnosis ve differential diagnosis of Parkinson's disease." *Neurodegenerative Diseases* 7(5): 300-318.
- Mancinella, A., M. Mancinella, ve ark. (2009). "Is there a relationship between high C-reactive protein (CRP) levels ve dementia?" *Archives of gerontology ve geriatrics* 49: 185-194.
- Marín, S. ve A. Merkoçi (2012). "Nanomaterials based electrochemical sensing applications for safety ve security." *Electroanalysis* 24(3): 459-469.
- Marras, C. ve A. Lang (2012). "Parkinson's disease subtypes: lost in translation?" *J Neurol Neurosurg Psychiatry*: jnnp-2012-303455.
- Marsden, J. G. ve L. P. Ziemianski (1979). "Organofunctional silanes—functions, applications ve advantages." *Polymer International* 11(4): 199-205.
- Martinez, J., I. Moeller, ve ark. (2003). "Parkinson's disease-associated α -synuclein is a calmodulin substrate." *Journal of Biological Chemistry* 278(19): 17379-17387.
- Martino, M., T. Klatter, ve ark. (2013). "Validation of serum C-reactive protein (CRP) as an independent prognostic factor for disease-free survival in patients with localised renal cell carcinoma (RCC)." *BJU international* 111(8).
- Masters, J. M., A. J. Noyce, ve ark. (2015). "Elevated salivary protein in Parkinson's disease ve salivary DJ-1 as a potential marker of disease severity." *Parkinsonism & related disorders* 21(10): 1251-1255.
- McKhann, G. M., D. S. Knopman, ve ark. (2011). "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's

- disease." *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 7(3): 263-269.
- McNaught, A. D. (1997). *Compendium of chemical terminology*, Blackwell Science Oxford.
- Miller, D. W., M. R. Cookson, ve ark. (2004). "Glial cell inclusions ve the pathogenesis of neurodegenerative diseases." *Neuron glia biology* 1(1): 13-21.
- Miskam, M., N. K. A. Bakar, ve ark. (2013). "Preparation ve characterization of new sol–gel titanium (IV) butoxide–cyanopropyltriethoxysilane hybrid sorbent for extraction of polar aromatic amines." *Journal of sol-gel science ve technology* 67(1): 121-129.
- Mittal, S., H. Kaur, ve ark. (2017). "Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers ve signal amplification strategies." *Biosensors ve Bioelectronics* 88: 217-231.
- Molinero, V. ve E. J. Calvo (1998). "Electrostatic interactions at self assembled molecular films of charged thiols on gold." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 445(1-2): 17-25.
- Mollenhauer, B., J. J. Locascio, ve ark. (2011). " α -Synuclein ve tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study." *The Lancet Neurology* 10(3): 230-240.
- Motie, M., L. S. Evangelista, ve ark. (2014). "Association between inflammatory biomarkers ve adiposity in obese patients with heart failure ve metabolic syndrome." *Experimental ve therapeutic medicine* 8(1): 181-186.
- Mufson, E. J. ve S. Leurgans (2010). "Inability of plasma ve urine F2A-isoprostane levels to differentiate mild cognitive impairment from Alzheimer's disease." *Neurodegenerative Diseases* 7(1-3): 139-142.
- Muszynski, R., B. Seger, ve ark. (2008). "Decorating graphene sheets with gold nanoparticles." *The Journal of Physical Chemistry C* 112(14): 5263-5266.
- Müller, U. C., T. Deller, ve ark. (2017). "Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family." *Nature Reviews Neuroscience* 18(5): 281.
- Nagakubo, D., T. Taira, ve ark. (1997). "DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation withras." *Biochemical ve biophysical research communications* 231(2): 509-513.
- Nahar, A., A. Lukose, ve ark. (2017). "Alzheimer's Dementia: An Overview." *Journal of the Indian Institute of Science* 97(4): 591-602.
- Nalls, M. A., N. Pankratz, ve ark. (2014). "Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease." *Nature genetics* 46(9): 989.
- Nigam, S., S. Chvera, ve ark. (2015). "Dendrimers based electrochemical biosensors." *Biomed. Res. J.* 2: 21-36.

