

**ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNİN
ERKEN DÖNEMDE BELİRLENEBİLMESİ
İÇİN TEK KULLANIMLIK BİYOSENSÖR
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Burcu ÖZCAN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal

SEZGİNTÜRK

2018

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ
ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNİN ERKEN DÖNEMDE
BELİRLENEBİLMESİ İÇİN TEK KULLANIMLIK BİYOSENSÖR
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Burcu ÖZCAN

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır

Bu tez TUBİTAK 113Z678 tarafından desteklenmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında Burcu ÖZCAN tarafından hazırlanan “Çocukluk Çağı Obezitesinin Erken Dönemde Belirlenebilmesi için Tek Kullanımlık Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi” 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 : Doç. Dr. Mustafa TEKE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özgür ÖZAY

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNİN ERKEN DÖNEMDE BELİRLENEBİLMESİ İÇİN TEK KULLANIMLIK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Burcu ÖZCAN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Vücutta artmış yağ miktarı olarak tanımlanan obezitenin görülme sıklığı cinsiyet, yaş ve ırka göre farklılık gösterir. Çocukluk çağı obezitesi son yıllarda dünya çapında artış göstermektedir. Obezite, tip 2 diabetes mellitus, non alkolik hepatosteatoz, hipertansiyon, hiperlipidemi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu sebeple bu hastalığın erken teşhisi son derece önem teşkil etmektedir. Bu doktora çalışmasında çocukluk çağı obezitesinin erken teşhisi için potansiyel olabilecek leptin, adiponektin ve nöropeptit Y biyobelirteçleri için kullan-at biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensörlerin tüm immobilizasyon adımları, optimizasyon çalışmaları ve analitik karakterizasyonu elektrokimyasal impedans spektroskopisi, döngüsel voltametri ve kare dalga voltametrisi tekniklerinden yararlanılarak takip edilmiş ve değerlendirilmiştir. Biyosensörlerin immobilizasyon adımlarına ait yüzey morfolojisinin görüntülenmesi için taramalı elektron mikroskopu (SEM) cihazı kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensörlerin klinik alanda kullanımının incelenmesi için gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği test edilmiştir. Biyosensörlerin gerçek serum örneklerinde analit (leptin, adiponektin, nöropeptit Y) tayinine yüksek hassasiyette olanak sağladığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda geliştirilen biyosensör sistemlerinin uzun süre raf ömrü, femtogram ve pikogram düzeyinde analit konsantrasyonlarını tayin edebilme potansiyeli, tekrar üretilebilirlik, yüksek hassasiyet gibi avantajlara da sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Çocukluk çağı obezitesi, biyosensör, elektrokimyasal impedans spektroskopisi

2018, 127 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DEVELOPMENT OF DISPOSABLE BIOSENSOR SYSTEMS FOR EARLY DETECTION OF CHILDHOOD OBESITY

Burcu ÖZCAN

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

The incidence of obesity, which is defined as increased amount of fat in the body, differs according to gender, age and race. Childhood obesity has been increasing worldwide in recent years. Obesity causes serious complications such as type 2 diabetes mellitus, non alcoholic hepatosteatosis, hypertension, hyperlipidemia and cardiovascular diseases. For this reason, early diagnosis of this disease is extremely important. In this PhD study, disposable biosensors have been developed for leptin, adiponectin and neuropeptide Y which are potential biomarkers for early detection of childhood obesity. All immobilization steps of biosensors, optimization studies and analytical characterization were followed and evaluated by electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry and square wave voltammetry techniques. A scanning electron microscope (SEM) was used for monitoring the surface morphology of the immobilization steps of the biosensors. The applicability of the designed biosensors to real serum samples was tested to investigate the potential of them in clinical use. It has been observed that biosensors sensitively allow the determination of analytes (leptin, adiponectin, neuropeptide Y) in real serum samples. At the same time, it has been found that the developed biosensor systems have advantages such as long shelf life, reproducibility, high sensitivity, potential to determine analyte concentrations at femtogram and picogram level.

Keywords: Childhood obesity, biosensor, electrochemical impedance spectroscopy

2018, 127 pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	ix
ŞEKİL DİZİNİ	xi
KISALTMALAR	xiii
TEŞEKKÜR	xiv
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Çocukluk Çağı Obezitesinin Değerlendirilmesi	3
2.1.1. Obezite görülme sıklığı	4
2.1.2. Obezitede etkili moleküller	4
2.2. Çocukluk Çağı Obezitesinin Erken Teşhisi için Potansiyel Biyobelirteçler: Leptin, Adiponektin, Nöropeptit Y	6
2.2.1. Leptin.....	6
2.2.1.1. Leptin ve obezite ilişkisi.....	8
2.2.2. Adiponektin	8
2.2.3. Nöropeptit Y	9
2.3. Erken Teşhiste Biyosensörler ve Avantajları	10
2.4. Biyosensör Sistemleri için Yenilikçi Materyaller ve Yöntemler	11
2.5. Kaynak Araştırması	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Biyosensörlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Materyaller	15
3.2. Kullanılan Cihazlar	16
3.3. Leptin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri	17

3.3.1. Leptin tayini için GP/glutamik asit/anti-leptin temelli biyosensörün immobilizasyon adımları.....	17
3.3.2. Leptin biyosensörü için elektrokimyasal ölçümler.....	18
3.3.3. Anti-leptin temelli biyosensörün optimizasyon aşamaları	19
3.3.3.1. Glutamik asit konsantrasyonu optimizasyonu.....	19
3.3.3.2. Anti-leptin konsantrasyon optimizasyonu	19
3.3.3.3. Anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonu	19
3.3.3.4. Leptin inkübasyon süresi optimizasyonu	19
3.3.4. Leptin biyosensörünün analitik çalışmaları.....	20
3.3.4.1. Geliştirilen leptin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi	20
3.3.4.2. Leptin biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	20
3.3.4.3. Leptin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları	21
3.3.4.4. Leptin biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi	21
3.3.4.5. Leptin biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları	21
3.3.4.6. Kare dalga voltametri (KDV)	21
3.3.4.7. Leptin biyosensörünün depo ömrü	21
3.3.4.8. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile leptin biyosensörünün yüzey morfolojisinin incelenmesi.....	22
3.3.4.9. Leptin biyosensörünün Kramers-Kronig dönüşüm karakterizasyonu.....	22
3.3.4.10. Leptin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	22
3.3.4.11. Leptin biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği	22
3.4. Adiponektin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri	23
3.4.1. Anti-adiponektin temelli biyosensör geliştirilmesi.....	23
3.4.2. Adiponektin biyosensörü için elektrokimyasal ölçümler	24
3.4.3. Anti-adiponektin temelli biyosensörün optimizasyon çalışmaları	25
3.4.3.1. Anti –adiponektin konsantrasyon optimizasyonu.....	25
3.4.3.2. Anti-adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonu.....	25
3.4.3.3. Adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonu	25

3.4.4. Adiponektin biyosensörünün analitik çalışmaları	25
3.4.4.1. Geliştirilen adiponektin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi.....	25
3.4.4.2. Adiponektin biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	26
3.4.4.3. Adiponektin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	26
3.4.4.4. Adiponektin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümleri.....	26
3.4.4.5. Adiponektin biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları.....	26
3.4.4.6. Kare dalga voltametri.....	26
3.4.4.7. Adiponektin biyosensörünün depo ömrü.....	27
3.4.4.8. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile adiponektin biyosensörünün yüzey morfolojisinin incelenmesi	27
3.4.4.9. Adiponektin biyosensörünün Kramers- Kronig dönüşüm karakterizasyonu	27
3.4.4.10. Adiponektin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....	27
3.4.4.11. Adiponektin biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği	27
3.5. Nöropeptit Y Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri	27
3.5.1. Anti-Nöropeptit Y temelli biyosensör geliştirilmesi	27
3.5.2. Nöropeptit Y biyosensörü için elektrokimyasal ölçümler.....	29
3.5.3. Anti- nöropeptit Y temelli biyosensörün optimizasyon çalışmaları.....	29
3.5.3.1. rGO miktar optimizasyonu	29
3.5.3.2. Anti-nöropeptit Y konsantrasyon optimizasyonu.....	29
3.5.3.3. Anti-nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonu	29
3.5.3.4. Nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonu.....	29
3.5.4. Nöropeptit Y biyosensörünün analitik çalışmaları	30
3.5.4.1. Geliştirilen nöropeptit Y biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi	30
3.5.4.2. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	30
3.5.4.3. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	30
3.5.4.4. Nöropeptit Y biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi	30
3.5.4.5. Nöropeptit Y biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları.....	30

3.5.4.6. Nöropeptit Y biyosensörünün depo ömrü	31
3.5.4.7. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile nöropeptit Y biyosensörünün yüzey morfolojisinin incelenmesi	31
3.5.4.8. Nöropeptit Y biyosensörünün Kramers Kronig dönüşüm karakterizasyonu.....	31
3.5.4.9. Nöropeptit Y biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....	31
3.5.4.10. Nöropeptit Y biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	32
4.1. Leptin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri	32
4.1.1. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımları	32
4.1.2. Leptin biyosensörünün optimizasyon çalışmaları	36
4.1.2.1. Glutamik asit konsantrasyonu optimizasyonu	36
4.1.2.2. Anti-leptin konsantrasyon optimizasyonu	37
4.1.2.3. Anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonu	39
4.1.2.4. Leptin inkübasyon süresi optimizasyonu	40
4.1.3. Leptin biyosensörünün analitik çalışmaları	42
4.1.3.1. Leptin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi	42
4.1.3.2. Leptin biyosensörünün tekrarlanabilirliği	44
4.1.3.3. Leptin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	44
4.1.3.4. Leptin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü tekniği ile analizi	46
4.1.3.5. Anti-leptin temelli biyosensörün rejenerasyon çalışmaları	47
4.1.3.6. Kare dalga voltametri (KDV)	48
4.1.3.7. Leptin biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi	49
4.1.3.8. SEM cihazı ile leptin biyosensörünün yüzey morfolojisinin görüntülenmesi.....	50
4.1.3.9. Leptin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü.....	52
4.1.3.10. Laviron eşitliği ile leptin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	53
4.1.3.11. Anti-leptin temelli biyosensörün gerçek serum örneklerine uygulanması	54
4.1.3.12. Leptin biyosensörünün literatürdeki yeri.....	55

4.2. Adiponektin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri	57
4.2.1. Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımları.....	57
4.2.2. Adiponektin biyosensörünün optimizasyon çalışmaları.....	59
4.2.2.1. Anti-adiponektin konsantrasyon optimizasyonu	59
4.2.2.2. Anti-adiponektin süre optimizasyonu.....	61
4.2.2.3. Adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonu.....	62
4.2.3. Adiponektin biyosensörünün analitik çalışmaları	64
4.2.3.1. Adiponektin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi.....	64
4.2.3.2. Adiponektin biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	66
4.2.3.3. Adiponektin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	66
4.2.3.4. Adiponektin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü tekniği ile analizi	68
4.2.3.5. Anti-adiponektin temelli biyosensörün rejenerasyon çalışmaları	69
4.2.3.6. Kare dalga voltametri.....	70
4.2.3.7. Adiponektin biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi	71
4.2.3.8. SEM cihazı ile adiponektin biyosensörünün yüzey morfolojisinin görüntülenmesi ...	72
4.2.3.9. Adiponektin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü	73
4.2.3.10. Laviron eşitliği ile adiponektin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....	74
4.2.3.11. Anti-adiponektin temelli biyosensörün gerçek serum örneklerine uygulanması	75
4.2.3.12. Adiponektin biyosensörünün literatürdeki yeri	76
4.3. Nöropeptit Y Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri	78
4.3.1. Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımları.....	78
4.3.2. Nöropeptit Y biyosensörünün optimizasyon çalışmaları.....	81
4.3.2.1. Grafen oksit miktar optimizasyonu	81
4.3.2.2. Anti nöropeptit Y konsantrasyonu optimizasyonu	82
4.3.2.3. Anti nöropeptit Y süre optimizasyonu	84
4.3.2.4. Nöropeptit Y süre optimizasyonu.....	85

4.3.3. Nöropeptit Y biyosensörünün analitik çalışmaları	86
4.3.3.1. Nöropeptit Y biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi	86
4.3.3.2. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	89
4.3.3.3. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	89
4.3.3.4. Nöropeptit Y biyosensörünün sabit frekansta impedans tekniği ile analizi	90
4.3.3.5. Anti-nöropeptit Y temelli biyosensörün rejenerasyon çalışmaları	92
4.3.3.6. Nöropeptit Y biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi	92
4.3.3.7. SEM cihazı ile nöropeptit Y biyosensörünün yüzey morfolojisinin görüntülenmesi .	93
4.3.3.8. Nöropeptit Y biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü	94
4.3.3.9. Laviron eşitliği ile nöropeptit Y biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	95
4.3.3.10. Anti-nöropeptit Y temelli biyosensörün gerçek serum örneklerine uygulanması	96
5. SONUÇ	98
6. KAYNAKLAR.....	100
EKLER	107
ÖZGEÇMİŞ	108

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2. 1. VKİ değerlerine göre obezite sınıflandırması.....	4
Çizelge 2. 2. Biyosensör sistemleri ile klasik tayin yöntemlerinin kıyaslanması.....	10
Çizelge 4. 1. PGA konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri.....	37
Çizelge 4. 2. Anti-leptin konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri.....	39
Çizelge 4. 3. Anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	40
Çizelge 4. 4. Leptin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	41
Çizelge 4. 5. Artan leptin konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, R_s ve kapasitanstaki değişimler	44
Çizelge 4. 6. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 , leri ve denklemleri.....	45
Çizelge 4. 7. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri.....	53
Çizelge 4. 8. Geliştirilen leptin biyosensörü ile serum örneklerinde bulunan leptin konsantrasyonunun belirlenmesi	54
Çizelge 4. 9. Literatürde bildirilen çeşitli yöntemlerin geliştirilen leptin biyosensörüyle kıyaslanması	56
Çizelge 4. 10. Anti-adiponektin konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	61
Çizelge 4. 11. Anti-adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	62
Çizelge 4. 12. Adiponektinin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	63
Çizelge 4. 13. Artan adiponektin konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, R_s ve kapasitanstaki değişimler	66
Çizelge 4. 14. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 , leri ve denklemleri.....	67
Çizelge 4. 15. Adiponektin biyosensörü hazırlanma aşamalarına ilişkin Kramers-Kronig dönüşümleri.....	74

Çizelge 4. 16. Geliştirilen adiponektin biyosensörü ile serum örneklerinde bulunan adiponektin konsantrasyonunun belirlenmesi	75
Çizelge 4. 17. Literatürde bildirilen çeşitli adiponektin biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması	77
Çizelge 4. 18. rGO miktarı optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	82
Çizelge 4. 19. Anti-nöropeptit Y konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	83
Çizelge 4. 20. Anti-nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	85
Çizelge 4. 21. Nöropeptit Y'nin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri	86
Çizelge 4. 22. Artan nöropeptit Y konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, R_s ve kapasitanstaki değişimler	87
Çizelge 4. 23. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 değerleri ve denklemleri.....	90
Çizelge 4. 24. Nöropeptit Y biyosensörü immobilizasyon aşamalarına ilişkin Kramers-Kronig dönüşümleri.....	95
Çizelge 4. 25. Geliştirilen nöropeptit Y biyosensörü ile serum örneklerinde bulunan nöropeptit Y konsantrasyonunun belirlenmesi.....	97

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1. İştah üzerine etkili hormonların nöronlardan nöropeptit salgısını uyarma/inhibe etme mekanizması	5
Şekil 2. 2. Leptinin 4'lü sarmal yapısı.....	7
Şekil 3. 1. Anti-adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi.....	18
Şekil 3. 2. Biyosensör sisteminde kullanılan elektriksel eşdeğer devre modeli.....	20
Şekil 3. 3. Anti-adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi	24
Şekil 3. 4. Anti-nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi	28
Şekil 4. 1. GP elektrot yüzeyinde glutamik asitin elektropolimerizasyon mekanizması.....	32
Şekil 4. 2. GP elektrot yüzeyinde glutamik asidin elektropolimerizasyonuna ait CV voltamogramlar.....	33
Şekil 4. 3. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait (A) EIS eğrileri ve (B) Ret değerleri (C) CV voltamogramları.....	34
Şekil 4. 4. Glutamik asit konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi.....	37
Şekil 4. 5. Anti-leptin konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi.....	38
Şekil 4. 6. Anti-leptin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi	39
Şekil 4. 7. Leptin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi	41
Şekil 4. 8. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün artan leptin konsantrasyonlarına verdiği yanıt (A) EIS spektrumları (B) CV voltamogramları (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği	43
Şekil 4. 9. Leptin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği (n=8).....	45
Şekil 4. 10. Leptin biyosensörünün Bode grafiği	46
Şekil 4. 11. Leptin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü.....	47
Şekil 4. 12. Leptin biyosensörüne ait rejenerasyon çalışmaları	48
Şekil 4. 13. (A) Leptin biyosensörünün artan leptin konsantrasyonlarına KDV ile verdiği yanıt (B) elde edilen kalibrasyon grafiği	49
Şekil 4. 14. Leptin biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi	50
Şekil 4. 15. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri	51
Şekil 4. 16. Leptin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü	52
Şekil 4. 17. Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait (A) EIS eğrileri, (B) Ret değerleri ve (C) CV voltamogramları	59

Şekil 4. 18. Anti-adiponektin konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi	60
Şekil 4. 19. Anti-adiponektin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi	61
Şekil 4. 20. Adiponektin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi.....	63
Şekil 4. 21. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün artan adiponektin konsantrasyonlarına verdiği yanıt (A) EIS eğrileri, (B) CV voltamogramları, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği	65
Şekil 4. 22. Adiponektin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği (n=8)	67
Şekil 4. 23. Adiponektin biyosensörünün bode eğrileri	68
Şekil 4. 24. Adiponektin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü	69
Şekil 4. 25. Adiponektin biyosensörüne ait rejenerasyon çalışmaları	70
Şekil 4. 26. (A) Adiponektin biyosensörünün artan adiponektin konsantrasyonlarına KDV ile verdiği yanıt ve (B) elde edilen kalibrasyon grafiği	71
Şekil 4. 27. Adiponektin biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi.....	72
Şekil 4. 28. Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri...	73
Şekil 4. 29. Adiponektin biyosensörünün Kramers Kronig Dönüşümü	74
Şekil 4. 30. Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait (A) EIS eğrileri, (B) Ret değerleri ve (C) CV voltamogramları	80
Şekil 4. 31. rGO miktarının biyosensör yanıtı üzerine etkisi	81
Şekil 4. 32. Anti-nöropeptit Y konsantrasyonunun biyosensör yanıtı üzerine etkisi	83
Şekil 4. 33. Anti-nöropeptit Y inkübasyon süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi	84
Şekil 4. 34. Nöropeptit Y inkübasyon süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.....	85
Şekil 4. 35. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün artan nöropeptit Y konsantrasyonlarına verdiği yanıt (A) EIS spektrumları (B) CV voltamogramları (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği	88
Şekil 4. 36. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliği (n=8).....	89
Şekil 4. 37. Nöropeptit Y biyosensörünün bode eğrileri	91
Şekil 4. 38. Nöropeptit Y biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü.....	91
Şekil 4. 39. Nöropeptit Y biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları	92
Şekil 4. 40. Nöropeptit Y biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi	93
Şekil 4. 41. Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri..	94
Şekil 4. 42. Nöropeptit Y biyosensörünün Kramer Kronig dönüşümü	95

KISALTMALAR

GP	: Grafit kağıt
KCl	: Potasyum diklorür
AgCl	: Gümüş klorür
EDC	:N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid
NHS	: N-hidroksisüksinimid
$K_2CR_2O_7$: Potasyum dikromat
HNO_3	: Nitrik asit
HCl	: Hidroklorik asit
BSA	: Sığır serum albümini
DMF	: Dimetilformamid
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
CV	: Döngüsel voltametri
KDV	: Kare dalga voltametri
PGA	: Poli-glutamik asit
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
Ret	: Yük transfer direnci
rGO	: İndirgenmiş grafen oksit
R^2	: belirleme katsayısı
LOD	: Algılama sınırı
LOQ	: Kantitatif ölçme sınırı
F	: Farad
RSD	: Bağlı standart sapma değeri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
BIA	: Biyoelektriksel impedans

TEŞEKKÜR

Her daim ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Hayatım boyunca her zorlu dönemde ve her mutlu anımda benimle aynı hisleri paylaşan, bu zorlu yolculuğumda en büyük emeğe sahip, maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini gördüğüm babam Ahmet ÖZCAN ve annem Aysel ÖZCAN'a,

Sonuna geldiğim bu süreçte benden deneyimlerini paylaşmayı ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, zorlandığım her an elini omzumda hissettiğim sevgili Dr. Öğr. Üyesi Pınar SEZGİNTÜRK'e,

Yalnızca akademik hayatta değil her zaman varlığıyla ve dostluğuyla bana iyi ki dedirten canım dostum Burçak DEMİRBAKAN'a,

Her sıkıntıda bana destek olup her mutluluğumu benimle paylaşan, hayatımda her zaman özel bir yeri olan dostum Cansu ŞANDA'ya,

Doktora çalışmalarım sırasında benden hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, samimiyetini ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşım Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA'ya,

Bu süreçte her ihtiyaç duyduğumda yardımına koşan, manevi destekleriyle beni motive eden sevgili arkadaşlarım Nur TARIMERİ ve Mert AKGÜN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Temmuz, 2018

Burcu ÖZCAN

1.GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından ‘vücutta sağlığı olumsuz etkileyecek biçimde anormal veya aşırı yağ birikmesi’ olarak tanımlanan obezite tüm dünyada hızlı bir şekilde artarak yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biri durumuna gelmiştir. Erişkinlerde çok sık rastlanan obezitenin çocuk ve adolesanları da etkileyerek yayılması endişe verici hal almıştır (**Meier ve Gressner 2004**).

Amerika Birleşik Devletlerinde Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması (NHANES) sonuçlarına göre 2-19 yaş arasındaki çocuk ve adolesanlardaki obezite oranı % 16.9 (12.5 milyon), yenidoğan ve okul öncesi çocuklarda % 8.1 olarak belirlenmiştir. Ülkemiz için de çocukluk çağı obezitesi önemli bir sağlık sorunudur. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA) sonuçlarına göre 0-5 yaş grubu çocuklarda aşırı kilo oranı % 17.9, obezite oranı % 8.5; 6- 18 yaş grubu çocuklarda ise aşırı kilo oranı % 14.3, obezite oranı % 8.2 olarak belirlenmiştir. Çocukluk çağında görülen bu hızlı artış birçok psikolojik ve fizyolojik sorunlara yol açmaktadır. Aynı zamanda obez bireylerin hipertansiyon, solunum sistemi rahatsızlıkları, tip II diyabet gibi hastalıklara yakalanma yatkınlıkları daha fazladır. Ayrıca obezite güven kaybı, depresyon ve sosyal ortamlardan uzaklaşma gibi psiko-sosyal sorunlara da neden olabilmektedir. Obez çocuk ve adolesanların yetişkinlikte de obez olma olasılıkları daha yüksektir. Obez çocukların 1/3'ü, obez adolesanların ise % 80'i erişkin yaşa ulaştıklarında obez kalmaktadırlar. Bu olumsuz nedenlerden dolayı çocukluk çağı obezitesinin önlenmesi, erken dönemde tanınması ve tedavisi çocukluk ve erişkin dönemde obeziteye bağlı ortaya çıkabilecek komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir (**Weiss ve ark. 2004**).

Biyosensörler, kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda biyolojik moleküllerin son derece yüksek hassasiyetteki yanıt verme kapasitelerinin keşfedilmesi, biyosensör sistemlerinin ilgi odağı haline gelmesine sebep olmuştur. Bunların yanısıra biyosensörlerin kolay üretilmesi, hızlı ve pratik olması, minyatürleşmeye uygun oluşu gibi avantajları da mevcuttur (**Marin ve Merkoci 2012**).

Yaşam şartlarını olumsuz anlamda etkileyen obeziteyle ilişkili potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi ve analiz edilebilmesi hastalığın erken tanısı için oldukça

faydalı olacaktır. Biyobelirteçler, önemi giderek artan, klinik hastalıkların teşhisi, tedavi cevabının izlenmesi ve prognozun belirlenmesinde kullanılabilen parametrelerdir.