- Nilsson, K. P. R., K. Ikenberg, ve ark. (2010). "Structural typing of systemic amyloidoses by luminescent-conjugated polymer spectroscopy." *The American journal of pathology* 176(2): 563-574.
- Njagi, J. I. ve S. M. Kagwanja (2011). *The interface in biosensing: improving selectivity ve sensitivity. Interfaces ve Interphases in Analytical Chemistry*, ACS Publications: 225-247.
- O'Bryant, S. E., L. Johnson, ve ark. (2013). "The link between C-reactive protein ve Alzheimer's disease among Mexican Americans." *Journal of Alzheimer's Disease* 34(3): 701-706.
- Orosz, F., A. Lehotzky, ve ark. (2009). "TPPP/p25: A new unstructured protein hallmarking synucleinopathies." *Protein folding ve misfolding: neurodegenerative diseases*: 225-250.
- Osera, C., A. Pascale, ve ark. (2012). "Pentraxins ve Alzheimer's disease: at the interface between biomarkers ve pharmacological targets." *Ageing research reviews* 11(2): 189-198.
- Ostrerova, N., L. Petrucelli, ve ark. (1999). " α -Synuclein shares physical ve functional homology with 14-3-3 proteins." *Journal of Neuroscience* 19(14): 5782-5791.
- Packard, R. R. ve P. Libby (2008). "Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery ve risk prediction." *Clinical chemistry* 54(1): 24-38.
- Padovani, A., B. Borroni, ve ark. (2002). "Abnormalities in the pattern of platelet amyloid precursor protein forms in patients with mild cognitive impairment ve Alzheimer disease." *Archives of neurology* 59(1): 71-75.
- PANTEL, J. ve H. HAMPEL (2010). "Blood ve cerebrospinal fluid biological markers for Alzheimer's disease." *Dementia*: 459.
- Park, S. M., H. Y. Jung, ve ark. (2002). "Distinct roles of the N-terminal-binding domain ve the C-terminal-solubilizing domain of α -synuclein, a molecular chaperone." *Journal of Biological Chemistry* 277(32): 28512-28520.
- Parkinson, J. (2002). "An essay on the shaking palsy." *The Journal of neuropsychiatry ve clinical neurosciences* 14(2): 223-236.
- Parnetti, L., A. Castrioto, ve ark. (2013). "Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease." *Nature Reviews Neurology* 9(3): 131.
- Parnetti, L., D. Chiasserini, ve ark. (2014). "Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes ve alpha- synuclein in Parkinson's disease." *Movement disorders* 29(8): 1019-1027.
- Pavlidis, I. V., T. Vorhaben, ve ark. (2012). "Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials." *Journal of Nanoparticle Research* 14(5): 842.

- Peng, X. M., R. Tehranian, ve ark. (2005). " α -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells." *J Cell Sci* 118(15): 3523-3530.
- Pensa, E., E. Cortés, ve ark. (2012). "The chemistry of the sulfur–gold interface: in search of a unified model." *Accounts of chemical research* 45(8): 1183-1192.
- Pepys, M. B. ve G. M. Hirschfield (2003). "C-reactive protein: a critical update." *The Journal of clinical investigation* 111(12): 1805-1812.
- Pierce, B. L., R. Ballard-Barbash, ve ark. (2009). "Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients." *Journal of Clinical Oncology* 27(21): 3437-3444.
- Pinter, B., A. Diem- Zangerl, ve ark. (2015). "Mortality in Parkinson's disease: A 38- year follow- up study." *Movement disorders* 30(2): 266-269.
- Plueddemann, E. P. (1978). "Silane coupling agents." *Additives for plastics* 1: 123-167.
- Poewe, W., K. Seppi, ve ark. (2017). "Parkinson disease." *Nature reviews Disease primers* 3: 17013.
- Politis, M. (2014). "Neuroimaging in Parkinson disease: from research setting to clinical practice." *Nature Reviews Neurology* 10(12): 708.
- Prince, M., A. Comas-Herrera, ve ark. (2016). "World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality ve costs now ve in the future."
- Prince, M., A. Wimo, ve ark. (2015). "World Alzheimer's report 2015—the global impact of dementia. Alzheimer's disease international." *Alzheimer's Disease International (ADI)*, London.
- Pringsheim, T., N. Jette, ve ark. (2014). "The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review ve meta- analysis." *Movement disorders* 29(13): 1583-1590.
- Prodromidis, M. I. (2010). "Impedimetric immunosensors—A review." *Electrochimica Acta* 55(14): 4227-4233.
- Puri, N., A. Niazi, ve ark. (2014). "Synthesis ve Characterization of Reduced Graphene Oxide Supported Gold Nanoparticles-Poly (Pyrrole-Co-Pyrrolepropylic Acid) Nanocomposite-Based Electrochemical Biosensor." *Applied biochemistry ve biotechnology* 174(3): 911-925.
- Qiang, J. K., Y. C. Wong, ve ark. (2013). "Plasma apolipoprotein A1 as a biomarker for Parkinson disease." *Annals of neurology* 74(1): 119-127.
- Qu, J., S. Yu, ve ark. (2017). "Aptamer ve its applications in neurodegenerative diseases." *Cellular ve Molecular Life Sciences* 74(4): 683-695.

- Rachakonda, V., T. H. Pan, ve ark. (2004). "Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they?" *Cell Research* 14(5): 349.
- Reverberi, R. ve L. Reverberi (2007). "Factors affecting the antigen-antibody reaction." *Blood transfusion* 5(4): 227.
- Rocha, E. M., B. De Mirvea, ve ark. (2018). "Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction ve neuroinflammation in Parkinson's disease." *Neurobiology of Disease* 109: 249-257.
- Rosén, C., O. Hansson, ve ark. (2013). "Fluid biomarkers in Alzheimer's disease—current concepts." *Molecular neurodegeneration* 8(1): 20.
- Ruipérez, V., F. Darios, ve ark. (2010). "Alpha-synuclein, lipids ve Parkinson's disease." *Progress in lipid research* 49(4): 420-428.
- Saifuddin, N., A. Raziah, ve ark. (2012). "Carbon nanotubes: a review on structure ve their interaction with proteins." *Journal of Chemistry* 2013.
- Saito, Y. (2014). "Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease." *Journal of clinical biochemistry ve nutrition* 54(3): 138-144.
- Sanghavi, B. J., S. Sitaula, ve ark. (2013). "Real-time electrochemical monitoring of adenosine triphosphate in the picomolar to micromolar range using graphene-modified electrodes." *Analytical chemistry* 85(17): 8158-8165.
- Sanghavi, B. J., O. S. Wolfbeis, ve ark. (2015). "Nanomaterial-based electrochemical sensing of neurological drugs ve neurotransmitters." *Microchimica acta* 182(1-2): 1-41.
- Santiago- Rodríguez, L., G. Sánchez- Pomales, ve ark. (2010). "DNA- Functionalized Carbon Nanotubes: Synthesis, Self- Assembly, ve Applications." *Israel Journal of Chemistry* 50(3): 277-290.
- Santos, D. P., M. V. B. Zanoni, ve ark. (2008). "Poly (glutamic acid) nanofibre modified glassy carbon electrode: Characterization by atomic force microscopy, voltammetry ve electrochemical impedance." *Electrochimica Acta* 53(11): 3991-4000.
- Sawaya, M. R., S. Sambashivan, ve ark. (2007). "Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers." *Nature* 447(7143): 453.
- Scherling, C. S., T. Hall, ve ark. (2014). "Cerebrospinal fluid neurofilament concentration reflects disease severity in frontotemporal degeneration." *Annals of neurology* 75(1): 116-126.
- Scott, D. ve S. Roy (2012). " α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility ve maintains recycling-pool homeostasis." *Journal of Neuroscience* 32(30): 10129-10135.
- Sennvik, K., J. Fastbom, ve ark. (2000). "Levels of α -ve β -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients." *Neuroscience letters* 278(3): 169-172.