Tüm bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu doktora tezinin amacı, çocukluk döneminde ortaya çıkan obezitenin tayini için uygun modifikasyon yöntemleri kullanılarak biyosensör sistemlerinin geliştirilmesidir. Geliştirilen bu biyosensör sistemleriyle obezite için potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilen leptin, adiponektin ve nöropeptit Y'nin analizi hedeflenmiştir. Elektrokimyasal temelli geliştirilen bu biyosensörlerin gerçek serum örneklerinde denenmesiyle, klinik alanda kullanım potansiyelleri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Çocukluk Çağı Obezitesinin Değerlendirilmesi

Obezite, vücutta depolanan yağ miktarının fazla olması şeklinde tanımlanabilir. Yetişkinlerde ve çocuklarda sıklıkla görülen metabolik bir hastalıktır. Obezite oluşumunun sebepleri fazla ve dengesiz kalori alımı, genetik faktörler, endokrin yıkıcılar olarak bilinen çevresel faktörler ve hormonal faktörler olarak sıralanabilir (**Munyaka ve ark. 2014**). Obezite beraberinde getirdiği sorunlar nedeniyle tek bir hastalık olarak kabul edilmemelidir. Çocukluk çağında meydana gelen obezite insülin direncine sebep olabilmekte ve bu durum erken yaşlarda tip 2 diyabetin görülmesiyle sonuçlanabilmektedir. Aynı zamanda çocuk ve adölesanlarda hipertansiyona eşlik eden hiperlipidemi ile beraber metabolik sendroma yol açarak yetişkin çağda kardiyovasküler olaylara zemin hazırlamaktadır (**Weiss ve ark. 2004**).

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre 43 milyon okul öncesi çocuk obez veya fazla kiloludur ve 1990 yılı ile kıyaslandığında ise %4,2'lik artış görülmektedir (**de Onis ve ark. 2012**).

Gelişen teknoloji çağı ile çocuk ve adölesanlarda fiziksel aktivite fazlasıyla kısıtlanmıştır. Aynı zamanda yanlış beslenme alışkanlıklarından dolayı vücutta kalori dengesizliği oluşmaktadır (**Bağrıaçık 2009**).

Obezitenin fenotipik olarak kendini belli etmesinin yanısıra vücuttaki yağ miktarını objektif olarak ölçen birçok yöntem mevcuttur. Klinik olarak obezitenin tanımlanmasında kullanılan parametre vücut kitle indeksi (VKİ) dir. VKİ, kilonun boyun karesine oranıdır (kg/m^2) (**Cole ve ark. 1995**). Çocuklarda yetişkinlerden farklı olarak yaşa ve cinsiyete göre değişiklik göstermesi nedeniyle VKİ persantilleri vardır. Çizelge 2.1' de VKİ değerlerine göre obezite sınıflandırılması gösterilmektedir.

Diğer bir kolay yöntem de boya göre ağırlık ölçümüdür. Boya göre ağırlığın $> \%120$ olması obeziteyi işaret etmektedir. Bunların yanısıra, ultrasonografî, nötron aktivasyon analizi, total vücut suyu hesaplanması, manyetik rezonans görüntüleme yöntemi, biyoelektriksel impedans (BIA), total vücut geçirgenliği gibi tekniklerle de vücuttaki yağ oranı hesaplanabilmektedir (**Must ve ark. 1991**). Ancak bu tekniklerin hem çocuklarda uygulaması çok zordur hem de pahalı tekniklerdir (**Ellis ve ark. 1994**).

Çizelge 2. 1. VKİ değerlerine göre obezite sınıflandırması (Silva Magalhães ve ark. 2014)

VKİ	Sınıflama
<18,5	Zayıf
18,5-24,9	Normal
25,0-29,9	Fazla kilolu
30,0-34,9	Obezite sınıf 1
35,0-39,9	Obezite sınıf 2
>40	Obezite sınıf 3
40-49,9	Morbid obezite

2.1.1. Obezite görülme sıklığı

Obezite sıklığı cinsiyet, yaş ve ırka göre değişkenlik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde çocuk ve adölesanlarda oldukça yüksek oranlarda obezite görülmektedir. Aşırı kilolu adölesan çocuklar %21-24 arası değişirken, obez çocuk ve adölesanlar %16-18 arasındadır. ABD'de 1988-1994 yılları arasında yapılan beslenme ve sağlık taramasında 6 ile 11 yaş arasındaki çocukların %13,7'sinde, 12 ile 17 yaş arası çocukların ise %11,5'inde vücut kitle indeksi >95 persentil olarak tespit edilmiştir 2003- 2006 yılları arasında yapılan beslenme ve sağlık taramasında ise çocuk ve adölesanların %16,3'ü obez olarak tespit edilmiştir (Ogden ve ark. 2007).

Dünya sağlık örgütü verilerine göre Türkiye' de çocuklarda obezite prevalansı %16,1'dir. Bu prevalans, erkeklerde %15,6, kızlarda %23,9 olarak bulunmuştur.

2.1.2. Obezitede etkili moleküller

Obezitenin başlıca nedeni, alınan enerji ile harcanan enerjinin dengesizliğidir. Alınan enerji ile harcanan enerji arasındaki bu farklılığın altında yatan sebepler biyokimyasal, çevresel, nörolojik ve psikolojik faktörlerdir.

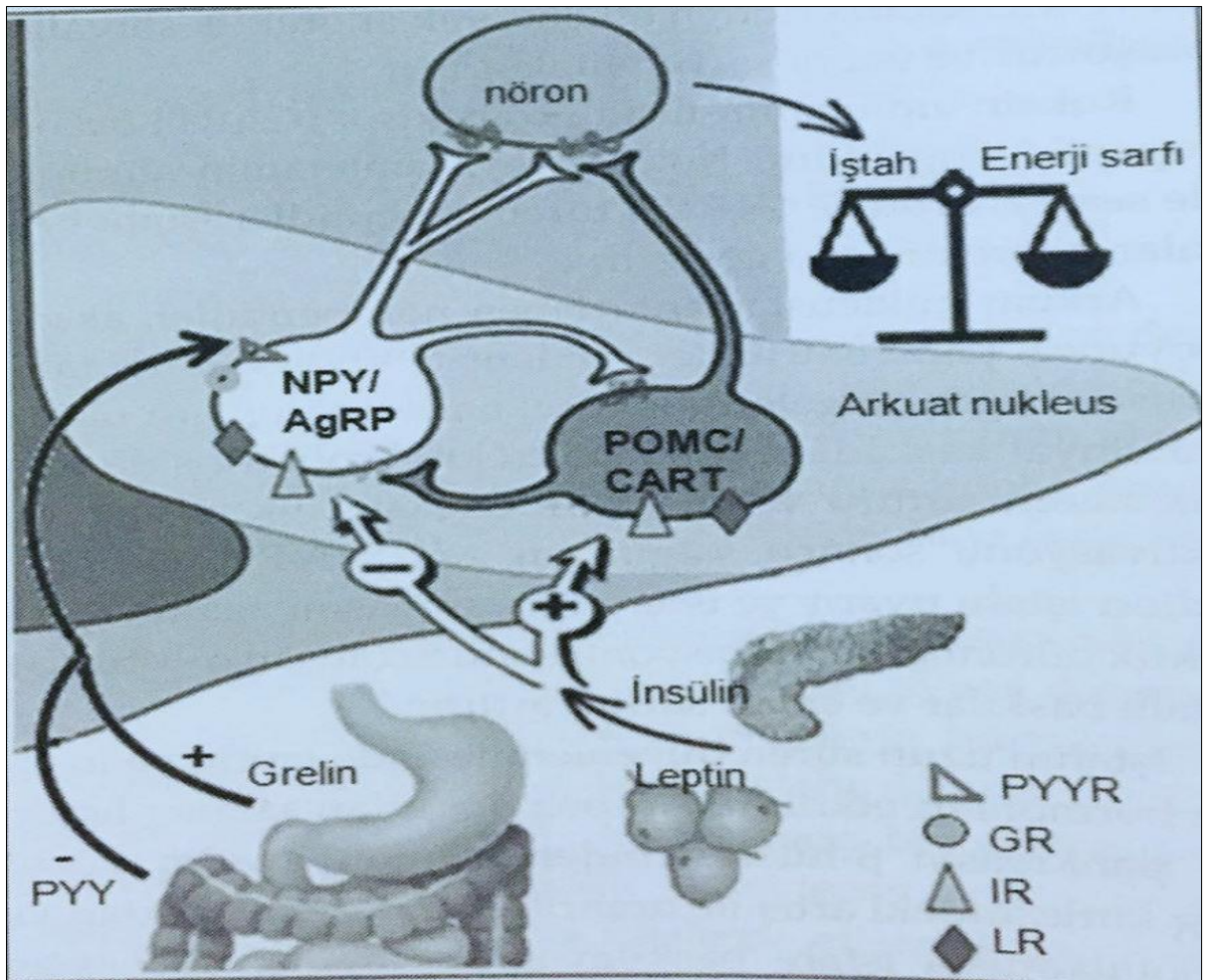
Alınan ve harcanan enerji dengesi çeşitli biyomolekül tarafından regüle edilir. İştah, enerji sarfı ve vücut ağırlığının dengesinde bazı hormonlar (insülin, leptin, nöropeptit Y, grelin, kolesistokinin) işlev görmektedir. Bu hormonlar açlık ve tokluğu kontrol eder, yeme sıklığını belirler.

İnsülin ve leptin hormonları iştahın uzun süreli regülasyonunda etkilidir. Adipoz dokudan salınan leptinin ve pankreasta β -hücrelerinden salınan insülinin yağ kütlesinde artış

ile paralel olarak hipotalamusta iştahı baskılamak üzere sentezi artmaktadır. Anoreksigenik nöronların uyarılmasıyla tokluk hissi oluşur. Ancak leptin direnci veya eksikliği ile beraber sinyalleşmede oluşan bozukluk sonucunda açlık duygusu daha çok artar.

İştahın kısa süreli kontrolünde ise sorumlu hormonlar grelin, PYY(peptit tirozin tirozin), kolesistokinin ve nöropeptit Y dir. Bu hormonlar iştahı baskılamaktadır (**Bekpınar 2015**).

Şekil 2.1’de iştah üzerine etkili hormonların arkuat nukleusta anorektik/oreksigenik nöronlardan nöropeptitlerin salgısını uyarma/inhibe etme mekanizması görülmektedir.



Şekil 2. 1. İştah üzerine etkili hormonların nöronlardan nöropeptit salgısını uyarma/inhibe etme mekanizması (PYYR: Peptid YY reseptörü, GR: Grelins reseptörü, IR: İnsülin reseptörü, LR: Leptin reseptörü) (**Bekpınar 2015**)

Son yıllarda yapılan araştırmalar, obezitenin oluşmasında bu peptitlerin ve reseptörlerinin sentezindeki genetik farklılıkların etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

2.2. Çocukluk Çağı Obezitesinin Erken Teşisi için Potansiyel Biyobelirteçler: Leptin, Adiponektin, Nöropeptit Y

Çocukluk çağı obezitesinin sebep olduğu tüm hastalıkların önüne geçebilmek, günlük yaşamı etkileyen tüm etkilerinin ortadan kaldırılması için erken teşhis edilmesi büyük önem arz etmektedir.

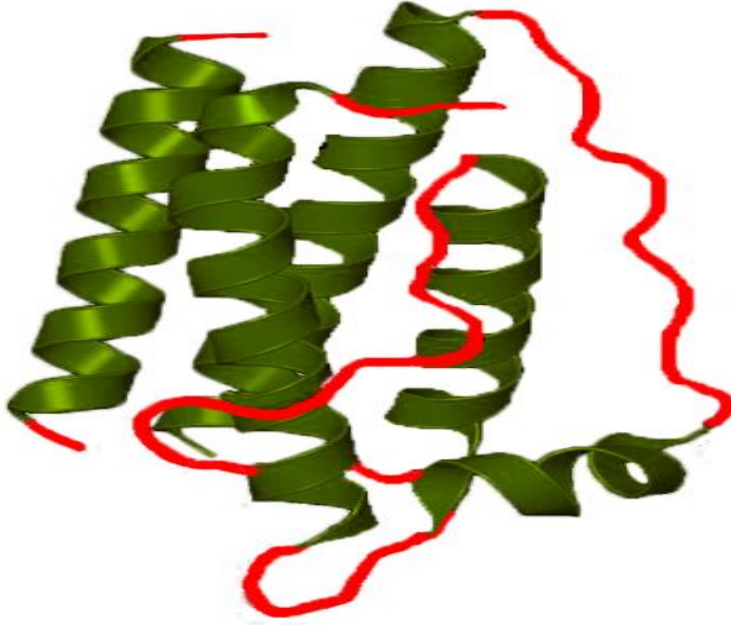
Biyobelirteçler, objektif olarak ölçülmekte ve terapötik müdahale için normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Biyobelirteçler, hastalıkların tespiti ve sağlık durumunun izlenmesi için birçok fonksiyona sahiptir. Bu uygulamalar aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Bir hastalığı veya anormal durumu olan hastaların tanımlanması için bir teşhis aracı olarak kullanılabilir (örneğin, yüksek kan şekeri konsantrasyonu için diyabet mellitus tanısı)
- ✓ Hastalığın evrelendirilmesi için bir araç olarak kullanılabilir (örneğin; çeşitli kanserler için karsinoembriyonik antijen-125 ölçümleri)
- ✓ Bir müdahaleye klinik yanıtın öngörülmesi ve izlenmesi için kullanılabilir (örneğin; kalp hastalığı riskinin saptanması için kan kolesterol konsantrasyonları) (Atkinson 2001).

2.2.1. Leptin

Leptin (latince leptoz) adipoz dokuda sentezlenen ve plazmaya salınan ob gen ürünüdür. İnsanda enerji harcanmasının homeostazisinde ve üremede önemli bir rol oynar. Beslenme davranışını belirlemek için önemli olduğu bilinen hipotalamustaki reseptör ile etkileşerek hareket eder (Zhang ve ark. 1994; Caro ve ark. 1996).

Leptin yapısı sitokinlere benzemektedir. NMR (nükleer manyetik rezonans) ile görüntüleme leptinin 4'lü sarmal bir yapıya sahip olduğunu gösterir (Şekil 2.2). Leptin, iki uzun çapraz bağla bağlanmış dört antiparalel heliks ve sola dönüşlü helikste yer alan kısa bir ilmek (loop) içermektedir. Buna ek olarak leptin tek bir disülfid bağına sahiptir ve bu disülfid bağı leptinin fonksiyonu için büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2. 2. Leptinin 4'lü sarmal yapısı (Wang ve ark. 2010)

Laboratuar hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda, serum leptin seviyesinin hayvanın genel yağlanma düzeyini ve obezitede yükselip, gıda eksikliği gibi akut manipülasyonlarda azalan enerji denge durumunu yansıttığı belirtilmiştir (**Trayhurn ve ark. 1999**). İnsanlarda serum leptin düzeyleri de genellikle VKİ gibi obezite indeksleri ile pozitif korelasyon gösterir ve böylece biriken adipoz doku depolarının büyüklüğünü yansıtır (Considine 1996).

Leptin kanda proteine bağlı veya serbest halde mevcuttur ve aktivitesi serbest formu sayesinde. Obezlerde serum leptininin büyük kısmı serbest formdadır (**Brabant ve ark. 2000; Meier ve ark. 2004**).

Tokluk hissinin ve vücut ağırlığının kontrol edilmesindeki önemli rolü nedeniyle, leptinin keşfedilmesi obeziteyi tedavi etmek için potansiyel kullanımında büyük ilgi oluşturmuştur. Leptin geninin homozigot mutasyonuna bağlı konjenital leptin eksikliği, insanlarda oldukça nadirdir. Bu eksiklik esas olarak hiperfaji, hiperinsülinemi ve tip II diyabet nedeniyle erken başlangıçlı morbid obezite ile sonuçlanır (**Farooqi ve ark. 2002**).

2.2.1.1. Leptin ve obezite ilişkisi

Leptinin hem beyin hem de periferik dokularda yerleşik reseptörlere sahip olduğu ve bu reseptörlere aracılığıyla beslenme, termogenez, immun sistem, üreme, kemik dansitesi, beyin gelişimi, hemodinami, solunum, sempatik sinir aktivitesi ve karaciğerde insülin-ilişkili fonksiyonların düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmiştir (**Himms-Hagen 1999**). Bu fonksiyonlarının büyük bir kısmı, merkezi sinir sistemi aracılığıyla gerçekleştirilir. Leptinin merkezi sinir sisteminde ki (MSS) etkileri çok daha yaygındır. Leptin eksikliğinde beyin ağırlılığında azalma, nöronlarda da yapısal bozuklukların ortaya çıktığı belirlenmiştir.

İnsanda, nicelik olarak değil ama işlevsel olarak leptin eksikliğinin görüldüğu temel durum obezitedir; zira obezitede, artmış serum leptin düzeyleri sonucu santral ve periferik leptin direnci gelişmektedir. Leptinin kendisine karşı oluşan direnç obezlerde işlev görememesine bir sebeptir . Direnç sendromunda önemli olan efektör düzeyidir (**Nem ve ark. 2001**). Leptine direnci yenmek için daha yüksek leptin düzeyi gerekir, bunun için yağ dokudan daha çok leptin salınır, daha çok leptin salınımı kendisini üreten yağ dokunun artışına yol açar. Leptin hormonu etkisini gösterebilmesi için kan-beyin bariyerini geçmek zorundadır ve bu geçiş satüre olabilen taşıyıcılara bağlı olduğundan taşıyıcı fonksiyonlarındaki herhangi bir bozukluk da leptine dirence yol açabilmektedir. (**Golden ve ark 1997**).

2.2.2. Adiponektin

Beyaz adipoz dokuda eksprese edilen adiponektin (APN), glikoz ve lipit metabolizmasında rol oynayan bir anti inflamatuvar adipositozindir. Yapısında 244 aminoasit içermektedir (**Thanakun ve ark. 2014**).

APN konsantrasyonu yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol düzeyleri ile pozitif; karaciğer yağ içeriği, obezite veya vücut kitle indeksi (BMI) ile birlikte glukoz ve insülin konsantrasyonları ile negatif korelasyon gösterir. Diyabetik hastalarda düşük APN seviyeleri gözlenmektedir. Tüm bu ilişkiler, APN' yi metabolik sendrom için olası bir biyobelirteç olarak düşündürmüştür (**Brooks ve ark. 2006**).

Adiponektinin in vitro olarak endotele monosit adezyonunu inhibe etmek ve makrofajların köpük hücrelerine dönüşümünü engellemek gibi antiaterojenik etkileri mevcuttur. Ayrıca aterosklerotik kalp hastalığı olan olguların adiponektin seviyelerinin normal popülasyondan düşük olduğu saptanmıştır (**Ouchi ve ark. 1999**). Bu bulgular adiponektinin anti aterosklerotik etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer adipokinlerin tersine insülin direnci olan durumlarda ve obezitede adiponektinin serum konsantrasyonu azalmıştır. Adiponektin yağ asidi oksidasyonunu ve insülin duyarlılığını artırır (**Yamauchi ve ark. 2001**). Hepatik glukoz üretimini azaltır ve insülinin karaciğerdeki etkilerini potansiyalize eder ve böylece insülin duyarlılığını artırır (**Berg ve ark. 2001**). Benzer şekilde, hayvan modellerinde de adiponektinin hepatik insülin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (**Combs ve ark. 2004**).

Adiponektin, fosfoenol piruvat karboksikinaz, glukoz-6-fosfataz gibi glukoneojenik enzimlerin aktivitelerini azaltırken, karaciğerde yağ asidi oksidasyonunu artırmaktadır. Maymunlarda obezite ve yaşlılıkla ilişkili olarak insülin direnci gelişirken adiponektin seviyelerinde azalma gözlenir (**Hotta ve ark. 2001**). Obez insanlarda da adiponektin seviyelerinde düşüş izlenir. İnsülin direnci ve yüksek duyarlılıklı CRP arttıkça adiponektin düzeyleri azalmaktadır (**Higashiura ve ark. 2004**). Literatürde yüksek adiponektin seviyesi olan bireylerde tip 2 diyabet gelişme riskinin adiponektin seviyeleri düşük olan kişilerden daha az olduğu bildirilmektedir (**Spranger ve ark. 2003**). Kilo verme ve diyet gibi insülin duyarlılığını arttıran girişimler plazma adiponektin düzeylerini artırmaktadır.

Araştırmacılar TNF α ve IL-6'nın insülin direnciyle olan ilişkisini adiponektin üzerinden gerçekleştirdiklerini bildirmektedirler. Literatürde adiponektin uygulanması ile hem obezite hem de diyabet modellerinde insülin direncinin azaldığı tespit edilmiştir (**Guerre-Millo 2004**).

2.2.3. Nöropeptit Y

Nöropeptit Y (NPY) ilk olarak 1982'de domuz beyninden saflaştırılmış ve izole edilmiştir ve 36 amino asitten oluşmaktadır. Hem C hem de N terminali kalıntıları, ismini aldığı Tyr (Y) dir. C terminali Tyr amitlenmiştir. NPY' nin amino asit dizisi, peptid YY (PYY:% 70) ve pankreatik polipeptit (PP:% 50) ile homologdur (**Tatemoto 1982**).

NPY beyinde, sempatik sinir sisteminde ve böbreküstü bezinde dağılır. NPY gıda alımını güçlü bir şekilde artırır ve enerji tüketimini azaltır. Ayrıca, NPY hafıza süreçlerini, depresif durumu, kaygıyı, stres ve nöbeti modüle eder. Aynı zamanda, sirkadiyen ritimlerin karanlık-karanlık döngüsünü kontrol eden bir kimyasal medyatör gibi davranır (**Morris 1989**).

2.3. Erken Teşhiste Biyosensörler ve Avantajları

Biyosensörlerin geliştirilmesinin temelinde canlıların çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme mekanizmaları vardır. Biyosensörlerin "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tanımı, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" şeklindedir (Arshak ve ark. 2008).

Biyosensör tabanlı cihazlar, hedefe yüksek duyarlılık ve seçicilik, hızlı işlem süresi, kolaylık, maliyet açısından faydalı olma gibi çeşitli avantajlar sunan mevcut yaklaşımları saptamak için uygulamaya koyulmuştur. Çizelge 2.2 klasik tayin yöntemleri ile biyosensör sistemlerinin kıyaslamalarını özetlemektedir (Kumar ve ark. 2015).

Çizelge 2. 2. Biyosensör sistemleri ile klasik tayin yöntemlerinin kıyaslanması (Kumar ve ark. 2015)

Biyosensör	
<ul style="list-style-type: none">✓ Yüksek hassasiyet✓ Hızlı tayin✓ Ucuzluk✓ Kolay hazırlanma✓ Kontrollü örnek hazırlama✓ Özgünlük	<ul style="list-style-type: none">X Ticari alanda kısıtlılık
Klasik analitik yöntemler (ELISA,RIA vb.)	
<ul style="list-style-type: none">✓ Hassasiyet✓ Özgünlük	<ul style="list-style-type: none">X Uzun süreli prosedürX PahalılıkX Yükseltilmiş organik çözücüX Tekrar kullanılamaması

Biyolojik sensörlerin bir alt sınıfı olarak elektrokimyasal biyosensörler, bir biyolojik algılama elemanı ve bir elektrokimyasal dönüştürücüden oluşur. Tanıma elemanı (enzimler, antikolar, DNA / RNA, dokular veya diğer biyomoleküller), seçici olarak hedef analit ile reaksiyona girer ve sonuç olarak, bir elektrik sinyali üretilir ve daha sonra, dönüştürücü vasıtasıyla sinyal işlemcisine iletilir. Amplifikasyon ve ayırma gibi bir dizi adımdan sonra yararlı bilgiler elde edilebilir. Elektrokimyasal biyosensörler yaygın olarak geliştirilmiştir ve bazıları ticari aşamaya ulaşmış ve rutin olarak çevresel ve tarımsal uygulamalarda ve özellikle klinik laboratuvar ve endüstriyel analizlerde kullanılmaktadır (**Trashin ve Pchelintsev 2010**).

Elektrokimyasal biyosensörler genel hatlarıyla biyolojik tanıma sürecine göre iki kategoriye ayrılabilir: biyokatalitik cihazlar ve afinite sensörleri. Biyokatalitik sensörler, hedef analiti tanıyan ve katalize edilmemiş bir reaksiyona bağlı reaksiyon hızını seçici olarak arttıran sensörlerdir. Enzimleri, hücreleri ve doku dilimlerini içerir. Afinite biyosensörleri, hedef analit ve antikolar, nükleik asitler (DNA / MicroRNA) gibi biyokimyasal elementler arasındaki etkileşime dayanır. İmmüno-sensörler ve elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri, iki tipik afinite sensörü örneğidir (**Wang 2006**).

Elektrokimyasal biyosensörler son birkaç on yıldır hastalıkların erken tanısına yönelik kullanımlarıyla oldukça ilgi çekici olmuştur. Hassasiyeti ve seçiciliği, çok küçük konsantrasyonlardaki analite yanıt verebiliyor olması, ucuz ve kolay hazırlanır olması gibi avantajlarının bulunması bu yöntemin tercih sebeplerindedir (**Demirbakan ve Sezgintürk 2017**).

2.4. Biyosensör Sistemleri için Yenilikçi Materyaller ve Yöntemler

Biyosensör sistemleri geliştirilirken hassasiyet ve düşük tayin sınırları elde edilebilmesi için immobilizasyon tekniklerinin ve materyallerin doğru seçilmesi çok önemli bir faktördür.