- Sha, Y., Z. Guo, ve ark. (2015). "A one-step electrochemiluminescence immunosensor preparation for ultrasensitive detection of carbohydrate antigen 19-9 based on multi-functionalized graphene oxide." *Biosensors ve Bioelectronics* 66: 468-473.
- Shalash, A., M. Salama, ve ark. (2017). "elevated serum α -synuclein autoantibodies in Patients with Parkinson's Disease relative to alzheimer's Disease ve controls." *Frontiers in neurology* 8: 720.
- Sharma, N. ve A. N. Singh (2016). "Exploring biomarkers for Alzheimer's disease." *Journal of clinical ve diagnostic research: JCDR* 10(7): KE01.
- Shaw, L. M., M. Korecka, ve ark. (2007). "Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis ve monitoring therapeutics." *Nature reviews Drug discovery* 6(4): nrd2176.
- Sheikh-Bahaei, N., S. A. Sajjadi, ve ark. (2017). "Current Role for Biomarkers in Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease ve Frontotemporal Dementia." *Current treatment options in neurology* 19(12): 46.
- Sheinerman, K. S. ve S. R. Umansky (2013). "Early detection of neurodegenerative diseases: circulating brain-enriched microRNA." *Cell cycle* 12(1): 1-2.
- Shui, B., D. Tao, ve ark. (2018). "Biosensors for Alzheimer's disease biomarker detection: A review." *Biochimie*.
- Simonsen, A. H., J. McGuire, ve ark. (2007). "Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment." *Archives of neurology* 64(3): 366-370.
- Singal, S. ve R. K. Kotnala (2017). "Single Frequency Impedance Analysis on Reduced Graphene Oxide Screen-Printed Electrode for Biomolecular Detection." *Applied biochemistry ve biotechnology* 183(2): 672-683.
- Sisman, A. R., Tuncay Küme, ve ark. (2007). "C-Reactive Protein: Clinical Significance, Improvements in Methodology, Pre-Analytical ve Analytical Variations." *Türk Klinik Biyokimya Derg* 5(1): 33-41.
- Sjögren, M., H. Vveerstichele, ve ark. (2001). "Tau ve A β 42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21–93 years of age: establishment of reference values." *Clinical chemistry* 47(10): 1776-1781.
- Slevin, M., S. Matou, ve ark. (2015). "Monomeric C-reactive protein-a key molecule driving development of Alzheimer's disease associated with brain ischaemia?" *Scientific reports* 5: 13281.
- Sode, K., S. Ochiai, ve ark. (2007). "Effect of reparation of repeat sequences in the human α -synuclein on fibrillation ability." *International journal of biological sciences* 3(1): 1.
- Song, F., A. Poljak, ve ark. (2009). "Plasma biomarkers for mild cognitive impairment ve Alzheimer's disease." *Brain research reviews* 61(2): 69-80.

- Songjaroen, T., R. M. Feeny, ve ark. (2016). "Label-free detection of C-reactive protein using an electrochemical DNA immunoassay." *Sensing ve bio-sensing research* 8: 14-19.
- Spampinato, V., M. A. Parracino, ve ark. (2016). "Surface analysis of gold nanoparticles functionalized with thiol-modified glucose SAMs for biosensor applications." *Frontiers in chemistry* 4: 8.
- Spillantini, M. G. ve M. Goedert (2013). "Tau pathology ve neurodegeneration." *The Lancet Neurology* 12(6): 609-622.
- Stefanis, L. (2012). " α -Synuclein in Parkinson's disease." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(2): a009399.
- Stevens, M. J. (1999). "Thoughts on the structure of alkylsilane monolayers." *Langmuir* 15(8): 2773-2778.
- Stoessl, A. J., S. Lehericy, ve ark. (2014). "Imaging insights into basal ganglia function, Parkinson's disease, ve dystonia." *The Lancet* 384(9942): 532-544.
- Stoothoff, W. H. ve G. V. Johnson (2005). "Tau phosphorylation: physiological ve pathological consequences." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1739(2-3): 280-297.
- Strang, F., A. Scheichl, ve ark. (2012). "Amyloid Plaques Dissociate Pentameric to Monomeric C- Reactive Protein: A Novel Pathomechanism Driving Cortical Inflammation in Alzheimer's Disease?" *Brain Pathology* 22(3): 337-346.
- Sultana, R. ve D. A. Butterfield (2010). "Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 19(1): 341-353.
- Sunderlve, T., H. Hampel, ve ark. (2006). "Biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease: are we ready?" *Journal of geriatric psychiatry ve neurology* 19(3): 172-179.
- Swanson, C. R., Y. Berlyve, ve ark. (2015). "Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset ve motor severity in early Parkinson's disease patients." *Movement disorders* 30(12): 1648-1656.
- Taira, T., Y. Saito, ve ark. (2004). "DJ- 1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death." *EMBO reports* 5(2): 213-218.
- Taitt, C. R., G. P. Veerson, ve ark. (2005). "Evanescent wave fluorescence biosensors." *Biosensors ve Bioelectronics* 20(12): 2470-2487.
- Taurino, I., G. De Micheli, ve ark. (2012). "Multiwalled carbon nanotubes for amperometric array-based biosensors." *BioNanoScience* 2(4): 185-195.
- Thal, L. J., K. Kantarci, ve ark. (2006). "The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease." *Alzheimer disease ve associated disorders* 20(1): 6.
- Thambisetty, M. ve S. Lovestone (2010). "Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible." *Biomarkers in medicine* 4(1): 65-79.