Literatür araştırmalarında biyosensörlerde kullanımına çok fazla rastlanılmamış olan grafit kağıt elektrotlar sahip olduğu sağlamlık, mükemmel iletkenlik , stabilite, düşük algılama sınırları, maliyetinin düşük olması gibi özelliklerinden dolayı biyosensör sistemlerinde kullanım açısından ilgi görmeye başlamıştır. Aynı zamanda esnek olan bu elektrotların en göze çarpan özelliklerinden biri de kullan-at olmasıdır.

Son zamanlarda, biyo-uyumluluk ve hızlı hazırlanmalarından ötürü, biyosensör gelişimi için polimerize amino asitler düşünülmektedir (Yeşil ve ark. 2016). Sentetik amino asitler arasında glutamik asit, elektrot yüzeyinde doğrudan elektropolimerize edilebilir. Glutamik asitin bu kilit noktası, onu biyosensörlerde immobilizasyon yöntemi olarak kullanılması için uygun bir aday haline getirir (Lin ve ark. 2014). Glutamik asit, 1800 yılında, buğday gluteninden yola çıkılarak Karl Heinrich Ritthausen tarafından keşfedilmiştir. Bu amino asit, iki karboksilik grup ile bir zincir yapısına sahiptir.

Poli- glutamik asit (PGA), glutamik asitin suda çözünür bir polimeridir. Polimer yapısında, tekrarlanan glutamat birimleri, α -amino ve δ -karboksilik asitler fonksiyonel grupları ile birbirine bağlanır (Richard ve Margaritis 2001). Elektrot yüzeyini modifiye etmek için PGA uygulaması büyük ilgi görmektedir. Çünkü iyi bir stabiliteye, tekrarlanabilirliğe, hızlı hazırlığa ve yapısında serbest karboksilik gruplara sahiptir. Literatürde, glutamik asitin elektropolimerizasyonu temelli biyosensörler hazırlanmasına yönelik oldukça fazla çalışma mevcuttur (Gross ve ark. 1998).

Nanomalzemeler sahip oldukları özelliklerden dolayı yine biyosensörler sistemlerinde tercih edilen materyallerdendir (Xia ve Gao 2015). Grafen, karbon nanotüpler, fulleren ve diğer karbon nanomateryalleri içeren karbon nanomalzemelerin benzersiz fiziksel, kimyasal ve elektriksel özellikleri vardır. Yüksek yüzey-hacim oranı, mükemmel elektriksel iletkenlik ve uygun biyouyumluluk gibi özellikleri nedeniyle karbon nanomalzemeler, duyarlılık ve kararlılık açısından biyosensörlerin performansını önemli ölçüde artırabilir. Yapı farklılıklarına göre, karbon nanomateryaller sıfır boyutlu (fulleren), tek boyutlu (karbon nanotüpler) ve iki boyutlu (grafen) olarak sınıflandırılırlar (Marin ve ark. 2012).

2004 yılında Novoselov ve Geim tarafından grafitten başarıyla elde edildiğinden beri, grafen sürekli araştırma konusu olmuştur. sp^2 hibridize karbon atomları ile altıgen kafes tarafından oluşturulan bu iki boyutlu (2D) karbon nanomateryal istikrarlı ve güçlü bir yapıya, kayda değer termal iletkenliğe, muazzam özgül yüzey alanına, mükemmel elektron transfer kapasitesine, ayrıca istenen esnekliğe sahiptir (Novoselov ve ark. 2004).

2.5. Kaynak Araştırması

Zhang ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada leptin tayinine yönelik bir elektrokimyasal biyosensör geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Çalışma kapsamında, çalışma elektrotu olarak kullandıkları GCE (camı karbon elektrot) yi SWCNT- kitosan nanokompozitleri ile modifiye etmişlerdir. Sonuçta araştırmacılar, bu biyosensörün 0-1000

ng/mL aralığında geniş bir tayin aralığına sahip olduğunu ve tayin sınırının da 5 pg/mL olduğunu öne sürmüşlerdir (**Zhang ve ark. 2018**).

Dong ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada bir amperometrik biyosensör ile leptin tayinini hedeflemişlerdir. Çalışma kapsamında, çalışma elektrotu olarak GCE yi kullanmışlar ve elektrotu karbon nanotüp/kitosan film ile modifiye etmişlerdir. Sonuçta 0,05 ng/mL-500 ng/mL gibi geniş bir tayin aralığına ve 30 pg/mL tayin limitine sahip hassas bir biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir (**Dong ve ark. 2014**).

Martinez- Garcia ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada obeziteyle ilişkili nöropeptit Y nin tayinine yönelik elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Çalışma elektrotu olarak kullanılan SPE yi indirgenmiş grafen oksit ile modifiye etmiş ve sonrasında 4-aminobenzoik asitin dizonyum tuzu ile CV' de 0 V' dan -1 V' a tarama yapmışlardır. Sonuçta; biyosensör için lineer tayin aralığını 10^{-4} -10 ng/mL olarak belirlemişlerdir (**Martinez-Garcia ve ark. 2017**).

Kong ve arkadaşları 2017 yılında PGA/MWCNT/polivinil alkol modifiyeli bir camı karbon elektrotun elektrokimyasal davranışını analiz etmişlerdir. Prokaterol tayinine yönelik geliştirdikleri biyosensör için tayin aralığını 0,06 μ M - 8 μ M olarak belirlemişlerdir. Biyosensörün yüksek hassasiyet gösterdiğini ve glutamik asitin katkısını öne sürmüşlerdir (**Kong ve ark. 2017**).

He ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada leptin tayinine yönelik bir kemilüminesans temelli immunosensör geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Tayin sinyalini artırabilmek için hemin/G-quadruplex DNAzyme kullanılmıştır. Optimum koşullar altında geliştirdikleri immunosensörün 1,9 pg/mL tayin sınırı, 10-1000 pg/mL tayin aralığına sahip ve yüksek hassasiyette olduğunu belirtmişlerdir (**He ve ark. 2013**).

Kim ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada geliştirdikleri LSPR temelli etiketsiz bir optik biyosensör ile leptin tayinini hedeflemişlerdir. Bu amaçla silika nanopartiküller tabakasında ince bir altın (Au) filmin birikmesine dayanan çok noktali altın kaplı nanopartikül dizisi (MG-NPA) biyoçipiyle bir LSPR-bazlı etiketsiz optik biyosensör üretmişlerdir. Tayin sınırını 100 pg/mL olarak belirledikleri biyosensörün ucuzluk, kolay hazırlanma ve yüksek hassasiyet gibi birçok avantaja sahip olduğunu belirtmişlerdir (**Kim ve ark. 2011**).

Sanghavi ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada bir nanokanal aygıt ile grafen modifiyeli elektrotlar kullanarak pikomolar seviyesinde nöropeptit Y' nin elektrokimyasal ölçümünü rapor etmişlerdir. NPY' nin hassasiyet sınırını 4 pM' dan düşük bulmuşlardır (**Sanghavi ve ark. 2014**)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Biyosensörlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Materyaller

Çalışma elektrotu olarak kullanılan grafit kağıt elektrot (GP elektrot) Xiamen Tob New Energy Technology Co. Ltd den satın alınmıştır.

Referans elektrot olarak kullanılan KCl ile doygunlaşmış 3M Ag/AgCl elektrot iBAS, Warwickshire, UK den satın alınmıştır.

Karşıt elektrot olarak kullanılan platin tel iBAS, Warwickshire, UK den satın alınmıştır.

Glutamik asit Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA den satın alınmıştır.

N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

N- hidroksisüksinimid (NHS) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$), nitrik asit (HNO_3) ve hidroklorik asit (HCl) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

İndirgenmiş grafen oksit Graphene Laboratories Inc, USA den satın alınmıştır.

Leptin Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Anti-leptin Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Adiponektin Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Anti-adiponektin Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Nöropeptit Y Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Anti-nöropeptit Y Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Sığır serum albümini (BSA) Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Potasyum mono bazik, potasyum di bazik, potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Kullanılan çözücü: etanol Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Dimetil formamid (DMF) Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

TRIS bazı Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA den alınmıştır.

Kullanılan tüm sarf malzemeler Interlab Lab. Ürün. San ve Tic. A.Ş.' den tedarik edilmiştir.

Leptin ve anti-leptin için tüm seyreltme işlemleri Tris-HCl (20 mM pH 8) tamponu ile, adiponektin, anti-adiponektin, nöropeptit Y ve anti nöropeptit Y için seyreltme işlemleri fosfat (50 mM pH 7) tamponu ile gerçekleştirilmiştir.

Redox prob çözeltisi fosfat tamponunda 0,1 M KCl, 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ ve $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Dizayn edilen biyosensörler için tüm ölçümler Döngüsel Voltametri, Kronoimpedimetri, Kare Dalga ve Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında alındı.

Biyosensörler geliştirilirken kullanılan diğer cihazlar;

Ultrasonik banyo (JEIOTECH)

Ultra saf su (18,2 MΩ/cm) cihazı (Elga LC134, Veolia Water Technologies, USA)

Hassas terazi (RADWAG), (SHIMADZU ATX224)

Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı)

pH metre (HANNA INSTRUMENTS), (INOLAB)

Su sirkülatörü (sıcaklık kontrolü) (PolyScience)

Mikropipetler (ISOLAB)

Vorteks (VELP SCIENTIFICA ZX3)

3.3. Leptin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri

3.3.1. Leptin tayini için GP/glutamik asit/anti-leptin temelli biyosensörün immobilizasyon adımları

➤ GP yüzeyinin temizlenmesi için elektrot öncelikle alümina ile parlatılarak sonrasında sırasıyla 5' er dakika etanol ve ultra saf su ile sonikasyona bırakılmıştır.

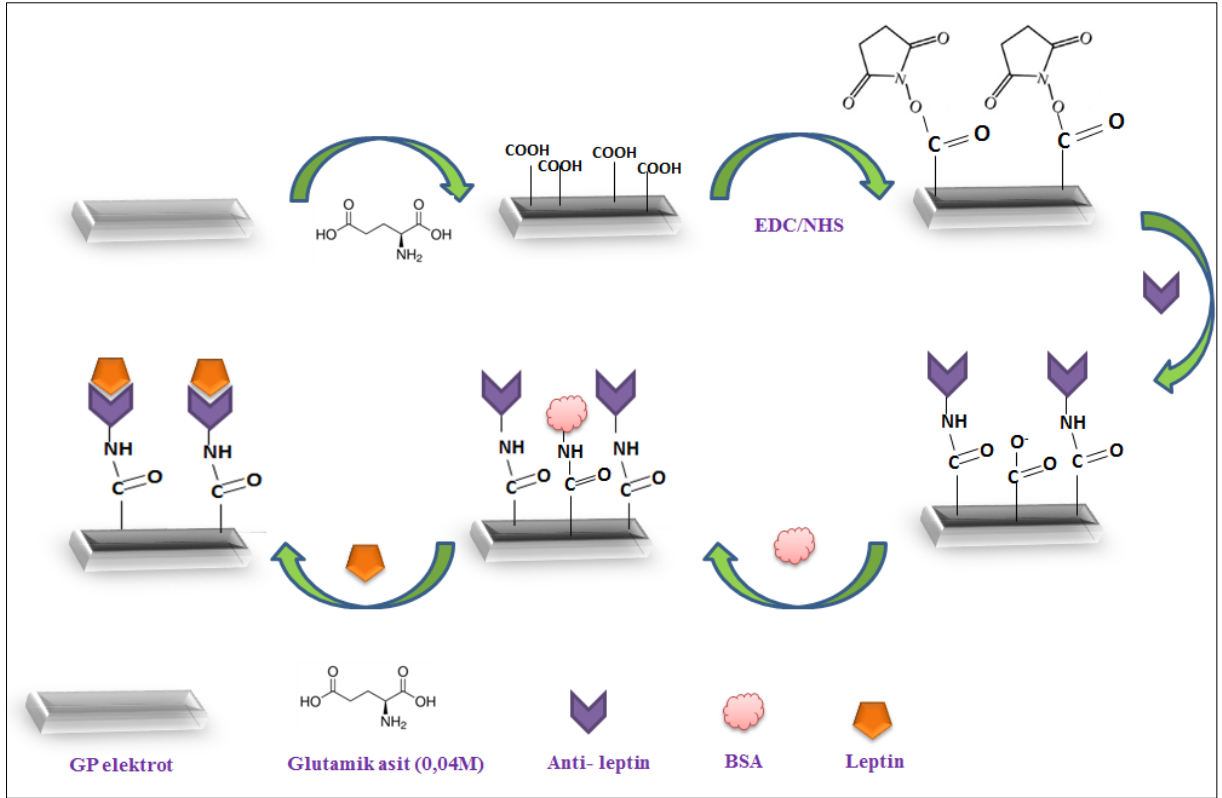
➤ Daha sonra elektrotlara, fosfat (pH 7) tamponu kullanılarak hazırlanan 0.04 M glutamik asit çözeltisi ile elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem döngüsel voltametri ile -0,8 V ile 2 V aralığında (100 mV/s, 8 döngü) gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında elektrotlar saf su ile yıkanıp, saf argon altında nazikçe kurutulmuş ve CV-EIS ölçümleri alınmıştır. Poli-glutamik asitin (PGA) karboksil uçlarını aktifleştirebilmek ve bu aktif uçların antikorun -NH₂ grupları ile etkileşime girebilmesi için 0,4 mM EDC ve 0,1 mM NHS içeren çözelti kullanılmıştır. 1 saat boyunca elektrotlar EDC/NHS ile inkübe edildikten sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

➤ Sonrasında elektrotlar anti-leptin ile inkübasyona bırakılmıştır. Glutamik asitin aktif karboksil uçları ile anti-leptinin amin grupları etkileşime girerek anti-leptinin kovalent olarak yüzeye immobilize olması sağlanmıştır.

➤ Amin grupları ile etkileşime girmeyen aktif karboksil uçlarını bloklamak amacıyla elektrotlar bloklama ajanı BSA (%0,5) ile 1 saat inkübasyona bırakılmış ve yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alınmıştır. Bu aşamadan sonra hazırlanan biyosensörler, leptin tayini yapılana kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir. Temiz grafit kağıt (GP) elektrot yüzeyi ve modifikasyonlar gerçekleştirildikten sonra elektrot yüzeyleri sırasıyla GP, GP/PGA, GP/PGA/EDC-NHS, GP/PGA/EDC-NHS/anti-leptin, GP/PGA/EDC-NHS/anti-leptin/BSA olarak bahsedilmiştir.

Anti-leptinin PGA modifiyeli GP elektrota immobilizasyonuna ilişkin adımlar Şekil 3.1 de özetlenmiştir.

İmmobilizasyon adımları tamamlandıktan sonra immunosensörler farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart leptin çözeltileri ile muamele edilmiştir. Her bir leptin konsantrasyonunun redoks probu bulunan elektrokimyasal bir hücrede elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3. 1. Anti-leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi

3.3.2. Leptin biyosensörü için elektrokimyasal ölçümler

Dizayn edilen biyosensörün immobilizasyon adımları optimizasyon aşamaları ve karakterizasyon çalışmaları elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltametri (CV) ve kare dalga voltammetrisi (KDV) teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. CV için potansiyel aralığı -0,5 - 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 5 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 50.000 – 0.05 Hz aralığındadır. Kare dalga voltammetrisi -0,2 ile 0,7 V potansiyel tarama aralığında (puls boyutu 25 mV' da gerçekleştirilmiştir.

Glutamik asit ile elektropolimerizasyon işlemi elektrokimyasal hücre içerisinde -0,8 ile 2 V aralığında (100 mV/s) 8 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Anti-leptin temelli biyosensörün optimizasyon aşamaları

Hassas ve tekrar üretilebilir bir biyosensör elde edebilmek için glutamik asit konsantrasyonu, anti-leptin konsantrasyon ve inkübasyon süresi ve leptin inkübasyon süresi gibi parametreler optimize edilmiştir.

3.3.3.1. Glutamik asit konsantrasyonu optimizasyonu

Elektropolimerizasyon işlemi anti leptinin yüzeye yüksek verimde immobilize olabilmesi için oldukça önemli bir aşamadır. Kullanılacak olan glutamik asit konsantrasyonunun anti-leptinin bağlanmasında kritik bir rolü bulunmaktadır. Bu sebeple, optimum glutamik asit konsantrasyonunu belirlemek için temiz elektrot yüzeylerinde 3 farklı konsantrasyonda (0,02 M, 0,04 M, 0,08 M) glutamik asit ile polimer oluşturulmuştur. Sonrasında EIS ve CV ölçümleri alınarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve birbirleriyle kıyaslanmıştır.

3.3.3.2. Anti-leptin konsantrasyon optimizasyonu

Optimum glutamik asit konsantrasyonu belirlendikten sonra antikor konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak; elektrotlar 4 farklı konsantrasyonda anti-leptin (18,5 ng/mL , 37 ng/mL, 74 ng/mL, 111 ng/mL) ile inkübasyona bırakılmış ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. EIS eğrilerinden faydalanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve optimum anti-leptin konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.3.3.3. Anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonu

Yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirliğe sahip bir biyosensör için optimize edilmesi gereken bir diğer önemli adım antikor inkübasyon süresidir. Bunun için elektrotlar 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika sürelerinde anti-leptin ile inkübe edilmiştir. Daha sonra yıkayıp kurutularak CV-EIS ölçümleri alınmıştır.

3.3.3.4. Leptin inkübasyon süresi optimizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, diğer optimum koşullar sağlandıktan sonra son olarak elektrot yüzeyine leptinin maksimum verimde bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla diğer optimum koşullar sabit tutularak hazırlanan elektrotlar, 30,45 ve 60 dakika boyunca leptin ile inkübasyona bırakılmıştır. EIS ve CV ölçümleri alınmış ve impedans eğrilerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.

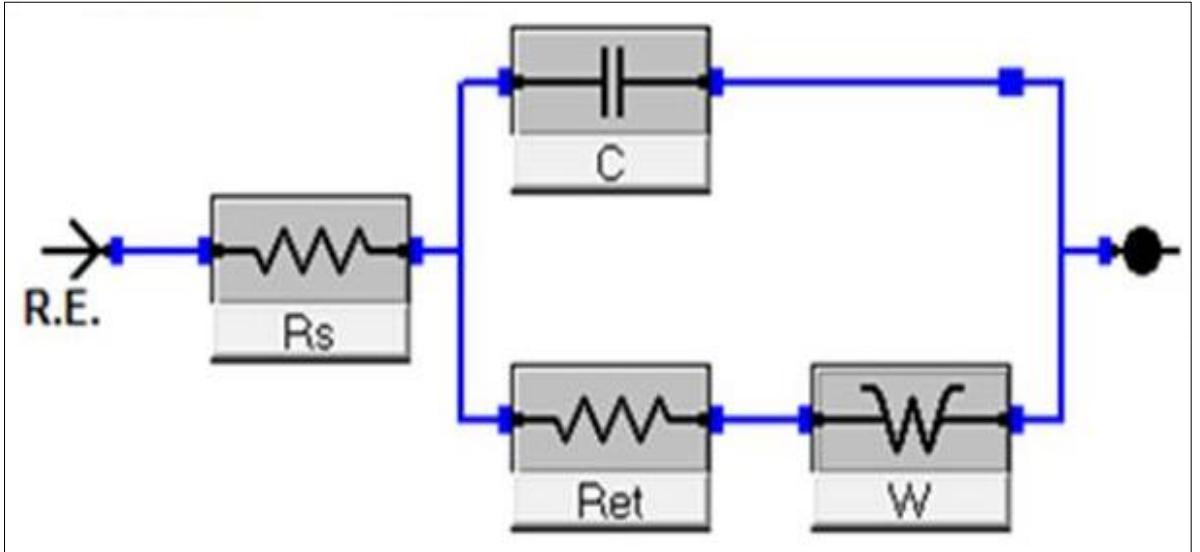
3.3.4. Leptin biyosensörünün analitik çalışmaları

3.3.4.1. Geliştirilen leptin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında optimum koşullarda hazırlanan 8 farklı elektrot 8 farklı artan leptin konsantrasyonu ile inkübe edilmiş ve elde edilen impedans eğrilerinden yararlanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği çizilirken aşağıda verilen denklem kullanılmıştır (**Karaboğa 2018**).

$$\Delta R_{et} = R_{et}(\text{antijen}) - R_{et}(\text{BSA})$$

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi çalışmalarında en önemli noktalardan bir tanesi de geliştirilen sistemin bir elektriksel eşdeğer devre modeliyle uyumlu halde modellendirilmesidir. Bu noktanın önemi özellikle elektron transfer rezistanslarının doğru hesaplanmasında ortaya çıkmaktadır. Çünkü elektron transfer rezistansları yani impedans bu devre modeli temel alınarak hesaplanmaktadır. Tüm impedans hesaplamaları Şekil 3.2 de gösterilen eşdeğer devre modeli kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3. 2. Biyosensör sisteminde kullanılan elektriksel eşdeğer devre modeli [R_s : çözelti direnci, C: kapasitans, R_{et} : elektron transfer rezistansı, W: warburg impedansı] (**Karaboğa ve Sezgintürk 2018**)

3.3.4.2. Leptin biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken en temel özelliklerden biri o biyosensörün tekrarlanabilir olmasıdır. Bu amaçla, optimum koşullarda hazırlanan 20 farklı elektrot, aynı

konsantrasyonda leptin ile inkübe edilmiş ve EIS-CV ölçümleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde standart sapma, ortalama değer ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.3.4.3. Leptin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Tekrar üretilebilirlik optimum koşullarda hazırlanan farklı biyosensörlerin birbiri arasındaki uyumlu yanıtlarını açıklar. Biyosensör sisteminin güvenilirliğinin test edilebilmesi için optimum şartlarda farklı kişiler tarafından aynı ölçüm cihazı kullanılarak 8 biyosensör hazırlanmış ve her bir biyosensörden leptin tayinine yönelik alınan yanıt incelenmiştir. Ret değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve sonuçlar birbiriyle kıyaslanmıştır.

3.3.4.4. Leptin biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

GP elektrot üzerine immobilize edilen anti-leptin ve leptin arasındaki etkileşimin karakterizasyonu için sabit frekansta impedans tekniği kullanılmıştır. Sabit frekans ölçümü için frekans, Bode eğrilerinden yararlanılarak 75 Hz olarak seçilmiş ve 45 dakika boyunca sabit frekansta Tris-HCl (20 mM, pH=8) tamponu içerisinde impedans ölçümü alınmıştır.

3.3.4.5. Leptin biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında optimum koşullarda hazırlanan ve leptin ile inkübe edilen bir elektrotun asit ile bozundurulması ve tekrar yüzeye leptin bağlanabilme kapasitesi incelenmiştir. Bu amaçla elektrot leptin ile muamele edildikten sonra %0,1 HCl asit çözeltisinde 3 dakika bekletilmiştir. EIS ölçümü alınmıştır. Daha sonra tekrar leptin ile inkübe edilmiş ve EIS ölçümü alınmıştır. Bu işlemin kaç kere tekrarlanabildiği belirlenmeye çalışılmıştır.

3.3.4.6. Kare dalga voltametri (KDV)

Dizayn edilen biyosensörün karakteristiği EIS ve CV tekniklerinin yanı sıra Kare Dalga voltametri (KDV) ile de test edilmiştir. Optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar lineer aralıkta leptin ile inkübe edilmiş ve kare dalga voltamogramları alınmıştır. Gözlenen pik akımları artan leptin konsantrasyonuna karşılık grafiğe geçirilmiştir.

3.3.4.7. Leptin biyosensörünün depo ömrü

Raf ömrü optimum çalışma koşulları altında biyosensörün duyarlılığını koruduğu süre olarak tanımlanabilir. Ömür, yapılan ölçüm sayısına ya da ölçülen hedef analit derişimine bağlı olarak değişim gösterebilir (Comba ve ark. 2018). Optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar depo kararlılığını test edebilmek için haftalık periyotlarla aynı konsantrasyonda

leptin ile inkübe edilmiştir.10 hafta sonunda biyosensörlerin aktivite kaybı test edilmiştir. Biyosensörlerin, 10 haftalık bu sürede +4°C’ de buzdolabında muhafaza edilmesiyle yapılarındaki biyolojik aktif maddelerin fonksiyon kaybının önlenmesi sağlanmıştır.

3.3.4.8. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile leptin biyosensörünün yüzey morfolojisinin incelenmesi

Biyosensörün immobilizasyon adımlarında yüzeyde meydana gelen morfolojik değişimleri inceleyebilmek için JEOL JSM-7100F marka-modelindeki Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılmıştır. Kullanılan SEM cihazı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOBİLTUM) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi’nde mevcuttur. SEM görüntülerini elde etmek için 5 kV voltaj uygulanmıştır.

3.3.4.9. Leptin biyosensörünün Kramers-Kronig dönüşüm karakterizasyonu

Leptin biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers-Kronig dönüşümü kullanılmıştır (Özcan ve Sezgintürk 2017)

Kramers- Kronig dönüşümü diğer tüm geliştirilen biyosensör sistemlerinde de aynı şekilde uygulanmıştır.