- Thangamuthu, M., C. Santschi, ve ark. (2018). "Label-Free Electrochemical Immunoassay for C-Reactive Protein." *Biosensors* 8(2): 34.
- Tillett, W. S. ve T. Francis (1930). "Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus." *Journal of Experimental Medicine* 52(4): 561-571.
- Tîlmaciu, C.-M. ve M. C. Morris (2015). "Carbon nanotube biosensors." *Frontiers in chemistry* 3: 59.
- Timmer, N. M., M. K. Herbert, ve ark. (2015). "Total glutamine synthetase levels in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients are unchanged." *Neurobiology of aging* 36(3): 1271-1273.
- Tokuda, K., T. Gueshi, ve ark. (1979). "Voltammetry at partially covered electrodes: Part III. faradaic impedance measurements at model electrodes." *Journal of electroanalytical chemistry ve interfacial electrochemistry* 102(1): 41-48.
- Tokuda, T., M. Qureshi, ve ark. (2010). "Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease." *Neurology* 75(20): 1766-1770.
- Tomalia, D. A., H. Baker, ve ark. (1985). "A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules." *Polymer Journal* 17(1): 117.
- Tortelli, R., M. Ruggieri, ve ark. (2012). "Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity ve progression." *European journal of neurology* 19(12): 1561-1567.
- Tumani, H., G. Shen, ve ark. (1999). "Glutamine synthetase in cerebrospinal fluid, serum, ve brain: a diagnostic marker for Alzheimer disease?" *Archives of neurology* 56(10): 1241-1246.
- Tuppo, E. E. ve H. R. Arias (2005). "The role of inflammation in Alzheimer's disease." *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(2): 289-305.
- Tyagi, E., T. Fiorelli, ve ark. (2013). "Alpha 1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in the brains of patients with Alzheimer's disease, induces Tau hyperphosphorylation through c-Jun N-terminal kinase activation." *International journal of Alzheimer's disease* 2013.
- Ulman, A. (2013). *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir--Blodgett to Self--Assembly*, Academic press.
- Uno, K. ve S. J. Nicholls (2010). "Biomarkers of inflammation ve oxidative stress in atherosclerosis." *Biomarkers in medicine* 4(3): 361-373.