3.3.4.10. Leptin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarında elektrot yüzeyinin ne ölçüde kaplandığını saptayabilmek için 10 farklı hızda CV ölçümleri alınmış ve voltamogramlardan elde edilen gerekli parametreler kullanılarak Laviron eşitliği yardımıyla elektrotun kaplanmış yüzey alanı hesaplanmıştır.

3.3.4.11. Leptin biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği

Dizayn edilen biyosensörün gerçek serum örneklerine verdiği yanıtı analiz edebilmek için yaş aralığı 7 ve 7’den küçük olan 5 sağlıklı çocuk serumu ile çalışılmıştır. Serumlardaki leptin miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Standart ekleme için kullanılan leptin konsantrasyonları 2 pg/mL ve 5 pg/mL dir. Serum örnekleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden 2013/86/07/05 araştırma etik kurul onayı ile alınmıştır.

Sağlıklı çocuklardan alınan serumlarda leptin konsantrasyonu, dizayn edilen biyosensörün tayin aralığından daha yüksek olduğundan serum numeleri gerekli oranlarda seyreltilmiştir.

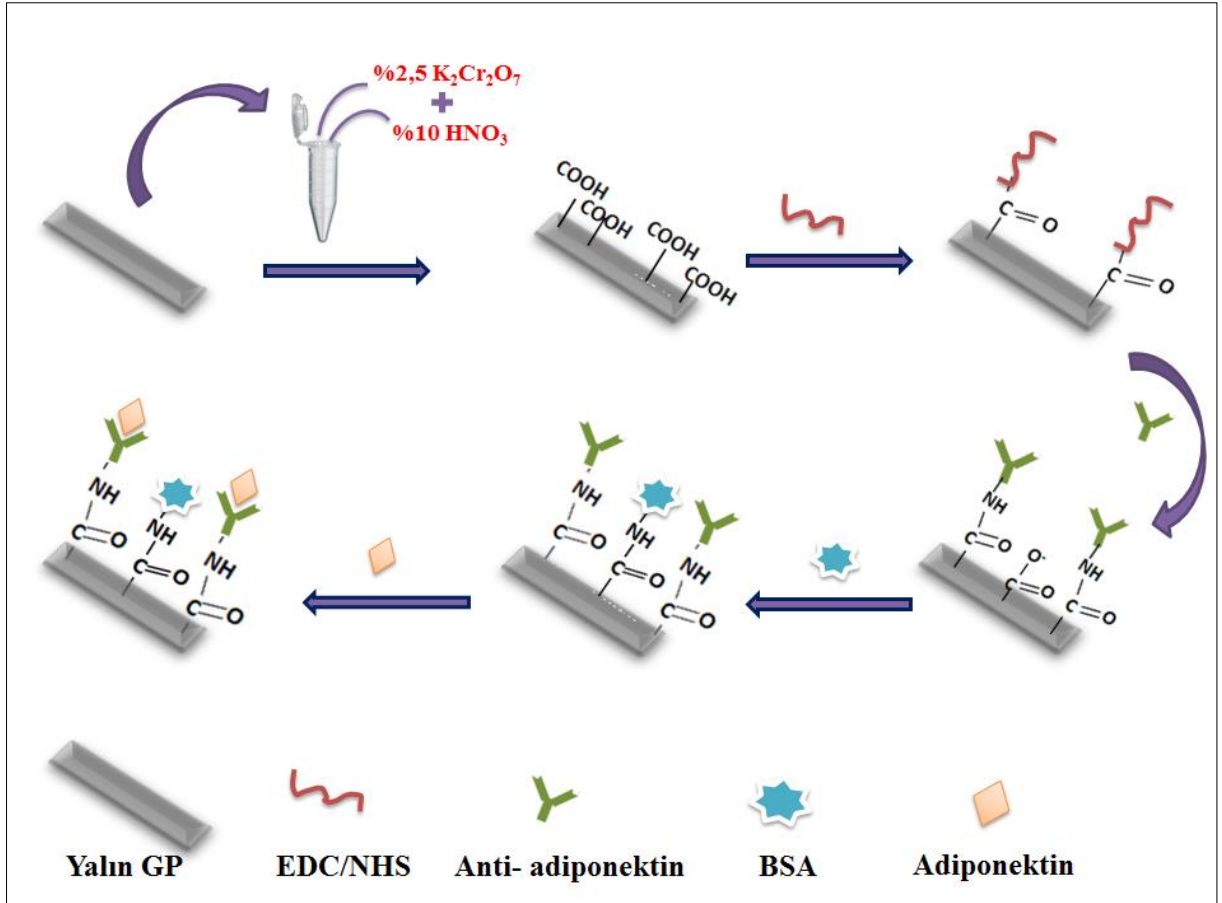
3.4. Adiponektin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri

3.4.1. Anti-adiponektin temelli biyosensör geliştirilmesi

Adiponektin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör için ilk olarak elektrot temizleme prosedürü uygulanmıştır. GP elektrot alümina ile parlatılarak 5'er dakika etanol ve ultra saf su ile sonikasyona bırakılmıştır. Daha sonra temizlenen elektrotların iletken karbon yüzeyinin doğrudan bozundurulması işlemi için $K_2Cr_2O_7$ (%2,5) ve HNO_3 (%10) içeren sulu çözelti hazırlanmıştır. Elektrotlar hazırlanan bu çözeltiyle gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Bu sayede anti –adiponektinin yüzeye immobilize olabileceği bir zemin hazırlanabilmiştir. Gece boyu asit ile muamele edilen elektrotlar yüzeyde karboksil gruplarını aktifleştirebilmek için 1 saat boyunca EDC/NHS çifti ile inkübasyona bırakılmıştır. Anti-adiponektinin (10 ng/mL) yüzeye kovalent olarak bağlanması yüzeydeki aktifleşmiş karboksil uçları ve anti-adiponektinin amin gruplarının etkileşmesi ile mümkün olmuştur. Ancak spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla amin grupları ile bağ yapamayıp açıkta kalan aktif karboksil uçlarını bloklayıcı ajan BSA kullanılmıştır. Tüm bu işlemler sonrasında elektrotlar sonraki adiponektin ölçümleri için $+4^{\circ}C$ ' de saklanmıştır. Modifikasyonlar sonrası elektrot yüzeyleri GP, GP/ $K_2Cr_2O_7$ - HNO_3 , GP/ $K_2Cr_2O_7$ - HNO_3 /EDC-NHS, GP/ $K_2Cr_2O_7$ - HNO_3 /EDC-NHS/anti-adiponektin, GP/ $K_2Cr_2O_7$ - HNO_3 /EDC-NHS/anti-adiponektin/BSA olarak bahsedilmiştir.

Adiponektin biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi Şekil 3.3' te verilmiştir.

İmmobilizasyon adımları tamamlandıktan sonra immunosensörler farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart adiponektin çözeltileri ile muamele edilmiştir. Her bir adiponektin konsantrasyonunun redoks probu bulunan elektrokimyasal bir hücrede EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3. 3. Anti-adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi

3.4.2. Adiponektin biyosensörü için elektrokimyasal ölçümler

Adiponektin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün immobilizasyon adımları optimizasyon aşamaları ve karakterizasyon çalışmaları elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltametri (CV) ve kare dalga voltammetrisi (KDV) teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. CV için potansiyel aralığı -0,5 - 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 5 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametrideki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 50.000 – 0.05 Hz aralığındadır. Kare dalga voltammetrisi ölçümü -0,2 ile 0,7 V potansiyel tarama aralığında (puls boyutu 25 mV, frekans 25 Hz) gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Anti-adiponektin temelli biyosensörün optimizasyon çalışmaları

3.4.3.1. Anti –adiponektin konsantrasyon optimizasyonu

Anti-adiponektin konsantrasyonunun dizayn edilen immunosensörün yanıtı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için biyosensörler üç farklı anti-adiponektin çözeltisiyle (5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL) inkübe edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda adiponektin çözeltilerini tayin edebilme kapasiteleri tespit edilmeye çalışılmıştır. İmpedans eğrilerinden yararlanılarak farklı anti-adiponektin konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensörlere ait kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve optimum anti-adiponektin konsantrasyonuna karar verilmiştir.

3.4.3.2. Anti-adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonu

Optimum anti-adiponektin çözeltisi belirlendikten sonra diğer optimize edilmesi gereken önemli parametre anti-adiponektin inkübasyon süresidir. Bu amaçla, elektrotlar farklı sürelerde (30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika) anti-adiponektin ile inkübasyona bırakılmış ve hazırlanan biyosensörlerle farklı konsantrasyonlarda adiponektin çözeltisi tayin edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen EIS eğrilerinden yararlanılarak farklı inkübasyon sürelerine ait kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve optimum anti- adiponektin inkübasyon süresine karar verilmiştir.

3.4.3.3. Adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonu

Son olarak; hazırlanan elektrotlar biyomarker çözeltisinin inkübasyon süresinin immunosensör yanıtı üzerine etkisini inceleyebilmek için adiponektin ile farklı periyotlarda (30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika) inkübasyona bırakılmış ve elde edilen impedans eğrilerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.

3.4.4. Adiponektin biyosensörünün analitik çalışmaları

3.4.4.1. Geliştirilen adiponektin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, optimum koşullarda hazırlanan biyosensörler artan adiponektin konsantrasyonu ile muamele edilmiş ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Artan adiponektin konsantrasyonuna karşılık yük transfer direnci (ΔR_{et}) grafiği Başlık 3.3.4.1 deki denklem kullanılarak çizilmiştir.

Hazırlanan bu immunosensör için de tüm impedans hesaplamaları Başlık 3.3.4.1. de bahsedildiği gibi eşdeğer devre modeli kullanılarak yapılmıştır.

3.4.4.2. Adiponektin biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Hassas ve lineer bir immunosensörün sahip olması gereken en önemli özelliklerden birisi de tekrarlanabilir olmasıdır. Bu amaçla, aynı koşullarda hazırlanan 20 farklı biyosensör aynı konsantrasyonda adiponektin ile muamele edilmiş ve aynı cihazla EIS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek standart sapma, ortalama değer ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.4.4.3. Adiponektin biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Aynı koşullarda ancak farklı zamanlarda ve farklı kişiler tarafından hazırlanan 8 anti-adiponektin temelli biyosensörün herbiri artan adiponektin konsantrasyonu ile muamele edilmiş ve alınan yanıtlar karşılaştırılmıştır.

3.4.4.4. Adiponektin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümleri

Sabit frekansta impedans ölçümü tekniğiyle biyosensör yüzeyindeki anti-adiponektin / adiponektin bağlanmasına ilişkin eş zamanlı impedans ve faz açısı değişimi gözlenmiştir. Sabit frekans ölçümü için frekans, Bode eğrilerinden yararlanılarak 10 Hz olarak seçilmiş ve 45 dakika boyunca sabit frekansta fosfat (50 mM, pH=7) tamponu içerisinde impedans ölçümü alınmıştır.

3.4.4.5. Adiponektin biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında optimum koşullarda hazırlanan ve adiponektin ile muamele edilen biyosensörün asit ile bozundurulması ve sonrasında tekrar adiponektin ile muamele edilmesi prensibinden yola çıkılarak biyosensörün çalışma kapasitesi test edilmeye çalışılmıştır. İlk adiponektin muamelesinden sonra elektrot %0,1 HCl asit içerisinde 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra elektrot ultra saf suyla nazikçe ve iyice yıkanmış ve tekrar adiponektin ile muamele edilmiştir. Tüm bu işlemler EIS ile takip edilmiş ve biyosensörün aktivitesini büyük oranda kaybettiği ana kadar bu şekilde tekrarlanmıştır.

3.4.4.6. Kare dalga voltametri

Tasarlanan biyosensörün karakteristik özelliği EIS ve CV tekniklerinin yanı sıra Kare Dalga voltametri (KDV) ile de test edilmiştir. Optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar lineer aralıkta adiponektin ile muamele edilmiş ve elektrokimyasal parametreler belirlenerek kare dalga voltamogramları alınmıştır. Gözlenen pik akımları artan adiponektin konsantrasyonuna karşılık grafiğe geçirilmiştir.

3.4.4.7. Adiponektin biyosensörünün depo ömrü

Optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar depo kararlılığını test edebilmek için haftalık periyotlarla aynı konsantrasyonda adiponektin ile inkübe edilmiştir ve biyosensörlerin zaman geçtikçe aktivite kaybı incelenmiştir. Biyosensörler, bu süre boyunca +4°C’ de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.4.4.8. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile adiponektin biyosensörünün yüzey morfolojisinin incelenmesi

Biyosensörün her bir immobilizasyon aşamasında elektrot yüzeyinde meydana gelen morfolojik değişimleri gözlemleyebilmek için SEM tekniğinden yararlanılmıştır. Bu işlem için Başlık 3.3.4.8. de bahsedilen SEM cihazı kullanılmıştır.

3.4.4.9. Adiponektin biyosensörünün Kramers- Kronig dönüşüm karakterizasyonu

Adiponektin biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers-Kronig dönüşümü kullanılmıştır.

3.4.4.10. Adiponektin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarında elektrot yüzeyinin ne ölçüde kaplandığını saptayabilmek için 10 farklı hızda CV ölçümleri alınmış ve voltamogramlardan elde edilen gerekli parametreler kullanılarak Laviron eşitliği yardımıyla elektrotun kaplanmış yüzey alanı hesaplanmıştır.

3.4.4.11. Adiponektin biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği

Adiponektin biyosensörünün gerçek serum örneklerine verdiği yanıtı incelemek için yaş aralığı 7 ve 7’den küçük olan 5 sağlıklı çocuk serumu ile çalışılmıştır. Serumlardaki adiponektin miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Standart ekleme için kullanılan adiponektin konsantrasyonları 1 pg/mL ve 5 pg/mL dir.

Sağlıklı çocuklardan alınan serum örnekleri gerekli oranda seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır.

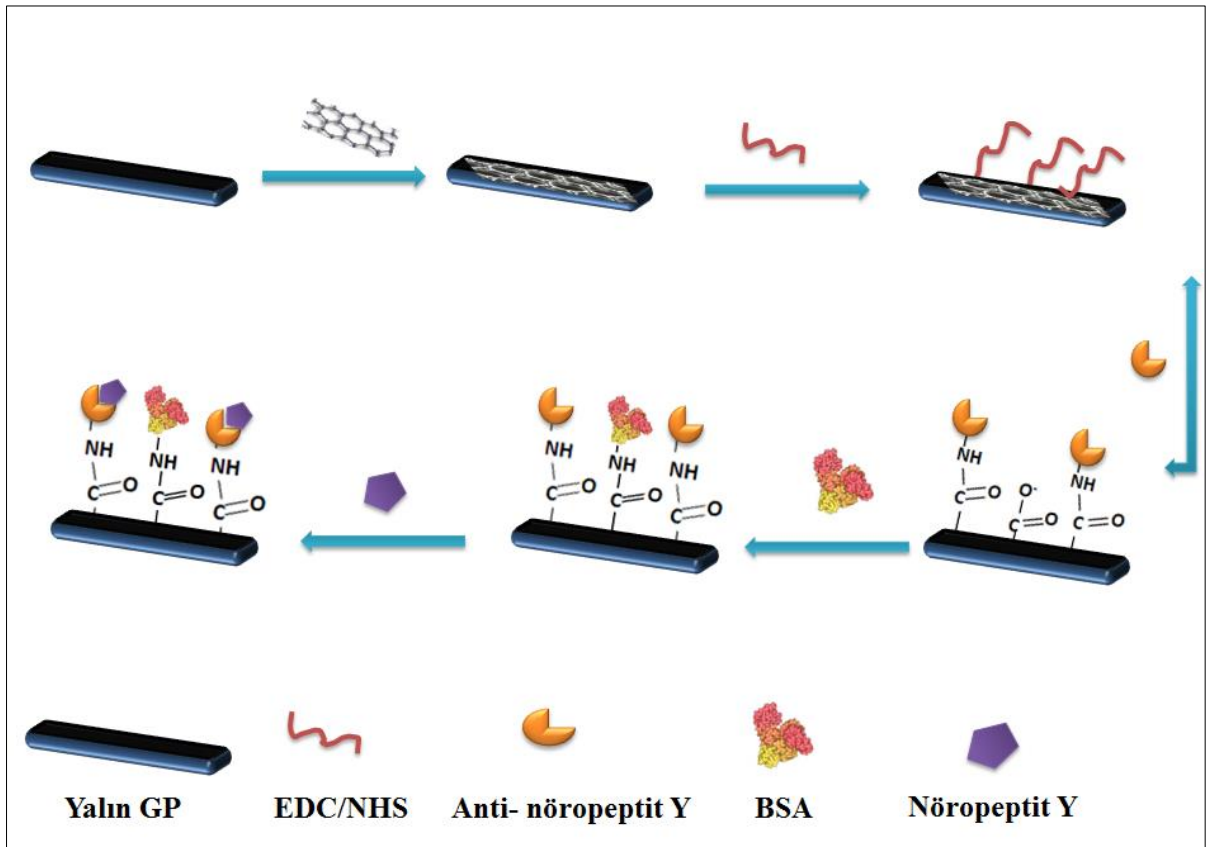
3.5. Nöropeptit Y Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri

3.5.1. Anti-Nöropeptit Y temelli biyosensör geliştirilmesi

Hassas ve lineer bir biyosensör elde edebilmek için şüphesiz en önemli işlemlerden biri elektrot yüzeyinin titizlikle temizlenmesidir. Bu amaçla elektrotların yüzeyleri alümina ile

parlatılmış ve sırasıyla etanol ve ultra saf su ile 5' er dakika boyunca sonikasyona bırakılmıştır. Temizlenen elektrotlar DMF içerisinde disperse edilmiş indirgenmiş grafen oksit (rGO) ile gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Elektrotların rGO ile modifiye edilmesiyle yüzeyde oluşan karboksil gruplarını aktifleştirebilmek için EDC/NHS çifti kullanılmıştır. Bu sayede anti-nöropeptit Y çözeltisinin yüzeye immobilize olabilmesine imkan tanınmıştır. Anti-nöropeptit Y çözeltisinin amin gruplarıyla etkileşime girememiş karboksil uçlarını bloklamak ve spesifik olmayan etkileşimleri önleyebilmek için BSA bloklayıcı ajan kullanılmıştır. Tüm modifikasyon işlemleri sonrası elektrot yüzeyleri GP, GP/rGO, GP/rGO/EDC-NHS, GP/rGO/EDC-NHS/anti nöropeptit Y, GP/rGO/EDC-NHS/anti nöropeptit Y/BSA olarak bahsedilmiştir. İmmobilizasyon adımlarına ilişkin şematik gösterim Şekil 3.4' te gösterilmektedir.

İmmobilizasyon adımları tamamlandıktan sonra immunosensörler farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart nöropeptit Y çözeltileri ile muamele edilmiştir.



Şekil 3. 4. Anti-nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi

3.5.2. Nöropeptit Y biyosensörü için elektrokimyasal ölçümler

Nöropeptit Y biyosensörünün tüm immobilizasyon adımları, optimizasyon aşamaları ve analitik çalışmaları Başlık 3.3.2. de anlatıldığı gibi EIS ve CV ile test edilmiştir. Tüm ölçüm parametreleri yine Başlık 3.3.2. de belirtilen değerlerle aynıdır.

3.5.3. Anti- nöropeptit Y temelli biyosensörün optimizasyon çalışmaları

3.5.3.1. rGO miktar optimizasyonu

İndirgenmiş grafen oksit miktarının biyosensörden elde edilen yanıtta etkisinin olup olmadığını anlayabilmek amacıyla, 3 farklı miktarda (0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg) rGO dispersiyon çözeltileri hazırlanmış ve elektrotlar bu üç rGO miktarlarıyla modifiye edilmiştir. Daha sonra ultra saf su ile yıkanıp argon gazı ile kurutulan elektrotlar Başlık 3.5.1. de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Elde edilen Ret değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve optimum rGO miktarına karar verilmiştir.

3.5.3.2. Anti-nöropeptit Y konsantrasyon optimizasyonu

Optimum rGO miktarı belirlendikten sonra antikor konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak; elektrotlar 3 farklı konsantrasyonda anti-nöropeptit Y (5,024 ng/mL , 25,12 ng/mL, 50,24 ng/mL) ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında elektrotlar yüzeye adsorbe olmuş anti-nöropeptit Y yi uzaklaştırmak için ultra saf su ile titizlikle yıkanmış ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. EIS eğrilerinden faydalanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve optimum anti-nöropeptit Y konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.5.3.3. Anti-nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonu

Anti-nöropeptit Y çözeltilisinin elektrot yüzeyine immobilize olma süresinin dizayn edilen immunosensörün yanıtı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla elektrotlar üç farklı periyotlarda (30 dakika, 45 dakika, 60 dakika) anti-nöropeptit Y çözeltilisiyle inkübe edilmiştir. İmpedans eğrilerinden yararlanılarak antikorun üç farklı sürede yüzeye immobilize edilmesiyle hazırlanan biyosensörlere ait kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve optimum süreye karar verilmiştir.

3.5.3.4. Nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında nöropeptit Y çözeltilisinin inkübe edilme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 3 farklı inkübasyon süresi

(30 dakika, 45 dakika, 60 dakika) denenmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri kıyaslanarak nöropeptit Y nin inkübasyonu için optimum süre seçilmiştir.

3.5.4. Nöropeptit Y biyosensörünün analitik çalışmaları

3.5.4.1. Geliştirilen nöropeptit Y biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi

Dizayn edilen immunosensörün tayin aralığını belirleyebilmek için, optimum koşullarda hazırlanan biyosensörler artan nöropeptit Y konsantrasyonu ile muamele edilmiş ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Artan nöropeptit Y konsantrasyonuna karşılık yük transfer direnci (ΔRet) grafiği Başlık 3.3.4.1 deki denklem kullanılarak çizilmiştir.

Hazırlanan bu immunosensör için de tüm impedans hesaplamaları Başlık 3.3.4.1. de bahsedildiği gibi eşdeğer devre modeli kullanılarak yapılmıştır.

3.5.4.2. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Nöropeptit Y tayinine yönelik geliştirilen immunosensörün tekrarlanabilirlik testi için aynı koşullarda hazırlanan 20 farklı elektrot aynı konsantrasyonda nöropeptit Y (5 pg/mL) ile inkübe edilmiş ve elde edilen impedans eğrilerinden yararlanılarak standart sapma, ortalama değer ve varyasyon katsayısı gibi istatistiksel parametreler hesaplanmıştır.

3.5.4.3. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini belirlemek için Başlık 3.3.4.3. de belirtilen prosedür kullanılmış ve 10 farklı biyosensörün belirli nöropeptit Y tayin aralığındaki cevapları incelenmiştir.

3.5.4.4. Nöropeptit Y biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

Biyosensör yüzeyindeki anti-nöropeptit Y / nöropeptit Y bağlanmasına ilişkin eş zamanlı impedans ve faz açısı değişimini gözlemleyebilmek için sabit frekansta impedans ölçümü tekniği kullanılmıştır. Bode eğrisinden yararlanılarak frekans olarak 10 Hz seçilmiş ve 45 dakika boyunca belirlenen sabit frekansta fosfat (50 mM, pH=7) tamponu içerisinde impedans ölçümü takip edilmiştir.

3.5.4.5. Nöropeptit Y biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında optimum koşullarda hazırlanan ve nöropeptit Y ile inkübe edilen bir biyosensörün asit ile bozundurulup tekrar yüzeye nöropeptit Y bağlayabilme kapasitesi incelenmiştir. Bu amaçla elektrot ilk olarak nöropeptit Y ile muamele edilmiş ve sonrasında %0,1 HCl asit çözeltisi içerisinde 3 dakika bekletilmiştir. EIS ölçümü alınmıştır.

Daha sonra tekrar nöropeptit Y ile inkübe edilmiş ve EIS ölçümü alınmıştır. Bu işlem biyosensörün aktivitesini büyük oranda kaybettiği ana kadar bu şekilde tekrarlanmıştır.

3.5.4.6. Nöropeptit Y biyosensörünün depo ömrü

Dizayn edilen biyosensörlerin raf ömrünün belirlenmesi için optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar haftalık periyotlarla aynı konsantrasyonda nöropeptit Y (5 pg/mL) ile inkübe edilmiştir. Biyosensörün zaman geçtikçe aktivite kaybı incelenmiştir.

3.5.4.7. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile nöropeptit Y biyosensörünün yüzey morfolojisinin incelenmesi

Biyosensörün her bir immobilizasyon aşamasında elektrot yüzeyinde meydana gelen morfolojik değişimleri gözlemleyebilmek için SEM tekniğinden yararlanılmıştır. Bu işlem için Başlık 3.3.4.8. de bahsedilen SEM cihazı kullanılmıştır.

3.5.4.8. Nöropeptit Y biyosensörünün Kramers Kronig dönüşüm karakterizasyonu

Nöropeptit Y biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers-Kronig dönüşümü kullanılmıştır.

3.5.4.9. Nöropeptit Y biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarında elektrot yüzeyinin ne ölçüde kaplandığını saptayabilmek için 10 farklı hızda CV ölçümleri alınmış ve voltamogramlardan elde edilen gerekli parametreler kullanılarak Laviron eşitliği yardımıyla elektrotun kaplanmış yüzey alanı hesaplanmıştır.

3.5.4.10. Nöropeptit Y biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliği

Nöropeptit biyosensörünün gerçek serum örneklerine uygulanabilirliğinin belirlenmesi için 5 sağlıklı çocuk serumu (yaş aralığı 7 ve 7'den küçük) ile çalışılmıştır. Serumlardaki nöropeptit Y miktarının incelenmesi için standart ekleme tekniği kullanılmıştır. Standart ekleme için kullanılan nöropeptit Y konsantrasyonları 2 pg/mL ve 5 pg/mL dir. Sağlıklı çocuklardan alınan serum örnekleri gerekli oranlarda seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır.

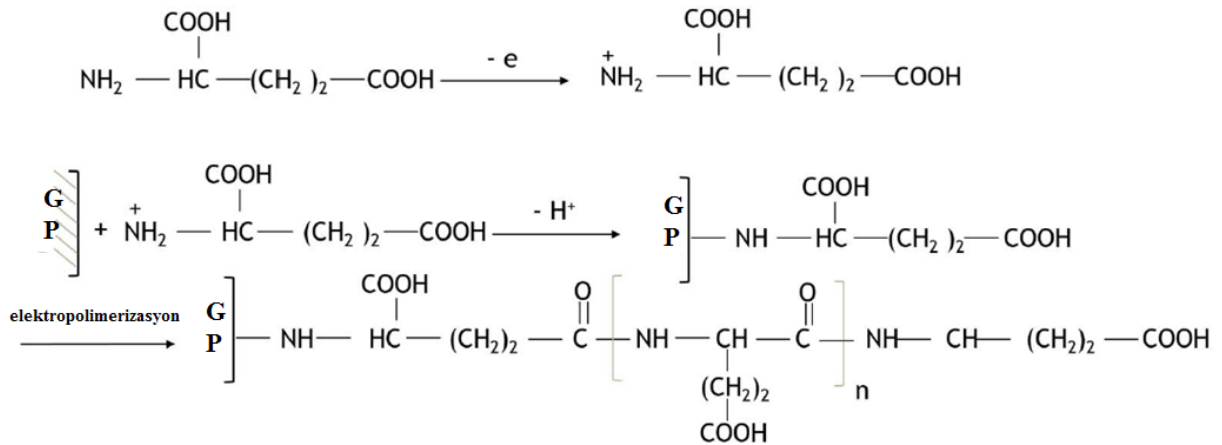
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Leptin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri

4.1.1. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımları

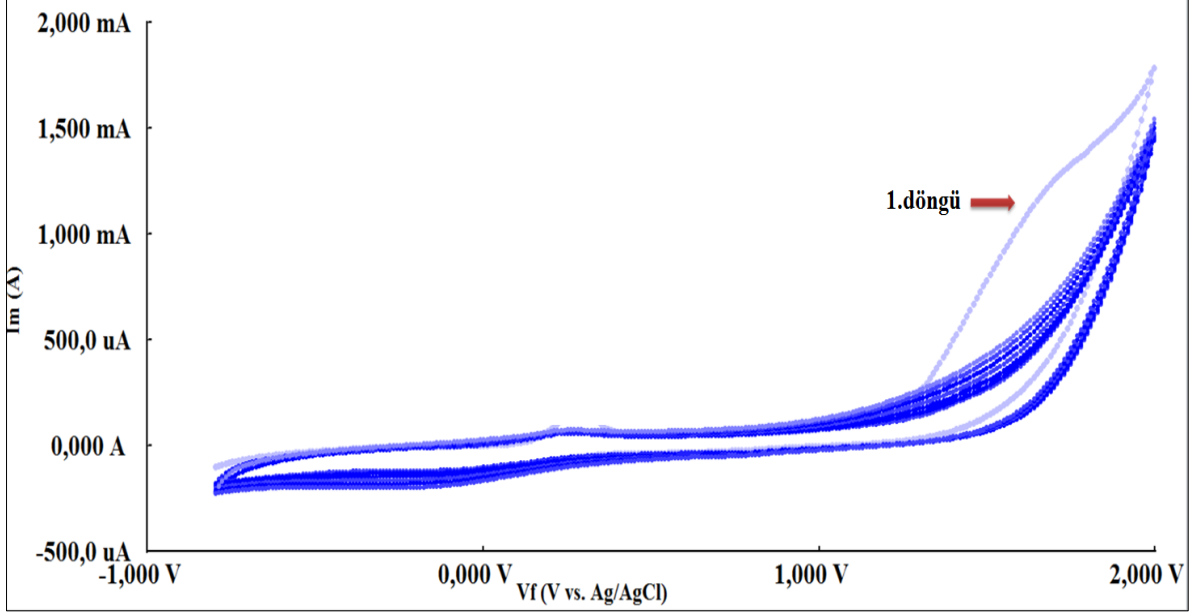
Leptin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün immobilizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi için ilk adım elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Temizlik prosedüründe elektrotlar alümina ile parlatılarak, sırasıyla 5' er dakika boyunca etanol ve ultra saf su ile sonikasyona bırakılmıştır. EIS ölçümünün alınmasıyla elektrot yüzeyinin temizliği kontrol edilmiştir. Daha sonra yalın elektrotlar bir elektrokimyasal hücrede bulunan glutamik asit çözeltisine daldırılmış ve Başlık 3.3.1 de belirtilen parametrelerin kullanılmasıyla da elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Glutamik asit, elektrot yüzeyinde doğrudan ve kolayca elektropolimerize olabilmektedir. Aynı zamanda iyi bir stabiliteye, tekrarlanabilirliğe ve kolay hazırlanma özelliklerine sahiptir. Hem bu özellikleri ve hem de yapısında bulunan serbest karboksil gruplarından dolayı glutamik asit, immobilizasyon işlemlerinde tercih edilir bir materyal olmuştur. Poliglutamik asit yapısında, tekrarlanan glutamat birimleri, α -amino ve δ -karboksilik asit fonksiyonel grupları ile birbirine bağlanır (**Benvidi ve ark 2018**). Grafit kağıt elektrot üzerinde glutamik asitin elektropolimerizasyon mekanizması Şekil 4.1' de görüldüğü gibidir.



Şekil 4. 1. GP elektrot yüzeyinde glutamik asitin elektropolimerizasyon mekanizması (**Benvidi ve ark. 2018**)

Şekil 4.2' de verilen CV voltamogramları GP elektrot yüzeyinde glutamik asidin elektropolimerizasyonuna ait voltamogramlardır.

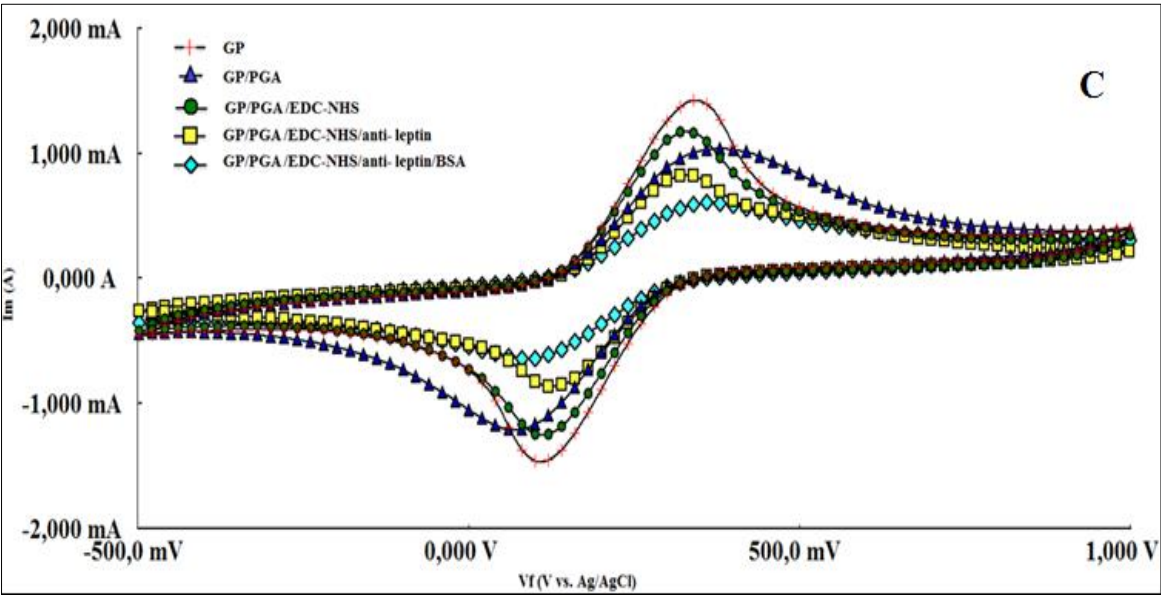
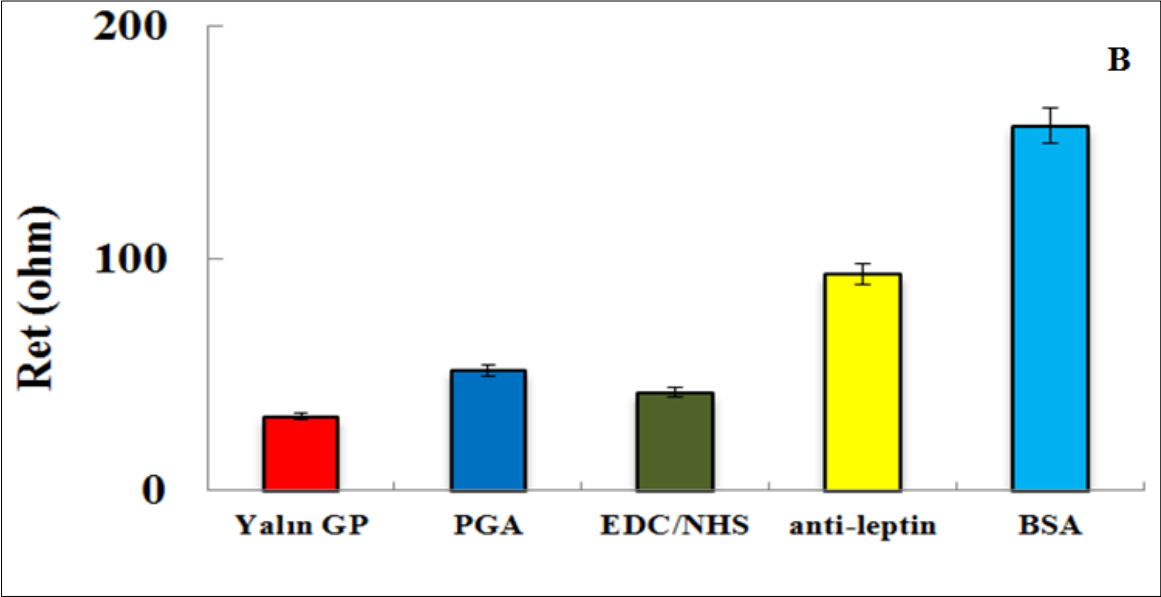
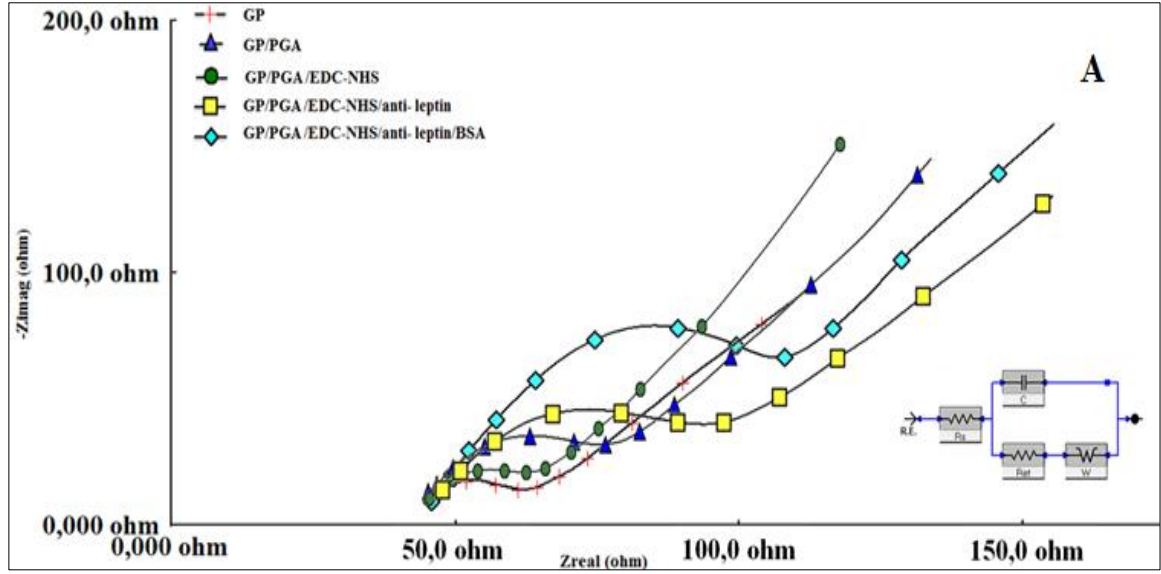


Şekil 4. 2. GP elektrot yüzeyinde glutamik asidin elektropolimerizasyonuna ait CV voltamogramlar

Şekil 4.2' de görüldüğü gibi, bir elektron kaybı serbest radikal oluşmasına yol açmıştır ve birinci döngüde +1,7 V civarında bu radikale ait bir oksidasyon piki gözlemlenmiştir. İkinci döngüden itibaren bu pik azalmış ve kaybolmuştur. Bu durum, döngü sayısının artmasıyla birlikte yüzeydeki yoğunlaşmanın ve iletken olmayan bir polimer tabakanın oluştuğunun kanıtı niteliğindedir.

Poliglutamik asit ile modifiye edilen elektrotlar daha sonra iyice yıkanıp kurutulmuş ve EDC/NHS çifti ile 1 saat boyunca muamele edilmiştir. Bu sayede yüzeydeki karboksil grupları aktifleşmiştir ve daha sonra yüzeye immobilize olan anti-leptinin amin grupları ile kovalent etkileşime girmiştir. İmmobilizasyondan sonra spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla BSA bloklama ajanı kullanılmıştır.

Leptin tayini için tasarlanan biyosensörün immobilizasyon adımlarına ilişkin EIS eğrileri, Ret değerleri ve CV voltamogramları Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4. 3. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait (A) EIS eğrileri ve (B) Ret değerleri (C) CV voltamogramları

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) bir dizi biyobelirteçlerin belirlenmesinde kullanılan etiketsiz ve başarılı bir yöntemdir. Bu yöntem genellikle antikor-antijen etkileşimi, DNA hibridizasyonu veya enzim-substrat kataliziyle indüklenen elektrot-elektrolit arayüzey özelliklerinde değişikliklerin izlenmesi için kullanılır. Biyo-fonksiyonel elektrotların karakterizasyonu ve küçük iyonlardan büyük proteinlere bazı analitlerin belirlenmesi için başarılı ve etkili bir yöntemdir (Lawal 2018). Şekil 4.3.A' daki EIS eğrileri incelendiğinde; yalın GP elektrotun oldukça fazla iletken olmasından dolayı Nyquist diyagramında yarım daire çapının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Elektrot yüzeyinin poliglutamik asit ile modifiye edilmesiyle yük transfer direncinde artış görülmüştür. Yalın GP elektrotun Ret değeri 30,07 ohm olarak hesaplanırken elektropolimerizasyon işlemi sonrası Ret değeri 55,73 ohm'a yükselmiştir. Bu artışın sebebi pH 7' de negatif yüklü poliglutamik asitin karboksil gruplarının redoks probuna itme uygulaması ve neticesinde redoks probunun yüzeye difüzyonunun zorlaşmasıdır. Bir sonraki adımda, polimer tabaka EDC/NHS ile aktive edilmiş ve yük transfer direnci 40 ohm' a düşmüştür. Daha sonra biyosensörün anti-leptin ile muamele edilmesiyle aktif karboksil grupları ile anti-leptinin yapısında bulunan amin grupları kovalent etkileşime girmiş ve yük transfer direnci 93,24 ohm' a yükselmiştir. İmpedanstaki bu artışın sebebi anti-leptinin kovalent immobilizasyonu yüzeyde bariyer oluşturması ve bu tabakadan dolayı redoks probunun yüzeye difüze olmakta güçlük çekmesi olarak söylenebilir. Son olarak; amin grupları ile etkileşime girememiş aktif karboksil gruplarını bloklamak amacıyla BSA bloklayıcı ajan kullanılmıştır. Elektrot yüzeyinin daha da yalıtkan hale gelmesinden ötürü impedansta 93,24 ohm' dan 157,3 ohm'a bir artış gözlenmiştir.

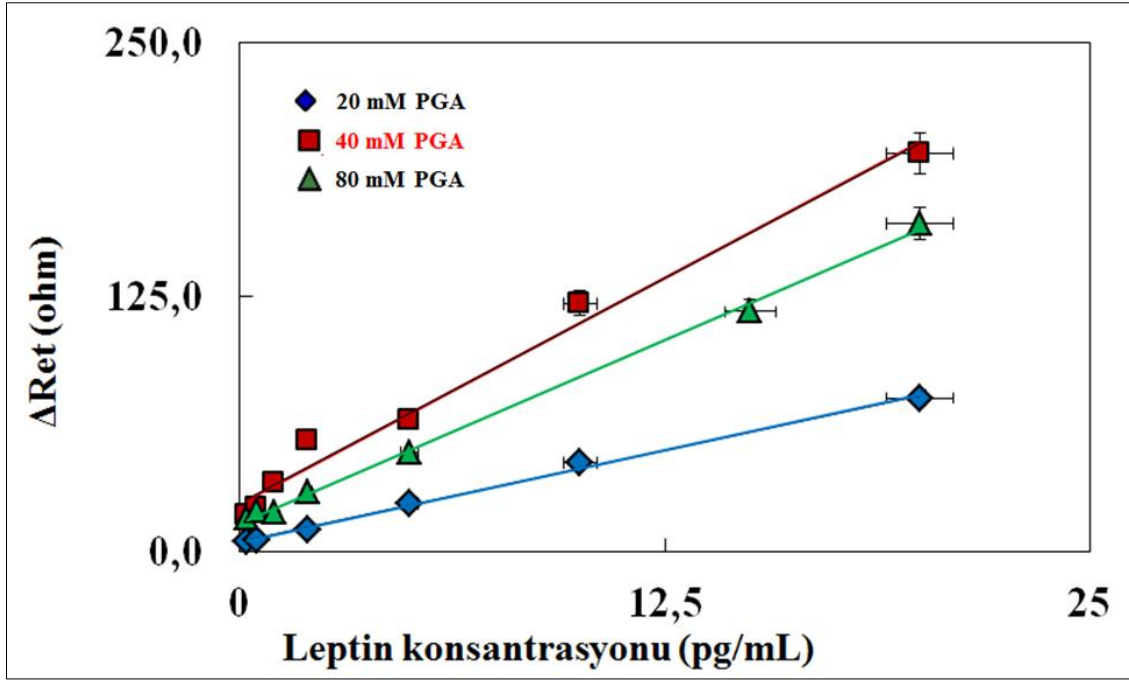
Tüm immobilizasyon adımlarında redoks çiftinin elektrokimyasal aktivitesinin izlenerek elektrot yüzeyinde oluşan varyasyonların değerlendirilmesi için döngüsel voltametri ölçümü yapılmıştır. Döngüsel voltametri tekniği elektrokimyasal teknikler içinde en yaygın kullanılan tekniktir. Döngüsel voltametri tekniği çoğunlukla indirgenme yükseltgenme reaksiyonları ve elektron transferi gibi verilerin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Şekil 4.3.B' de leptin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tüm immobilizasyon adımlarına ait CV voltamogramları verilmiştir. Yalın elektrot yüzeyinde glutamik asit ile elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştiğinde pik akımlarında düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün sebebi iletken olmayan PGA tabakasının, arayüzey yük transfer direncini artıran bir bariyer görevi görmesi ve aynı zamanda PGA'nın negatif karboksil gruplarının redoks probunun yüzeye difüzyonunu engellemesi olarak gösterilebilir. PGA'nın yapısında bulunan

karboksil gruplarının EDC/NHS çifti ile aktifleştirilmesi ve sonrasında anti-leptinin kovalent immobilizasyon işleminin gerçekleştirilmesiyle yükseltgenme ve indirgenme pik akımlarında daha da düşüş meydana gelmiştir. Bunun sebebi anti-leptinin yüzeyi bloklama özelliği göstermiş olmasıdır. Son olarak elektrot spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla BSA çözeltisi ile muamele edilmiş ve neticesinde tahmin edildiği şekilde pik akımlarında daha da düşüş görülmüştür.

4.1.2. Leptin biyosensörünün optimizasyon çalışmaları

4.1.2.1. Glutamik asit konsantrasyonu optimizasyonu

Glutamik asit (PGA) konsantrasyonu, elektropolimerizasyon işlemini ve dolayısıyla anti-leptinin elektrot yüzeyine immobilizasyonunu etkileyen önemli bir parametredir. Optimum PGA konsantrasyonunu belirleyebilmek için, PGA konsantrasyonları dışında diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Farklı PGA konsantrasyonları (20 mM, 40 mM, 80 mM) ile elektropolimerizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve biyosensörün belirli konsantrasyon aralığındaki leptine verdiği yanıt EIS ve CV ölçümleriyle analiz edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.4) incelendiğinde; PGA konsantrasyonunun artırılmasıyla (20 mM dan 40 mM a) yük transfer direncinin de arttığı görülmektedir. Bu durum, elektrot yüzeyine ferri/ferro siyanür redoks probunun difüze olmasını zorlaştıran kalın bir glutamik asit tabakası oluşmasıyla açıklanabilir. Ancak PGA konsantrasyonu 80 mM olarak belirlendiğinde yük transfer direncinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı, optimum PGA konsantrasyonu 40 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 4. Glutamik asit konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi

Çizelge 4.1’ de farklı PGA konsantrasyonlarına ait kalibrasyon grafiklerinin denklemleri ve R^2 değerleri görülmektedir.

Çizelge 4. 1. PGA konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

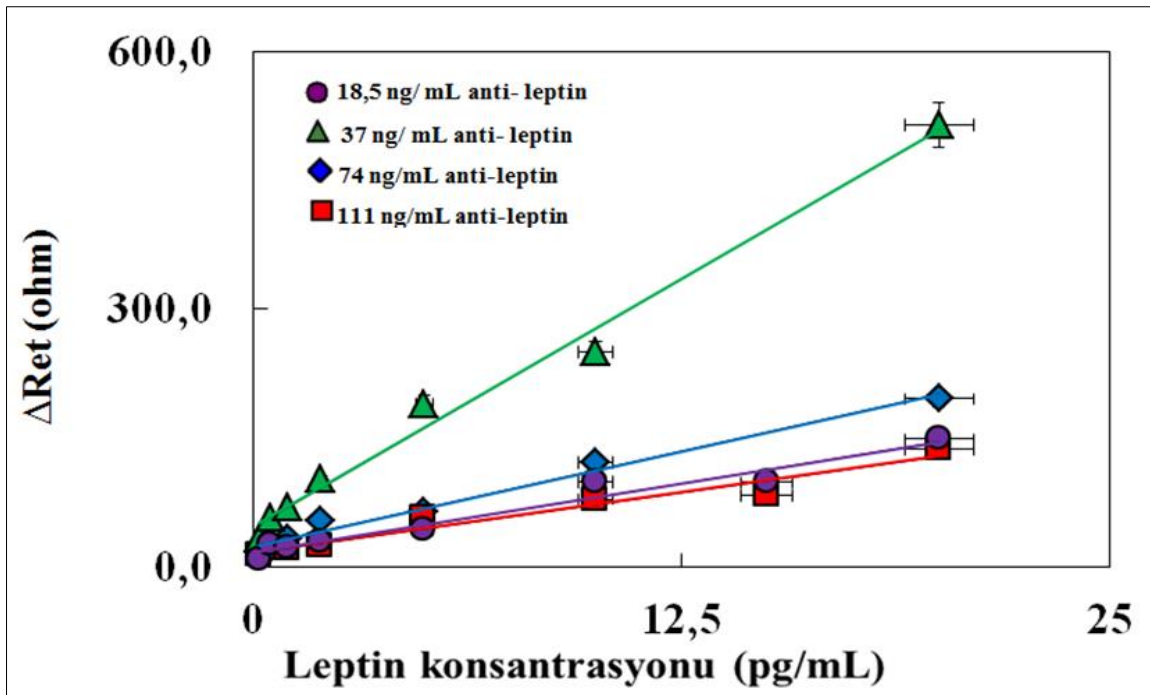
Optimizasyon parametreleri	R^2	y
20 mM PGA	0,9969	$3,6155x + 4,391$
40 mM PGA	0,9837	$8,8498x + 23,663$
80 mM PGA	0,9981	$7,1919x + 13,88$

4.1.2.2. Anti-leptin konsantrasyon optimizasyonu

Anti- leptin çözeltisinin poli-glutamik asit modifiyeli GP biyosensörü cevabı üzerindeki etkisini araştırmak için 4 farklı anti- leptin konsantrasyonu (18,5 ng/mL, 37 ng/mL, 74 ng/mL, 111 ng/mL) denenmiştir. Farklı antikor konsantrasyonlarıyla hazırlanan biyosensörler belirli aralıktaki leptin konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve elde edilen

impedans eğrilerinden kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.5) çizilmiştir. Kalibrasyon grafiklerine bakıldığında; düşük anti-leptin konsantrasyonunda (18,5 ng/mL) düşük yük transfer direnci elde edilmiştir. Konsantrasyonun 37 ng/mL'a artırılmasıyla sinyallerde de belirgin artış gözlenmiştir. Bu durum zaten nispeten küçük bir yapısı olan anti-leptinin (16 kDa) düşük konsantrasyonunun (18,5 ng/mL) leptin çözeltisi ile etkileşime girebilmesinde yetersiz kalmasıyla açıklanabilir. Ancak anti-leptin konsantrasyonunun 37 ng/mL'den 74 ng/mL' a artırılmasıyla yüzeydeki muhtemelen daha karmaşık ve yoğun bir immobilizasyondan ötürü leptinin bağlanma kapasitesinin düştüğü görülmüştür. Hem yüksek sinyaller hem de nispeten yüksek belirleme katsayısı (R^2) elde edilmesinden dolayı optimum anti-leptin konsantrasyonu 37 ng/mL olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.2' de anti-leptin konsantrasyonu optimizasyon parametrelerine ilişkin kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve denklemler gösterilmektedir.