- van Dijk, K. D., C. E. Teunissen, ve ark. (2010). "Diagnostic cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease: a pathogenetically based approach." *Neurobiology of Disease* 39(3): 229-241.
- Varna, M., H. V. Xuan, ve ark. (2018). "Gold nanoparticles in cardiovascular imaging." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine ve Nanobiotechnology* 10(1).
- Vekrellis, K., M. Xilouri, ve ark. (2011). "Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders." *The Lancet Neurology* 10(11): 1015-1025.
- Wang, L., W. Mao, ve ark. (2008). "Direct electrodeposition of gold nanoparticles onto indium/tin oxide film coated glass ve its application for electrochemical biosensor." *Electrochemistry Communications* 10(4): 673-676.
- Wang, M., K. M. Liechti, ve ark. (2005). "Self-assembled silane monolayers: fabrication with nanoscale uniformity." *Langmuir* 21(5): 1848-1857.
- Wang, S. X., D. Acha, ve ark. (2017). "Detection of the tau protein in human serum by a sensitive four-electrode electrochemical biosensor." *Biosensors ve Bioelectronics* 92: 482-488.
- Wang, X., W. Bao, ve ark. (2013). "Inflammatory markers ve risk of type 2 diabetes: a systematic review ve meta-analysis." *Diabetes care* 36(1): 166-175.
- Wang, Y., J. Deng, ve ark. (2009). "Electrodeposition of large size gold nanoparticles on indium tin oxide glass ve application as refractive index sensor." *Electrochemistry Communications* 11(5): 1034-1037.
- Wang, Y., M. Shi, ve ark. (2012). "Phosphorylated α -synuclein in Parkinson's disease." *Science translational medicine* 4(121): 121ra120-121ra120.
- Wang, Z. ve Z. Dai (2015). "Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview." *Nanoscale* 7(15): 6420-6431.
- Waragai, M., J. Wei, ve ark. (2006). "Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease." *Biochemical ve biophysical research communications* 345(3): 967-972.
- Waters, C. H. (2008). *Diagnosis ve management of Parkinson's disease*, Professional Communications.
- Witucki, G. L. (1993). "A silane primer: chemistry ve applications of alkoxy silanes." *Journal of coatings technology* 65: 57-57.
- Woo, H., P. Reucroft, ve ark. (1993). "Electrodeposition of organofunctional silanes ve its influence on structural adhesive bonding." *Journal of adhesion science ve technology* 7(7): 681-697.
- Wooten, M., S. Karra, ve ark. (2013). "On the direct electron transfer, sensing, ve enzyme activity in the glucose oxidase/carbon nanotubes system." *Analytical chemistry* 86(1): 752-757.

- Wu, Y., W. Le, ve ark. (2011). "Preclinical biomarkers of Parkinson disease." *Archives of neurology* 68(1): 22-30.
- Wurtman, R. (2015). "Biomarkers in the diagnosis ve management of Alzheimer's disease." *Metabolism-Clinical ve Experimental* 64(3): S47-S50.
- Xilouri, M., O. R. Brekk, ve ark. (2013). "Alpha-synuclein ve protein degradation systems: a reciprocal relationship." *Molecular neurobiology* 47(2): 537-551.
- Yagati, A. K., J. Min, ve ark. (2014). "Electrosynthesis of ergo-np nanocomposite films for bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase towards H₂O₂." *Journal of The Electrochemical Society* 161(14): G133-G140.
- Yagati, A. K., J.-C. Pyun, ve ark. (2016). "Label-free ve direct detection of C-reactive protein using reduced graphene oxide-nanoparticle hybrid impedimetric sensor." *Bioelectrochemistry* 107: 37-44.
- Yang, N., X. Chen, ve ark. (2015). "Carbon nanotube based biosensors." *Sensors ve Actuators B: Chemical* 207: 690-715.
- Yarchoan, M., N. Louneva, ve ark. (2013). "Association of plasma C-reactive protein levels with the diagnosis of Alzheimer's disease." *Journal of the neurological sciences* 333(1): 9-12.
- Yogeswaran, U. ve S. M. Chen (2008). "Recent trends in the application of carbon nanotubes-polymer composite modified electrodes for biosensors: a review." *Analytical Letters* 41(2): 210-243.
- Young, A. B. (2009). "Four decades of neurodegenerative disease research: how far we have come!" *Journal of Neuroscience* 29(41): 12722-12728.
- Yu, Y., L. Zhang, ve ark. (2014). "A Method for Evaluating the Level of Soluble β - Amyloid (1-40/1-42) in Alzheimer's Disease Based on the Binding of Gelsolin to β - Amyloid Peptides." *Angewvete Chemie International Edition* 53(47): 12832-12835.
- Zetterberg, H., T. Skillbäck, ve ark. (2016). "Association of cerebrospinal fluid neurofilament light concentration with Alzheimer disease progression." *JAMA neurology* 73(1): 60-67.
- Zetterberg, H., D. Wilson, ve ark. (2013). "Plasma tau levels in Alzheimer's disease." *Alzheimer's research & therapy* 5(2): 9.
- Zhang, F. ve L. Jiang (2015). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." *Neuropsychiatric disease ve treatment* 11: 243.
- Zhang, W., Z. Guo, ve ark. (2017). "Nanomaterial based biosensors for detection of biomarkers of exposure to OP pesticides ve nerve agents: a review." *Electroanalysis*.