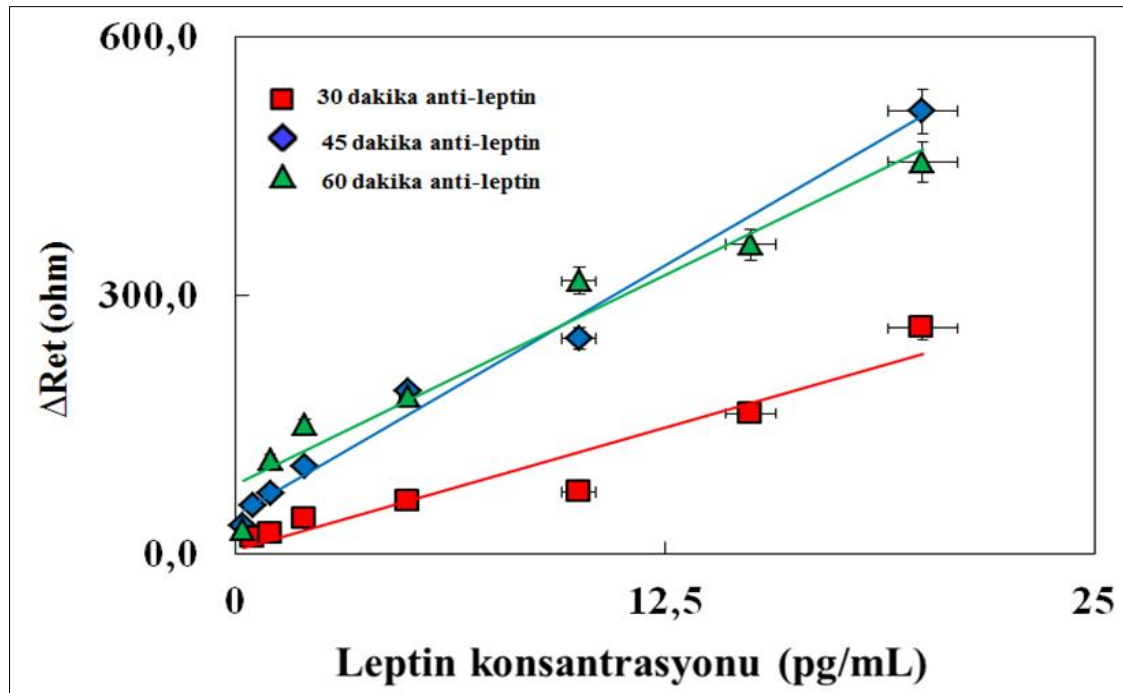
Şekil 4. 5. Anti-leptin konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi

Çizelge 4. 2. Anti-leptin konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
18,5 ng/mL anti-leptin	0,9582	$6,4688x+16,238$
37 ng/mL anti-leptin	0,9887	$23,159x+45,721$
74 ng/mL anti-leptin	0,9837	$8,8498x+23,663$
111 ng/mL anti-leptin	0,9499	$5,6093x+16,779$

4.1.2.3. Anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonu

Anti-leptin immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik olarak 30, 45 ve 60 dakikalık farklı inkübasyon sürelerinde anti-leptin immobilizasyonları gerçekleştirilerek biyosensörler hazırlanmıştır. Bu biyosensörlere ilişkin elde edilen her bir CV ve EIS cevapları değerlendirilerek Şekil 4.6' daki kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.



Şekil 4. 6. Anti-leptin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Şekil 4.6' daki kalibrasyon grafiklerine bakıldığında; biyosensörün optimum konsantrasyonda hazırlanan anti-leptin çözeltisi ile düşük sürede (30 dakika) inkübasyona bırakılmasıyla anti-leptin/leptin etkileşiminin azaldığı görülmektedir. Anti-leptinin 45 dakika inkübasyon süresiyle elde edilen sinyallerin 60 dakika inkübasyonundan elde edilen sinyallere yakın olmasına karşın, 45 dakika inkübasyon süresinde elde edilen grafiğin nispeten daha doğrusal olduğu görülmektedir. Bu durum anti-leptin çözeltisinin inkübasyon süresinin 60 dakika olmasının yüzeyde muhtemelen gerçekleşen gelişigüzel bağlanmalara ve daha kompleks bir biyoaktif tabaka oluşmasına sebep olmasıyla açıklanabilir. Bu da anti-leptin ile leptin etkileşimini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu sebeplerden dolayı optimum anti-leptin inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

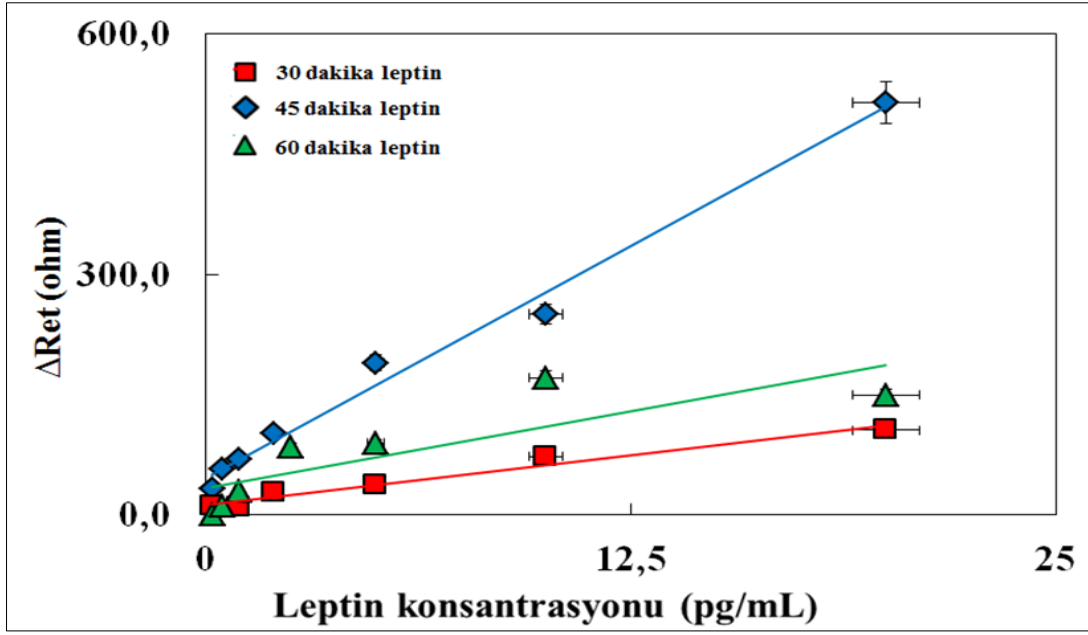
Çizelge 4.3' te anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 3. Anti-leptin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon Parametreleri	R^2	y
30 dakika anti-leptin	0,9977	11,346x+4,8792
45 dakika anti-leptin	0,9887	23,159x+45,721
60 dakika anti-leptin	0,9545	19,433x+81,105

4.1.2.4. Leptin inkübasyon süresi optimizasyonu

Son optimizasyon aşaması olarak leptin çözeltisinin inkübasyon süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla optimum koşullarda hazırlanmış elektrotlar 3 farklı periyotta (30 dakika, 45 dakika, 60 dakika) leptin çözeltisi ile inkübe edilmiş ve EIS eğrilerinden elde edilen Ret değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.7) çizilmiştir.



Şekil 4. 7. Leptin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Optimum koşullarda hazırlanmış elektrot 30 dakika boyunca leptin ile inkübasyona bırakıldığında anti-leptin ile leptin etkileşiminin 45 dakika inkübasyon süresine göre nispeten azaldığı görülmüştür. Bu da sinyalde ve regresyon katsayısı değerinde düşüş olarak gözlenmiştir. Aynı şekilde leptinin 60 dakika inkübasyonu ile yine sinyalde düşüş olduğu görülmüştür. Biyosensör yanıtındaki bu düşüşün sebebi muhtemelen artan inkübasyon süresiyle birlikte leptin ile doygunluğa erişmesidir. Kalibrasyon grafiğine bakıldığında; biyosensörün 20 pg/mL leptin çözeltisiyle inkübe edilmesiyle yük transfer direncindeki belirgin düşme de yine yüzeyin leptin ile doyduğunu desteklemiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı optimum leptin inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

Çizelge 4. 4' te leptin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve denklemler verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Leptin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon Parametreleri	R^2	y
30 dakika leptin	0,9649	4,9102x+13,072
45 dakika leptin	0,9887	23,159x+45,721
60 dakika leptin	0,6868	7,6559x + 33,956

4.1.3. Leptin biyosensörünün analitik çalışmaları

4.1.3.1. Leptin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi

Tüm immobilizasyon basamaklarının optimum şartları tayin edildikten sonra PGA ile modifiye edilmiş biyosensörün yanıt verebildiği leptin konsantrasyon aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. Biyosensör artan leptin konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

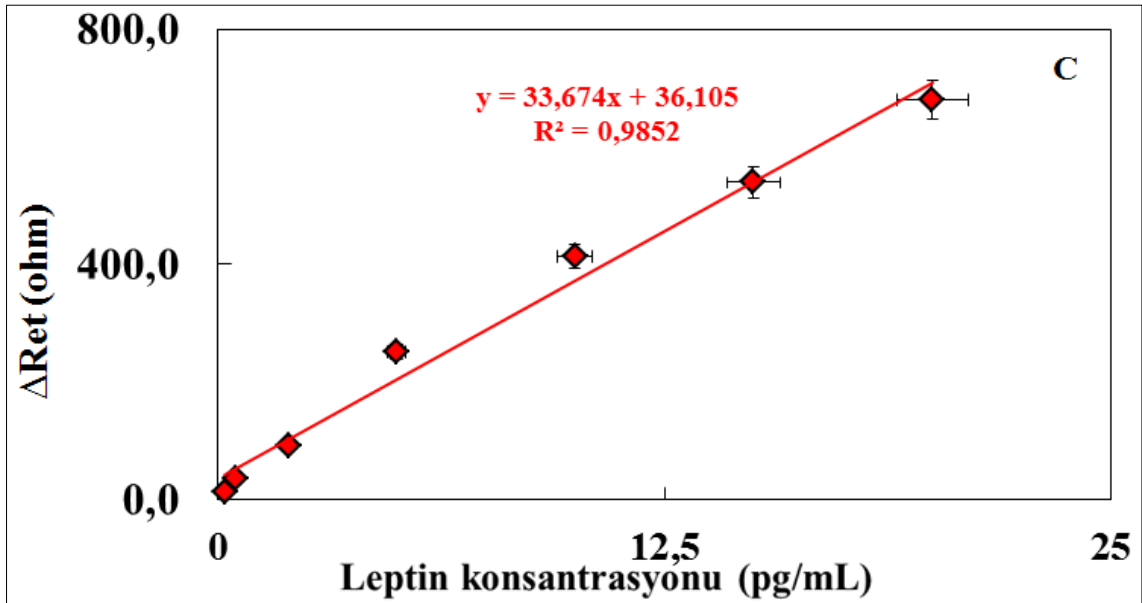
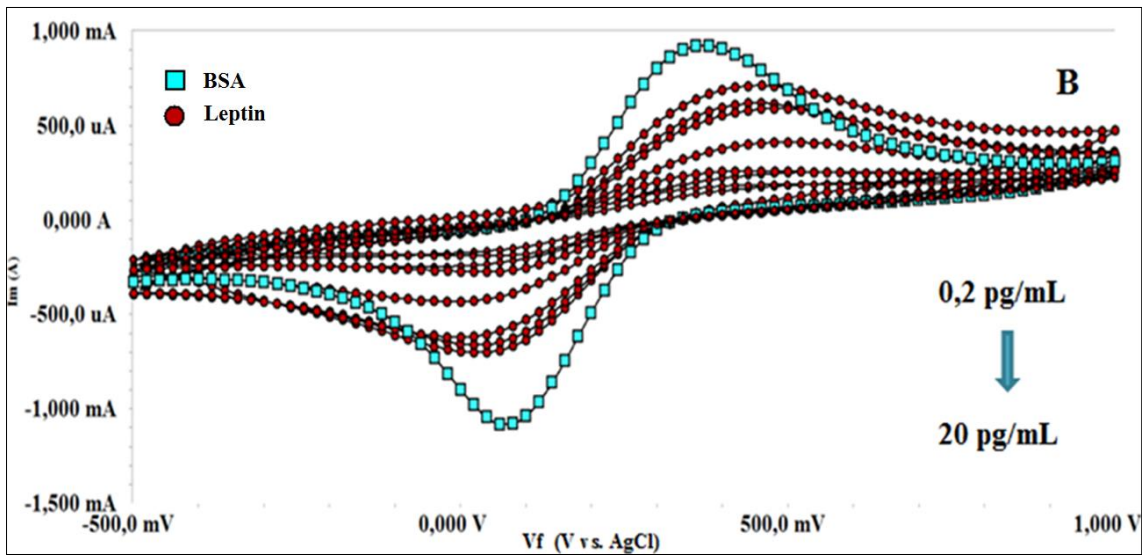
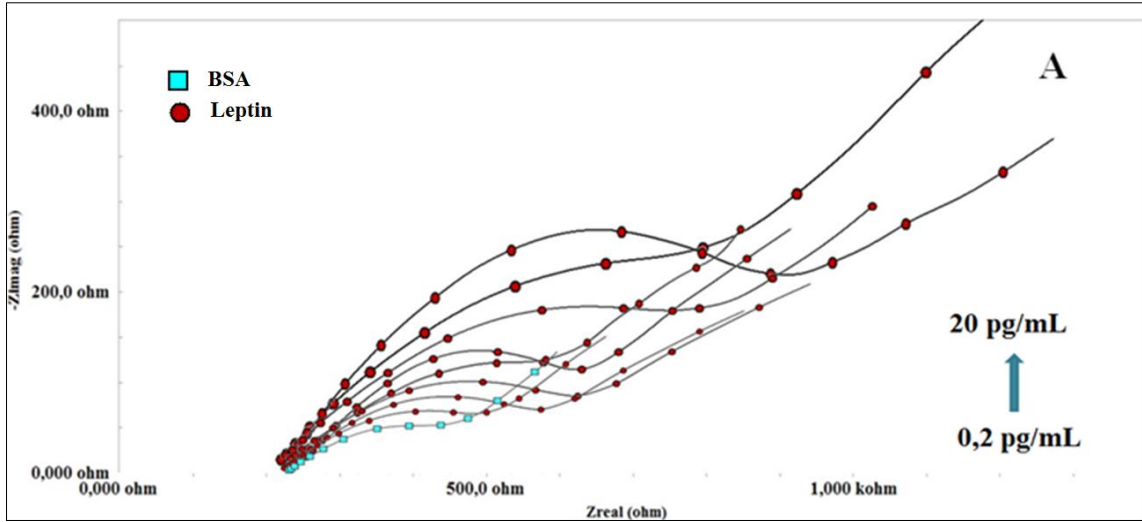
Leptin biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklemden yararlanılarak elde edilmiştir.

$$\Delta Ret = Ret(\text{leptin}) - Ret(\text{BSA})$$

Ret(leptin), anti-leptin ve leptin arasındaki bağlanmadan sonra elektron transfer direncinin değeridir. Ret(BSA), BSA ile bloklanmış biyosensöre ait yük transfer direncidir (Aydın ve ark. 2018).

Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörlerin artan leptin konsantrasyonları ile muamele edilmesiyle elde edilen Nyquist grafikleri ve CV voltamogramları Şekil 4.8.A-B' de gösterilmektedir. Şekilde, Ret değerinin leptin konsantrasyonuna bağımlı olarak değiştiği açıkça görülmektedir. Artan leptin konsantrasyonlarıyla birlikte Ret değerlerinin de artış göstermesi, yüzeyde yalıtkanlığa neden olan biyo-kompleks yapının yoğunlaşması ile açıklanabilir. Şekil 4.8.B incelendiğinde; beklenildiği üzere artan leptin konsantrasyonlarıyla birlikte yüzeyin yalıtkanlığının da artması ve elektron transferinin güçleşmesinden dolayı pik akımlarında giderek azalma görülmüştür. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.8.C), 0,9852 değerinde bir belirleme katsayısı (R^2) ile 0,2 pg/mL' den 20 pg/ mL' ye kadar geniş bir tayin aralığı göstermiştir. LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0,00813 pg/mL ve 0,03 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak, leptin tayini için tasarlanan biyosensörün yüksek hassasiyete sahip olduğu sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 4.5' te artan leptin konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, Rs ve kapasitans değerleri verilmiştir.



Şekil 4. 8. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün artan leptin konsantrasyonlarına verdiği yanıt (A) EIS spektrumları (B) CV voltamogramları (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 4. 5. Artan leptin konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, Rs ve kapasitanstaki değişimler

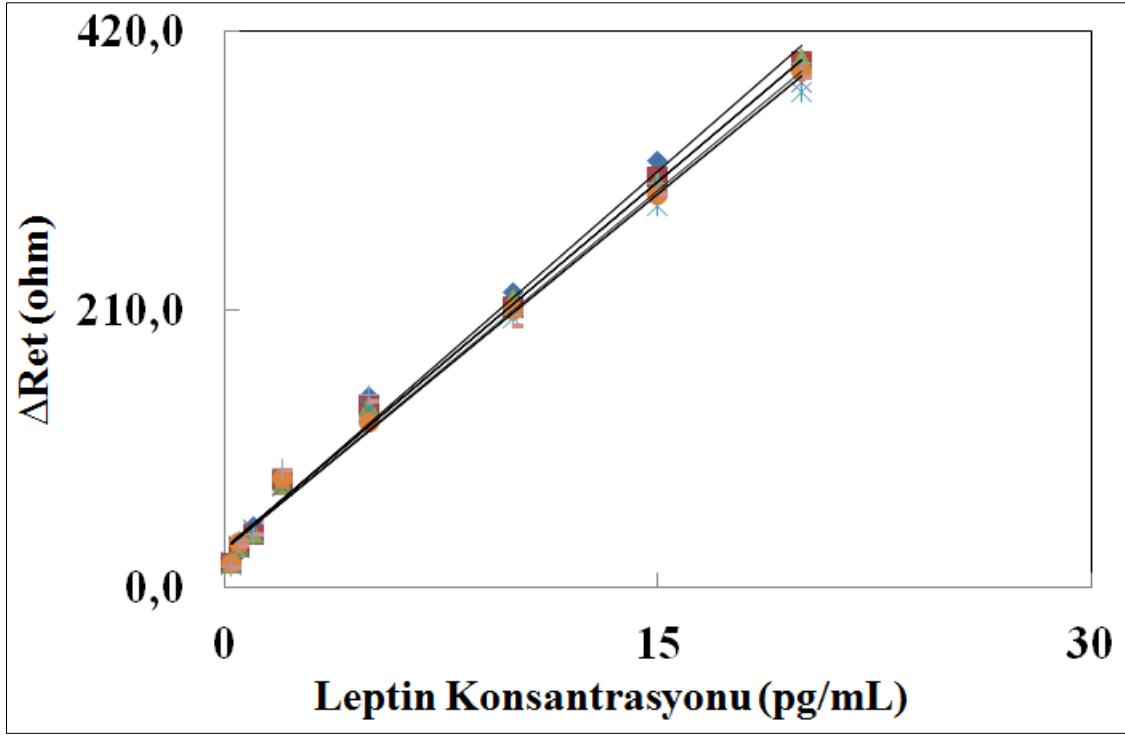
Elektrot	Ret(ohm)	Rs(ohm)	C(μF)
Biyosensör	55,90 \pm 0,7931	40,97 \pm 0,2712	96,28 \pm 2,975
Leptin (0,2 pg/mL)	124,5 \pm 1,680	95,86 \pm 0,623	51,06 \pm 1,607
Leptin (0,5 pg/mL)	111,3 \pm 1,447	83,14 \pm 0,5674	30,48 \pm 0,9484
Leptin (2 pg/mL)	151,2 \pm 2,118	107,6 \pm 0,8097	53,81 \pm 1,647
Leptin (5 pg/mL)	265,9 \pm 3,601	204 \pm 1,438	8,588 \pm 0,2748
Leptin (10 pg/mL)	431,4 \pm 5,095	227,7 \pm 1,558	9,375 \pm 0,2358
Leptin (15 pg/mL)	501,7 \pm 6,194	306,8 \pm 2,224	3,754 \pm 0,1039
Leptin (20 pg/mL)	685,8 \pm 7,950	255,2 \pm 1,765	6,748 \pm 0,1419

4.1.3.2. Leptin biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi, karakterizasyonunun tayini aşamasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, optimum koşullar altında hazırlanan 20 farklı elektrot, aynı konsantrasyonda (10pg/mL) leptin çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği denklemi kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda standart sapma değeri $\pm 0,091245$ pg/mL olarak bulunmuştur. Varyasyon katsayısı ise %0,91'dir. Ortalama değer de 10,00579 pg/mL olarak hesaplanmıştır.

4.1.3.3. Leptin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliği, aynı prosedürle hazırlanan 8 biyosensör sisteminin 0,2 pg/mL-20 pg/mL konsantrasyon aralığındaki leptin tayini için göstermiş olduğu performansın izlenmesi ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.9' da hazırlanan 8 farklı biyosensöre ait kalibrasyon grafikleri görülmektedir. Tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri incelendiğinde; biyosensörlerin 0,2 pg/mL-20 pg/mL konsantrasyon aralığındaki leptine verdiği yanıtlarda hemen hemen aynı denecek şekilde benzerlik ve doğrusallık görülmüştür.



Şekil 4. 9. Leptin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği (n=8)

Çizelge 4.6’ da tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin grafik denklemleri ve R^2 değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 6. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Biyosensör	R^2	y	Lineer Aralık(pg/mL)
1	0,9922	$19,027x+28,631$	0,2 – 20
2	0,994	$18,703x+27,944$	0,2 – 20
3	0,9951	$18,78x+27,366$	0,2 – 20
4	0,9945	$18,096x+28,666$	0,2 – 20
5	0,9921	$17,368x+29,333$	0,2 – 20
6	0,9951	$18,04x+28,961$	0,2 – 20
7	0,9885	$18,358x+30,698$	0,2 – 20
8	0,9876	$17,822x+29,615$	0,2 – 20

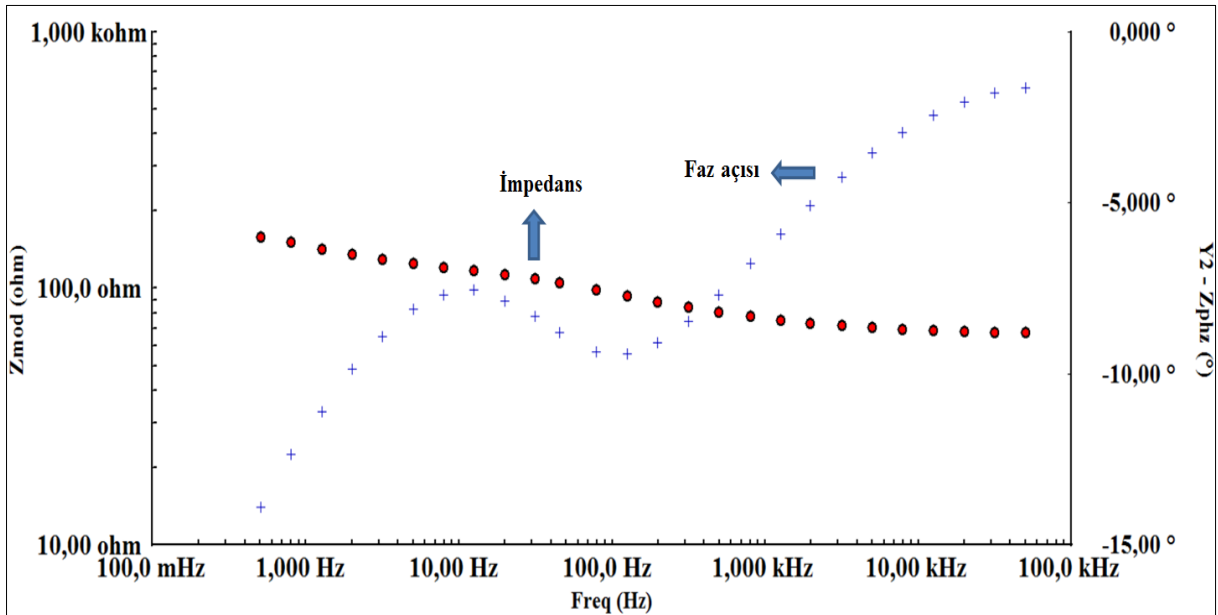
Çizelge 4.6’ da verilen doğru denklemleri kullanılarak, eğim ve intercept verilerine ilişkin bağıl standart sapma (RSD) değerleri sırasıyla % 3,54 ve % 3,02 olarak hesaplanmıştır.

Tekrar üretilebilirlik çalışmaları kapsamında elde edilen veriler yüksek hassasiyet ve güvenilirliğe sahip bir biyosensör tasarlandığını tasdik eder niteliktedir.

4.1.3.4. Leptin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü tekniği ile analizi

Çalışmanın bu aşamasında anti-leptin ve leptin arasındaki etkileşimin karakterizasyonu için sabit frekansta impedans tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ile zamana karşı sabit bir frekansta impedans ölçümü gerçekleştirilir ve bu sayede, tekrarlayan zamanda ve toplam zamanda impedans değişimleri kontrol edilebilmektedir. Ölçümün gerçekleştirilmesi için potansiyostat 10 Hz sabit frekansına ayarlanmış ve 45 dakika boyunca bu sabit frekansta impedans ölçümü zamanın ve faz açısının bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür.

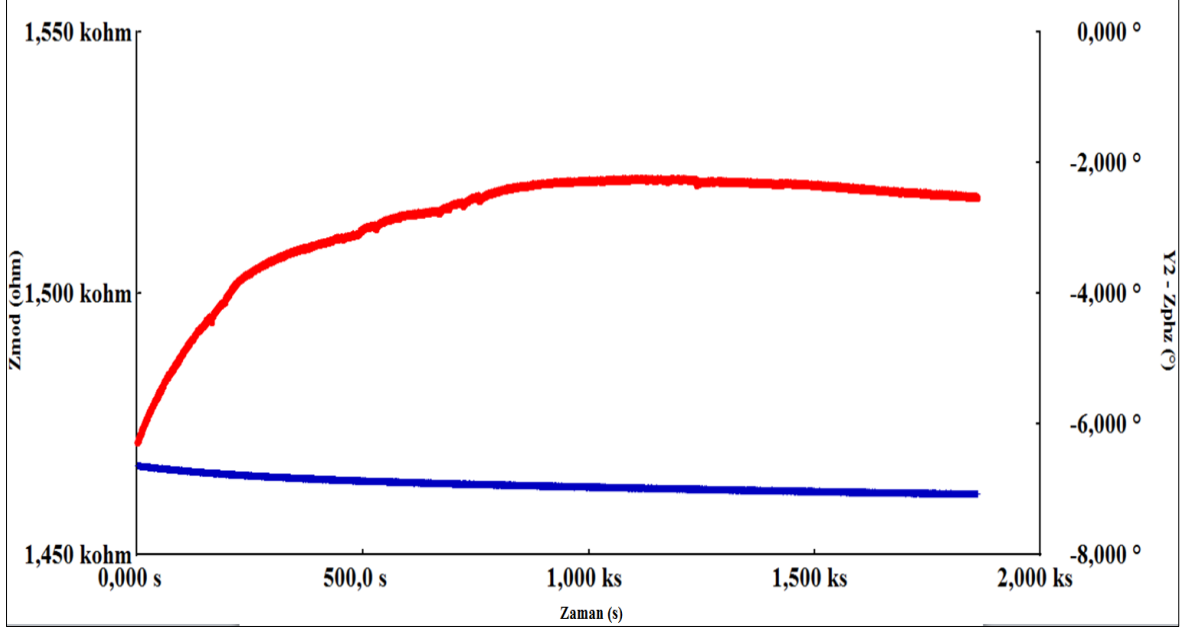
Potansiyostatın ayarlanacağı sabit frekans Şekil 4.10 da verilen biyosensörün BSA adımına ait Bode grafiğinden yararlanılarak seçilmiştir. Bode grafiği biyosensör sisteminin frekansa bağlı impedimetrik davranışının Nyquist grafiğine göre daha kolay tanımlanmasını sağlar. Nyquist grafiğinde frekans değerleri açıkça belirtilmemektedir. Bu nedenle frekans seçimi Bode grafiğinden yola çıkılarak seçilmiştir.



Şekil 4. 10. Leptin biyosensörünün Bode grafiği

Anti-leptin ve leptin etkileşiminin eş zamanlı takibi için sabit frekansta zamana bağlı impedans ölçümleri gerçekleştirilmiş ve impedansta ve faz açısında meydana gelen değişim

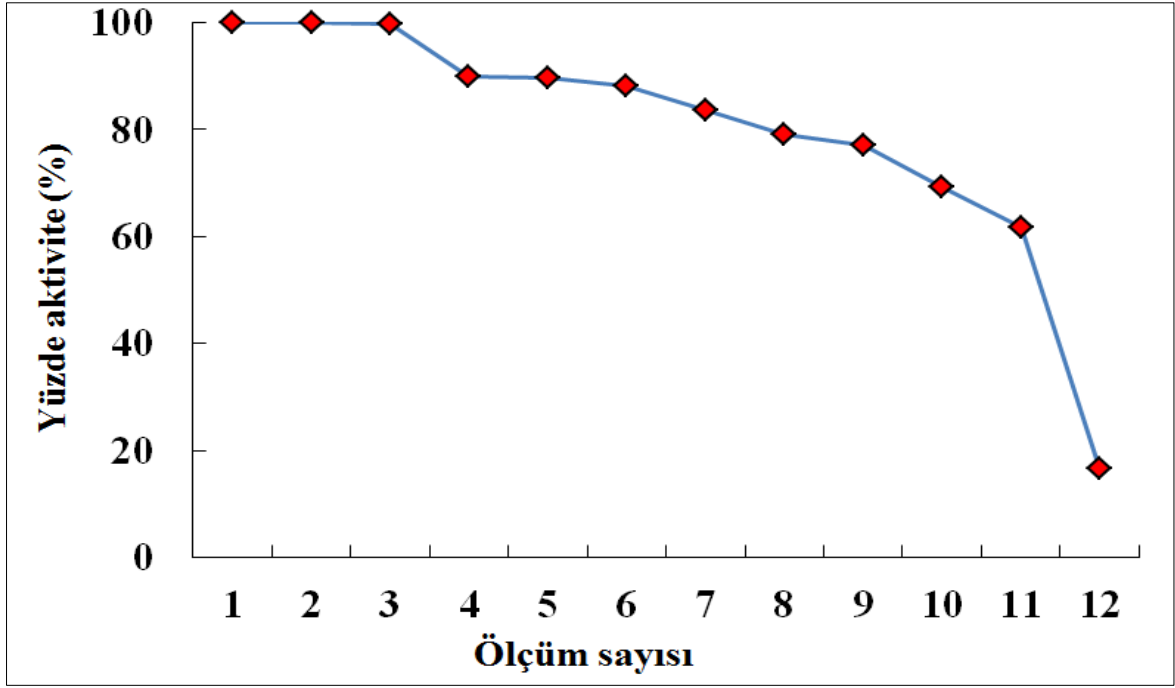
Şekil 4.11’ de gösterilmiştir. Ölçüm sırasında impedans düzenli bir şekilde artmakta ve bu durum anti-leptin ve leptin arasındaki zamana bağlı bağlanmayı göstermektedir. Ancak belli bir süre sonunda impedansın sabitlenmesi leptin doygunluğuna erişildiği için anti-leptin ve leptin etkileşiminin durduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 11. Leptin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü

4.1.3.5. Anti-leptin temelli biyosensörün rejenerasyon çalışmaları

Leptin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirlik kapasitesini belirlemek amacıyla bu karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda hazırlanan elektrotun önce leptin ile inkübasyonu ve daha sonra %0,1 HCl ile bozundurulması prensibinden yola çıkılarak gerçekleştirilen döngü 12 kez tekrarlanabilmiştir. 13. kez asit ile muamele sonrasında elektrot yüzeyi tamamen tahrip olmuş ve artık leptin bağlanabilmesi mümkün olmamıştır. Şekil 4.12’ deki bulgularda elektrotun 3. kez leptin ile muamele edilmesinden sonra biyosensör aktivitesinde % 8 lik bir kayıp gözlenmiş ve 12.rejenerasyon işleminden sonra biyosensör aktivitesinin %16,67’ sini koruduğu kaydedilmiştir.

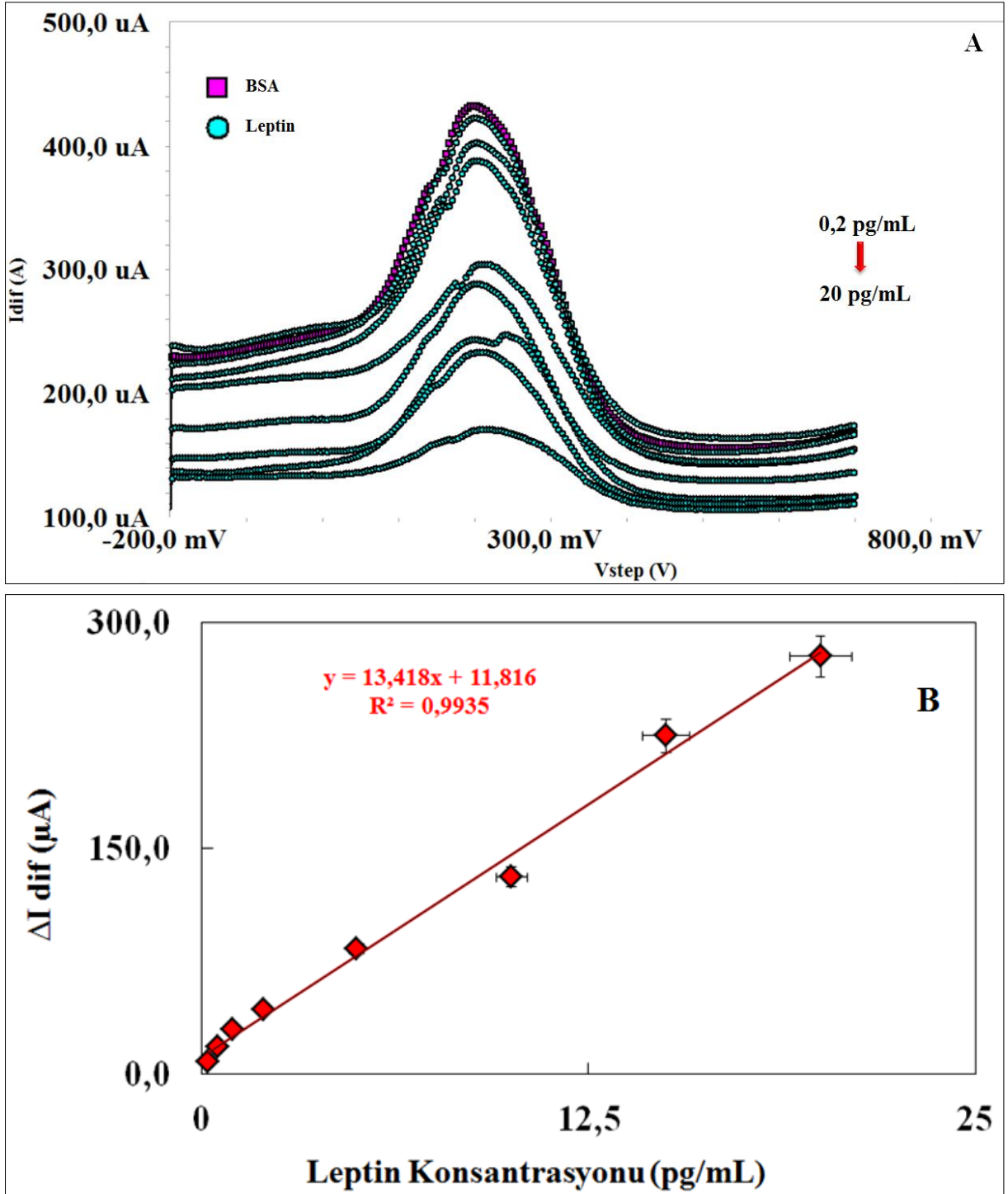


Şekil 4. 12. Leptin biosensörüne ait rejenerasyon çalışmaları

4.1.3.6. Kare dalga voltametri (KDV)

KDV tekniği leptin biosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu için yapılan bir diğer analitik çalışmadır. KDV, sahip olduğu yüksek seçicilik ve duyarlılık sayesinde, biyobelirteçlerin hızlı tespiti için biosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Şekil 4.13.A' da geliştirilen 0,2 pg/mL-20 pg/mL lineer tayin aralığındaki biosensörün KDV voltamogramları, B' de pik akımlarından yararlanılarak çizilen kalibrasyon grafiği görülmektedir. KDV voltamogramlarına bakıldığında; artan leptin konsantrasyonlarıyla pik akımları arasında ters bir oran olduğu gözlenmiştir.

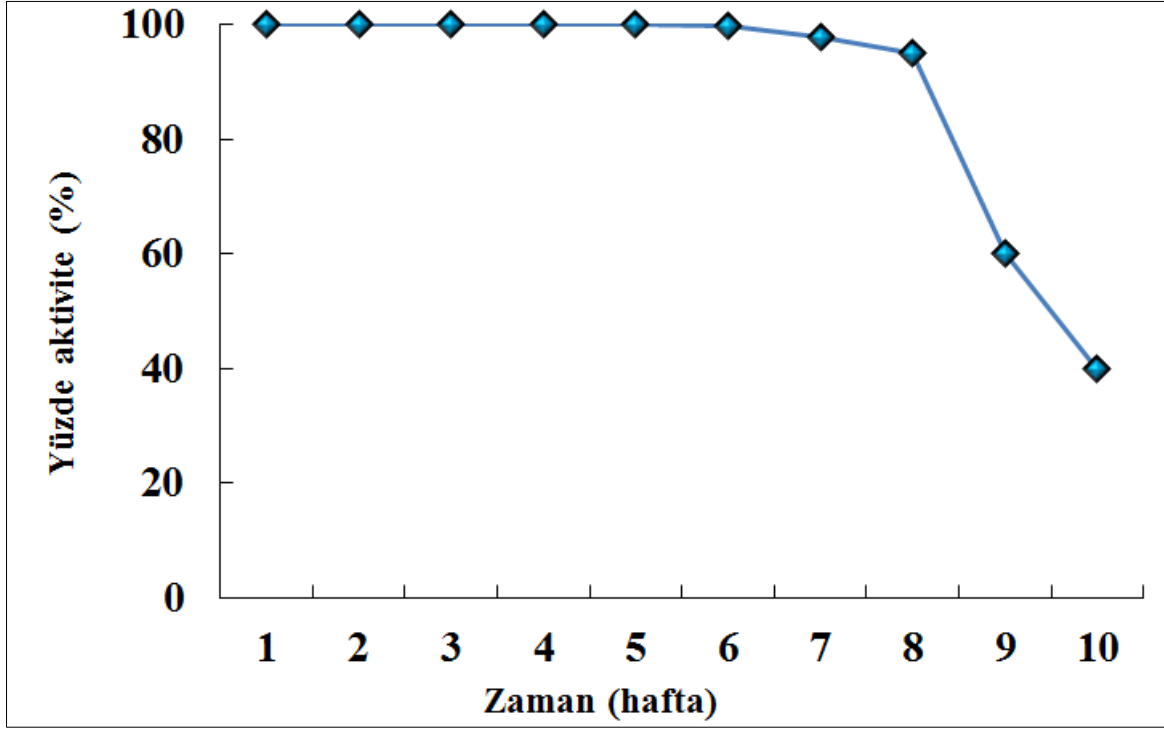


Şekil 4. 13. (A) Leptin biyosensörünün artan leptin konsantrasyonlarına KDV ile verdiği yanıt (B) elde edilen kalibrasyon grafiği

4.1.3.7. Leptin biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi

GP temelli tek kullanımlık biyosensörün depolanma ömrünün saptanması klinik kullanım için önemli ve gerekli bir prosedürdür. Geliştirilen biyosensörün uzun raf ömrüne sahip olması ticari açıdan oldukça büyük bir avantajdır. Çalışmanın bu aşamasında da

geliştirilen biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi için 10 farklı elektrot optimum koşullarda hazırlanmış ve haftalık periyotlarla leptin (10 pg/mL) ölçümü alınmıştır. İlk 8 hafta boyunca biyosensörler aktivitelerinin neredeyse tamamını korumuştur. 9. haftadan itibaren aktivitesinde düşüş gözlenen biyosensörlerin 10 hafta sonunda biyoaktivitelerinin %40' ını koruduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.14).

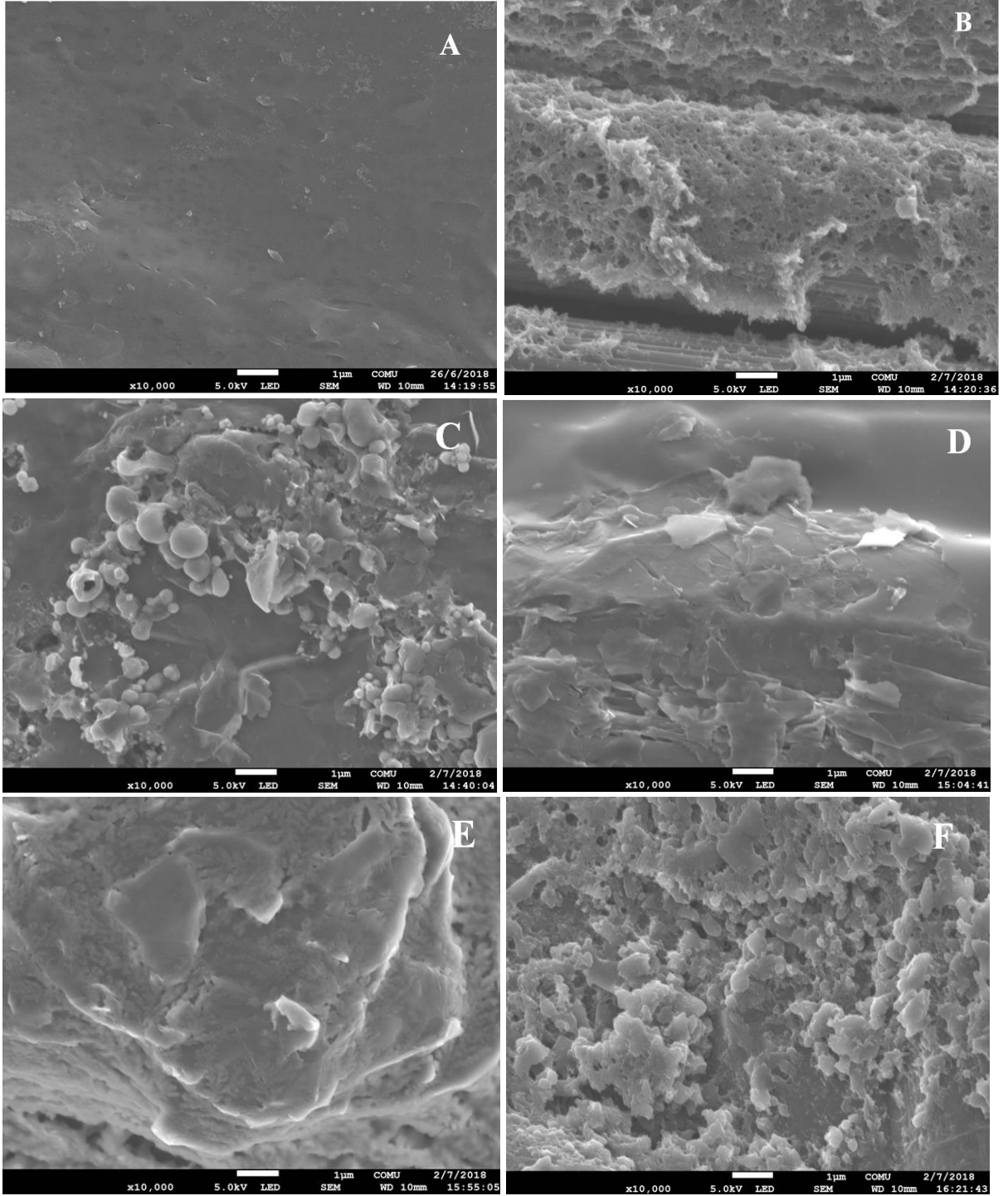


Şekil 4. 14. Leptin biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi

4.1.3.8. SEM cihazı ile leptin biyosensörünün yüzey morfolojisinin görüntülenmesi

Biyosensör yüzeyindeki morfolojik değişimler taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile aşama aşama takip edilebilmektedir. Tasarlanan biyosensörün immobilizasyon adımlarına ilişkin SEM görüntüleri Şekil 4.15' te verilmektedir. Şekil 4.15.A yalın GP elektrot yüzeyine aittir. Yüzey glutamik asit ile elektropolimerize olduğunda Şekil 4.15.B' deki görüntü elde edilmiştir. PGA' ya ait görüntüde yüzeyin belirgin bir morfolojik değişime uğradığı ve yoğun bir tabakanın oluştuğu görülmektedir. EDC/NHS ile karboksil gruplarının aktifleşmesi sonunda Şekil 4.15.C' deki görüntü elde edilmiştir. Anti-leptin ile immobilizasyon işlemiyle birlikte Şekil 4.15.D' deki görüntüde yüzeydeki morfolojik değişim açıkça görülmektedir. Sonrasında sırasıyla BSA ile bloklama (Şekil 4.15.E) ve leptin ile inkübe edilme (Şekil

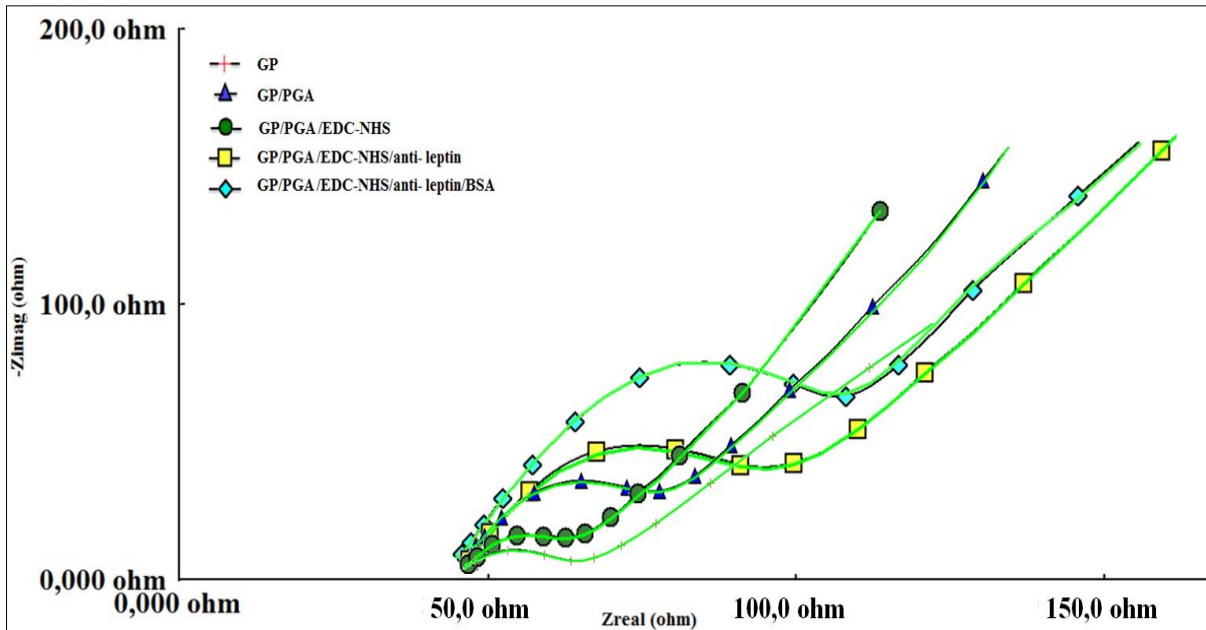
4.15.F) adımlarında elde edilen görüntülerde yüzeyin yoğunluğunun git gide arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 15. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri (A) yalın GP elektrot, (B) PGA, (C) EDC/NHS, (D) anti-leptin, (E) BSA, (F)leptin

4.1.3.9. Leptin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü

Kramers-Kronig dönüşümü, geliştirilen biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kullanılır. Bu yöntem elektrokimyasal impedans spektroskopisinin yorumlanması ve analizi için son derece önemlidir. Kramers Kronig dönüşümünde, impedans verilerinin gerçek kısmı, hayali kısım kullanılarak hesaplanır veya hayali kısım, gerçek kısım kullanılarak hesaplanır. Şekil 4.16’ da gösterilen Kramers Kronig dönüşümleri ile deneysel verilerin örtüşmesi biyosensörün kararlılığını ve doğruluğunu onaylamaktadır. Kramers Kronig dönüşümleri ile deneysel verilerin örtüşmemesi durumunda biyosensörün bazı sapmalardan dolayı doğrusallığının bozulduğu ve kararsız hale geldiği tahmininde bulunulabilir.