- Zhao, M. Q., C. E. Ren, ve ark. (2015). "Flexible MXene/carbon nanotube composite paper with high volumetric capacitance." *Advanced Materials* 27(2): 339-345.
- Zhao, Z., L. Zhu, ve ark. (2015). "Label-free detection of Alzheimer's disease through the ADP3 peptoid recognizing the serum amyloid-beta42 peptide." *Chemical Communications* 51(4): 718-721.
- Zhou, J., M. I. Fonseca, ve ark. (2008). "Complement C3 ve C4 expression in C1q sufficient ve deficient mouse models of Alzheimer's disease." *Journal of neurochemistry* 106(5): 2080-2092.
- Zhou, W., M. Zhu, ve ark. (2006). "The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward α -synuclein." *Journal of molecular biology* 356(4): 1036-1048.
- Zhu, M., Z.-J. Qin, ve ark. (2006). " α -synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles." *Biochemistry* 45(26): 8135-8142.

7. EKLER

Etik Kurul Onay belgesi



T.C
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Girişimsel Olamayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı:2013/107

05/09/2013

Sayın: Doç. Dr. M. Kemal SEZGİNTÜRK

Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olamayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz “**Tümör-İlişkili Otoantikörler İçin Kullan-At Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi**” başlıklı ve 2013/86/07/05 nolu araştırmanız, incelenmiş olup, yürütülmesine etik açıdan herhangi bir sakınca olmadığına oybirliği/oyçokluğu ile karar verilmiştir

NKÜ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
Prof. Dr. Ahmet GÜREL	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Metin DONMA	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Burhan TURGUT	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Cevat AKTAŞ	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Savaş GÜZEL	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Birol TOPÇU	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÇEBER	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hayati GÜNEŞ	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. B. Cüneyt TURAN	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Fatih HOROZOĞLU	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Prof. Dr. Ahmet GÜREL
GOKAEK Başkanı

Namık Kemal Mah. Kampüs Cad. No:1 59030
Telefon: (0 282) 250 59 04 - Faks: (0 282) 250 99 28
Elektronik Ağ: <http://tip.nku.edu.tr>

Ayrıntılı Bilgi için: Engin Deniz RENÇBER
e- posta: edrencber@nku.edu.tr

8. ÖZGEÇMİŞ

Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA, 1987 yılında Ankara'da doğdu. 2008 yılında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 2011 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalından yüksek lisans derecesini aldı. 2011 yılının Kasım ayından beri Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleleri (SCI ENDEKS)

- SONUÇ KARABOĞA M. N., SEZGİNTÜRK M. K., Determination of C-reactive protein by PAMAM decorated ITO based disposable biosensing system: A new immunosensor design from an old molecule, *Talanta*, vol. 186, pp. 162-168, 2018. *(Doktora tezinden çıkan)*
- SONUÇ KARABOĞA M. N., SEZGİNTÜRK M. K., A novel silanization agent based single used biosensing system: Detection of C-reactive protein as a potential Alzheimer's disease blood biomarker, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 154, pp. 227-235, 2018. *(Doktora tezinden çıkan)*
- SONUÇ M. N., SAYIKLI Ş. Ç., SEZGİNTÜRK M. K., AuNPs modified, disposable, ITO based biosensor: Early diagnosis of heat shock protein 70, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 84, pp. 22-29, 2016.
- SONUÇ M. N., SEZGİNTÜRK M. K., A Disposable, Highly Sensitive Biosensing System: Determination of Haptoglobin as a Significant Acute Phase Biomarker, *Current Analytical Chemistry*, vol. 12, pp. 43-53, 2016.
- ÇİĞDEM S. Ş., SONUÇ M. N., SEZGİNTÜRK M. K., A new immobilization procedure for development of an electrochemical immunosensor for parathyroid hormone detection based on gold electrodes modified with 6-mercaptohexanol and silane, *Talanta*, vol. 144, pp. 210-218, 2015.
- SONUÇ M. N., SEZGİNTÜRK M. K., Ultrasensitive electrochemical detection of cancer associated biomarker HER3 based on anti-HER3 biosensor, *Talanta*, vol. 120, pp. 355-361, 2014.