Şekil 4. 16. Leptin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü

Çizelge 4.7’de leptin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün immobilizasyon adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 7. Leptin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

Biyosensör adımı	Kramers Kronig dönüşüm değeri
Yalın GP	1,164 u
GP/PGA	3,001 u
GP/ PGA/EDC-NHS	2,479 u
GP/ PGA/EDC-NHS/anti-leptin	700,5 n
GP/PGA/EDC-NHS/anti-leptin/BSA	4,716 u

4.1.3.10. Laviron eşitliği ile leptin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Anti-leptin temelli biyosensörün hazırlanma aşamalarında elektrot yüzeyinin kaplanma ölçüsünün belirlenmesi için Laviron eşitliğinden (**Laviron 1967**) yararlanılmıştır. Laviron eşitliği aşağıda gösterilmektedir.

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4RT} = \frac{nFQv}{4RT}$$

$$Q = n \times F \times A \times \Gamma$$

Q = Yük miktarı (C)

n = 10 farklı tarama hızına (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV/s) ait CV piklerinden elde edilen grafiğin eğimi

F = Faraday sabiti (96485 C/mol)

A = Elektrot alanı (cm²)

Γ = Kaplanan yüzey alanı (mol/cm²)

Bu eşitlik ile gerekli hesaplamaları yapmak için öncelikle biyosensörün 10 farklı hızda CV ölçümleri alınmış ve voltamogramlardan elde edilen gerekli değerler Laviron eşitliğinde yerine konulmuştur. GP/PGA yüzeyi 2,994×10⁻⁸ mol/cm² olarak hesaplanırken anti-leptinin immobilize edilmesiyle bu sayısal değer 5,578×10⁻⁸ e yükselmiştir. Bu sonuç anti-leptinin yüzeye immobilize edildiğine işaret etmektedir.

4.1.3.11. Anti-leptin temelli biyosensörün gerçek serum örneklerine uygulanması

Geliştirilen biyosensörün klinik alanda kullanıma uygunluğunun testi, 5 farklı çocuk serum örneklerinde leptin tayini yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasıyla leptin konsantrasyonu sağlıklı çocuk ve yetişkin birey serumlarında değişkenlik göstermektedir. Çocuklarda bulunan serum leptin içeriği ($6,82 \pm 2,28$ ng/mL) baz alınarak biyosensör tayin aralığına girebilecek şekilde gerekli seyreltmeler yapılmıştır (Kılıç 2004). Daha sonra üretilen biyosensörler ile serum örnekleri standart ekleme tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, bağıl standart sapma ve geri elde gibi analitik hesaplamalar Çizelge 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4. 8. Geliştirilen leptin biyosensörü ile serum örneklerinde bulunan leptin konsantrasyonunun belirlenmesi

Serum örnek numarası	Leptin ölçülen konsantrasyon (pg/mL)	Standart eklenen konsantrasyon (pg/mL)	Ölçülen konsantrasyon (pg/mL, n=3)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	0,68	2	2,8/2,62/2,7	3,33	100,75
		5	5,77/5,66/5,74	0,99	100,7
2	1,89	2	3,93/3,91/3,84	1,21	100
		5	6,86/6,7/6,82	1,23	98,5
3	1,26	2	3,29/3,2/3,25	1,39	99,69
		5	6,24/6,29/6,29	0,46	100,16
4	1,075	2	3,09/3,09/3,06	0,56	100,16
		5	6,03/6,06/6,14	0,94	100,08
5	1,425	2	3,5/3,48/3,39	1,69	101,02
		5	6,41/6,46/6,39	0,56	99,92

Çizelge 4.8 incelendiğinde anti-leptin temelli biyosensörün gerçek serum örneklerinde leptin konsantrasyonunu belirlemede oldukça yüksek hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Biyosensörün çocukluk çağı obezitesiyle ilişkili olduğu düşünülen leptin konsantrasyonuna vermiş olduğu bu yanıt oldukça umut vericidir.

4.1.3.12. Leptin biyosensörünün literatürdeki yeri

Geliştirilen leptin biyosensörünün literatürle karşılaştırılması Çizelge 4.9' da verilmiştir.

Çizelge 4. 9. Literatürde bildirilen çeşitli yöntemlerin geliştirilen leptin biyosensörüyle kıyaslanması

Elektrot Konfigürasyonu	İmmobilizasyon Yöntemi	Ölçüm Yöntemi	Tayin Aralığı	LOD	Referans
GCE	Au- pirol propil asit- polipirol nanokompozit	EIS	10 ng/mL-100000 ng/mL	10 ng/mL	(Chen ve ark. 2010)
ELISA kit (96 kuyucuk)	Algılama sinyalinin yükseltmek için hemin / G-quadruplex DNAzimler	Kemilüminesans immunosensör	10 pg/mL-1000 pg/mL	1,9 pg /mL	(He ve ark. 2013)
Fonksiyonel süper paramanyetik Fe ₃ O ₄ /PD/ Au nanokompozit	Algılama sinyalinin yükseltmek için hemin / G-quadruplex DNAzimler	Optik (sandviç kemilüminesans) immunosensör	1 pg/mL-800 pg/mL	0,3 pg/mL	(He ve ark. 2015)
Silika yüzey çip	Trietoksisilan türevleriyle modifiye	Optik biyosensör	50 ng/mL-100 ng/mL	100 ng/mL	(Tanaka ve ark. 2013)
GP elektrot	PGA ile modifiye	EIS ve CV	0,02 pg/mL-20 pg/mL	0,00813 pg/mL	

Leptinin obezitenin erken teşhisinde potansiyel bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle leptinin yüksek hassasiyette tayin edilebilmesi önemli bir

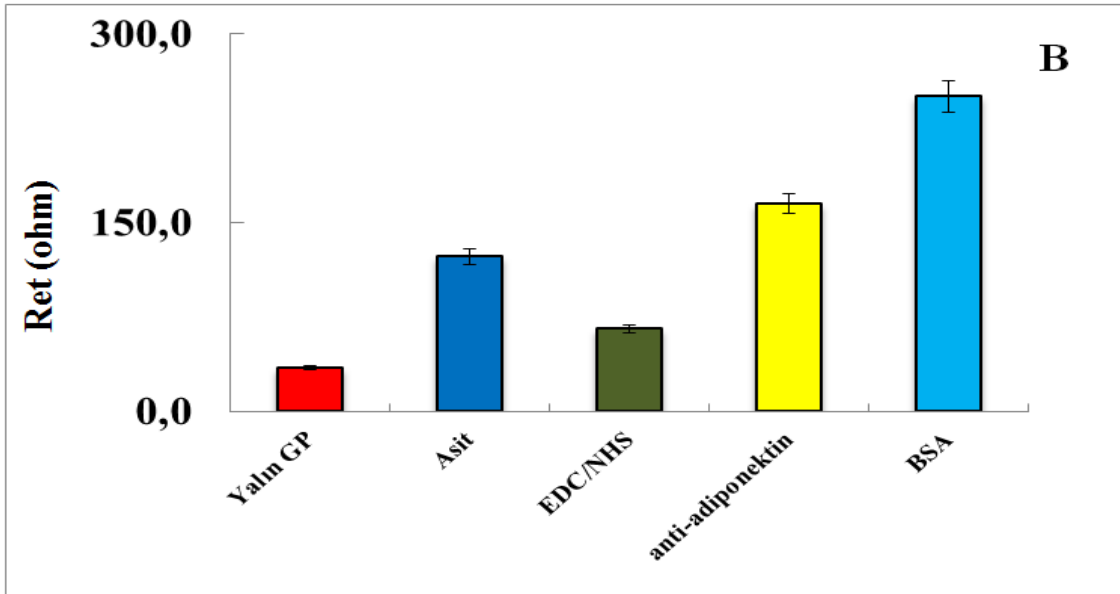
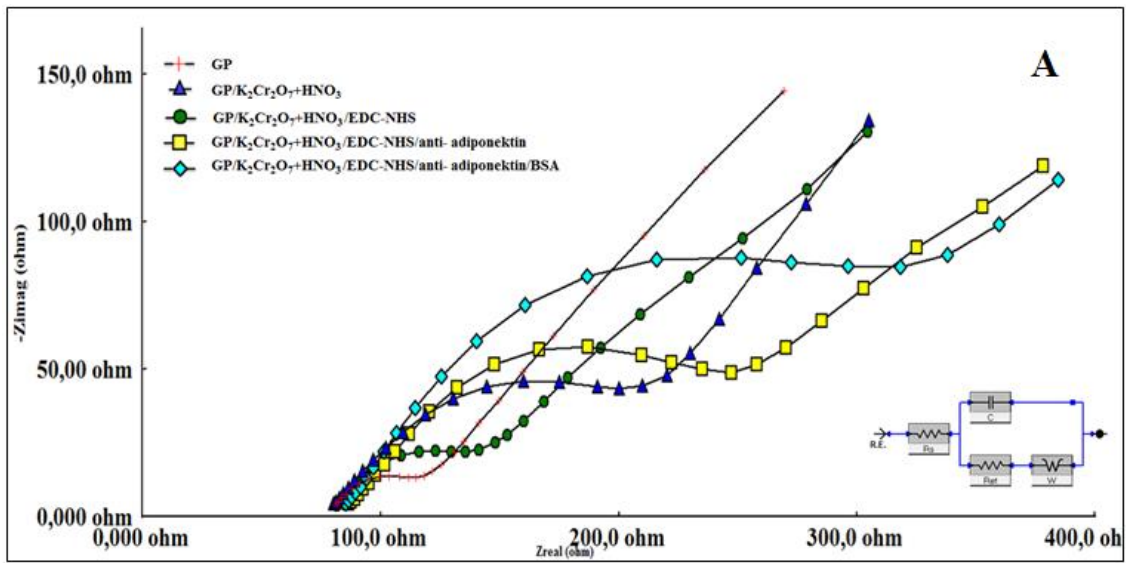
noktadır. Yapılan literatür araştırmalarında ortak amaç geliştirilen biyosensör sistemlerinin leptin için tayin aralığını genişletebilmek ve bu amaçla uygun modifikasyon işlemleri belirlemektir. Çizelge 4.9' da da görüldüğü gibi bu tez çalışmasında geliştirilen GP temelli leptin biyosensörü pikogram düzeylerinde leptin konsantrasyonlarına yanıt verebilmiştir.

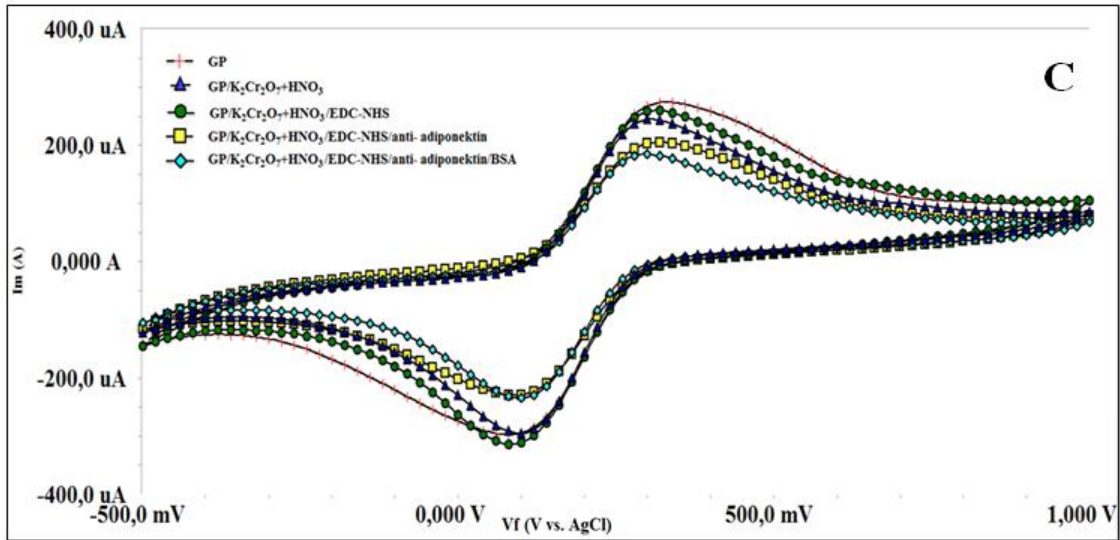
4.2. Adiponektin Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri

4.2.1. Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımları

Adiponektin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün immobilizasyon adımları sırasıyla; temizlik prosedürü, $K_2Cr_2O_7$ ve HNO_3 içeren sulu çözeltiyle inkübe edilerek yüzeyin bozundurulması ve aktifleştirilmesi, EDC/NHS apraz bağlayıcısıyla yüzeyde açığa çıkan karboksil gruplarının aktifleştirilmesi, anti-adiponektin immobilizasyonu ve son olarak BSA ile bloklama. Tüm immobilizasyon basamaklarına ait A) EIS eğrileri B) Ret değerleri ve C) CV voltamogramları Şekil 4.17' de sunulmuştur. Temizlik prosedürü Başlık 4.1.1' de belirtildiği Şekildedir. EIS lm alınarak yüzey temizliğinden emin olunduktan sonra titizlikle yıkanıp kurutulanan biyosensörler $K_2Cr_2O_7$ ve HNO_3 karışımından oluşan çözeltiyle gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Asit zeltisinin, karbon yapılı GP elektrot yüzeyinin aktifliğini sağlayarak karboksil gruplarını açığa çıkarması hedeflenmiştir. EIS ölümlerinin alınmasıyla Ret değerlerinde yalın elektrota göre artış olduğu grlmştir. Negatif karboksil gruplarının oluşturduğu itici güç elektron transferini engellemiş ve bu sebeple Nyquist eğri yarıçapında azalma gözlenmiştir (Ret=122,9 ohm). EDC/NHS ile karboksil gruplarının aktifleştirilmesi ve anti-adiponektinin immobilize olabileceği bir zemin hazırlanmasıyla redoks probunun difüzyonunu engelleyen itici güç azalmış ve Ret değerinde düşüş meydana gelmiştir (65,54 ohm). Anti-adiponektinin amin grupları ile yüzeydeki karboksil gruplarının kovalent etkileşime girmesiyle, anti-adiponektinin yalıtkan özelliğinden dolayı elektron transferi engellenmiş ve neticesinde Nyquist eğri yarıçapında artış gözlenmiştir. Biyosensörlerin immobilizasyon aşamalarında bazen spesifik olmayan bağlanmalar da gerçekleşebilmektedir. Bu olumsuz ve tercih edilmeyen durumun önüne geçebilmek için BSA ajanı kullanılmış ve anti-adiponektinin amin gruplarıyla etkileşememiş aktif karboksil gruplarının bloklanması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında adiponektinin anti-adiponektin ile etkileşme potansiyelini artıran bir zemin hazırlanmıştır. BSA ile bloklama aşamasında yüzey daha önce de belirtildiği gibi daha yalıtkan hale gelmiş ve yük transfer direnci daha da artmıştır.

Tüm immobilizasyon adımlarına ait CV ölçümleri (Şekil 4.17.C) de alınmış ve elde edilen verilerin impedans ölçümlerini tasdiklediği belirlenmiştir. Yüzeyde karboksil gruplarının açığa çıkması direnci artırırken anodik ve katodik pik akımlarında azalmaya sebep olmuştur. Yalın elektrotun katodik pik akımı $273,8 \mu\text{A}$ iken yüzeyin asit ile modifiye edilmesiyle akım $243,2 \mu\text{A}$ ' e düşmüştür. EDC/NHS ile aktifleşen karboksil gruplarına anti-adiponektinin amin gruplarının bağlanması yüzeye elektron geçişini engellemiş ve pik akımlarında düşüş meydana getirmiştir. Son olarak elektrotlar BSA ile inkübe edilmiş ve yüzeyin yalıtkanlığı daha da artmıştır. Bu sebeple redoks probunun yüzeye difüzyonu engellenmiş ve neticesinde pik akımlarında düşüş meydana gelmiştir.



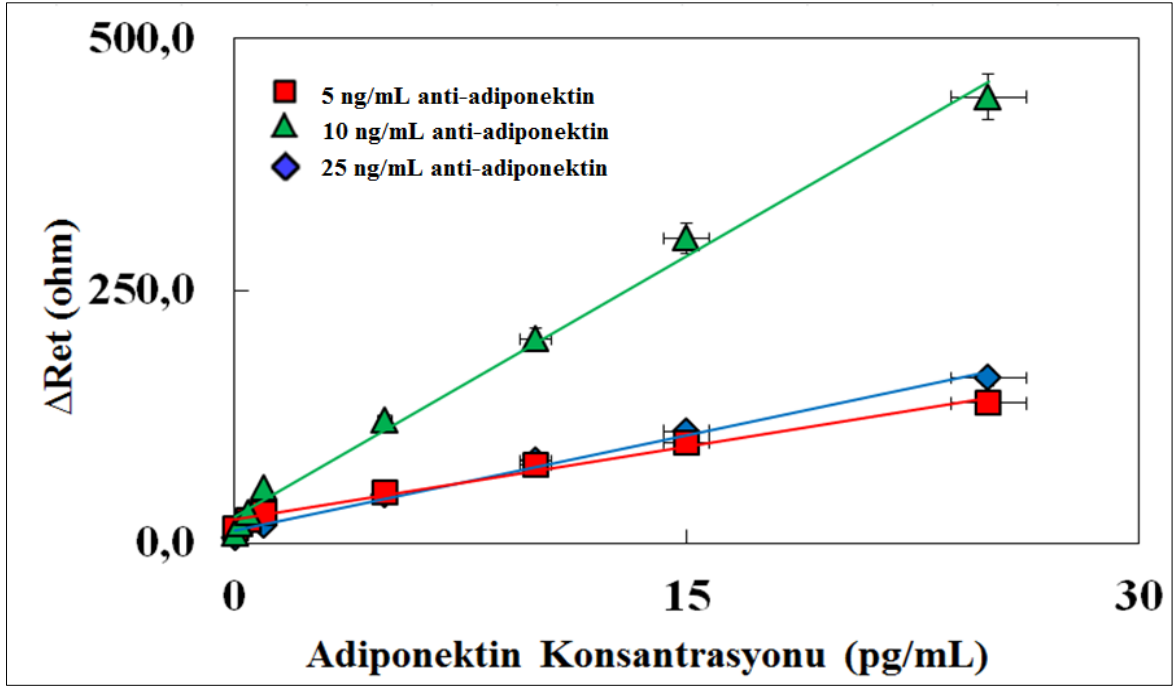


Şekil 4. 17. Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait (A) EIS eğrileri, (B) Ret değerleri ve (C) CV voltamogramları

4.2.2. Adiponektin biyosensörünün optimizasyon çalışmaları

4.2.2.1. Anti-adiponektin konsantrasyon optimizasyonu

Adiponektin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör yüzeyinin $K_2Cr_2O_7$ ve HNO_3 içeren sulu çözeltiyle bozundurulması ve daha sonra yüzeydeki karboksil gruplarının EDC/NHS çifti ile aktifleştirilmesiyle birlikte anti-adiponektinin immobilizasyonu için bir zemin hazırlanmıştır. İmmobilize edilecek olan anti-adiponektin konsantrasyonu biyosensörden alınacak yanıt için optimize edilmesi gereken önemli bir parametredir. Bu sebeple biyosensörler 3 farklı konsantrasyonda anti-adiponektin (5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL) ile inkübe edilmiş ve elde edilen impedans eğrilerinden yararlanılarak Şekil 4.18' de verilen kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir.



Şekil 4. 18. Anti-adiponektin konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi

Şekil 4.18’ de görüldüğü gibi en yüksek sinyaller ve en yüksek R^2 değeri biyosensörün 10 ng/mL anti-adiponektin ile inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Elde edilen regresyon katsayısı değeri ($R^2=0,9932$) biyosensörün yüksek hassasiyetini de göstermektedir. Anti-adiponektin çözeltisinin konsantrasyonu artırıldığında (25 ng/mL) büyük olasılıkla yüzeyde daha karmaşık biyoaktif tabaka oluşmasından dolayı anti-adiponektin/adiponektin etkileşimi güçleşmiştir. Bu durumda da yük transfer direncinde düşüş gözlenmiştir. Anti-adiponektin konsantrasyonunun azaltılmasıyla (5 ng/mL) da yine yük transfer direncinde azalma gözlenmiştir. Anti-adiponektin konsantrasyonunun adiponektin ile etkileşebilmek için yetersiz kaldığı söylenebilir. Bu sebeplerden dolayı sonraki çalışmalar için optimum anti-adiponektin konsantrasyonu 10 ng/mL olarak seçilmiştir.

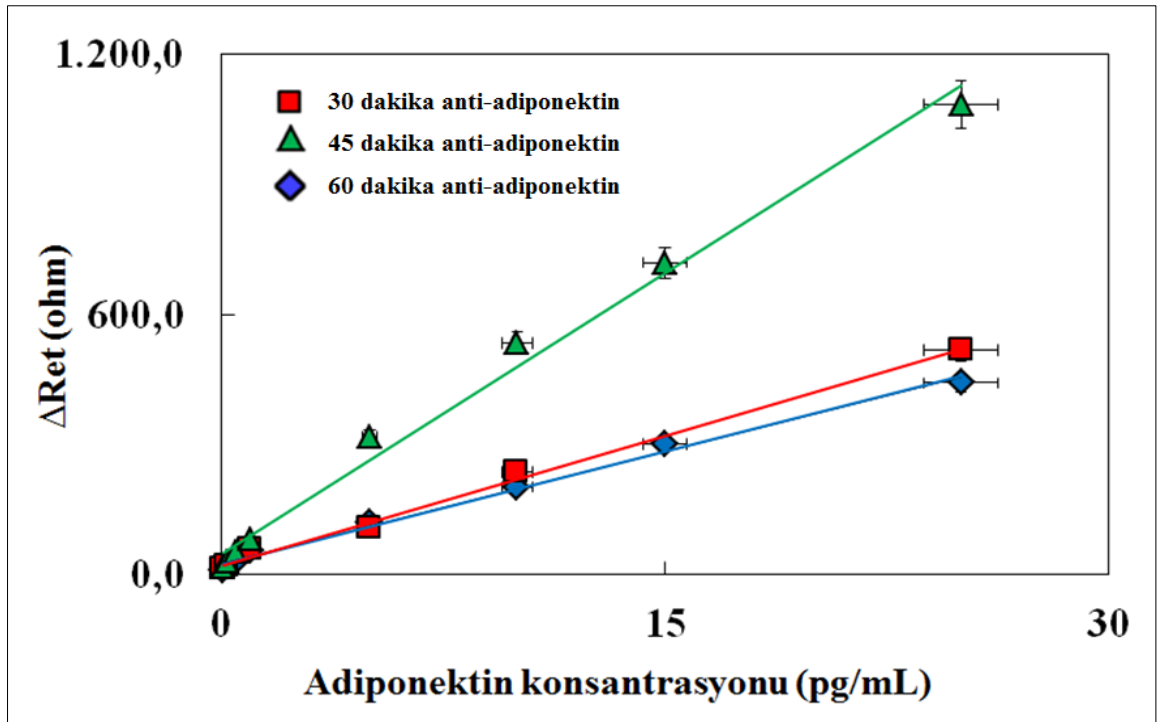
Çizelge 4.10’ da farklı anti-adiponektin konsantrasyonu için çizilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 10. Anti-adiponektin konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
5ng/mL anti-adiponektin	0,9858	$4,8671x+22,781$
10 ng/mL anti-adiponektin	0,9932	$17,277x+25,065$
25ng/mL anti-adiponektin	0,9916	$6,3158x+12,025$

4.2.2.2. Anti-adiponektin süre optimizasyonu

Optimum anti-adiponektin konsantrasyonu belirlendikten sonra anti-adiponektin immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple biyosensörler 3 farklı sürede (30, 45, 60 dakika) 10 ng/mL anti-adiponektin çözeltisiyle inkübe edilmiştir. Bu biyosensörlere ilişkin elde edilen her bir EIS cevapları değerlendirilerek Şekil 4.19' daki kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.



Şekil 4. 19. Anti-adiponektin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Adiponektin tayini için geliştirilen bu biyosensörün anti-adiponektin ile 45 dakika boyunca inkübe edilerek hazırlanmasıyla 30 dakika ve 60 dakika sürelerine göre oldukça belirgin bir sinyal artışı gözlenmiştir. Bu sebeple optimum anti-adiponektin inkübasyon süresi 45 dakika seçilmiştir.

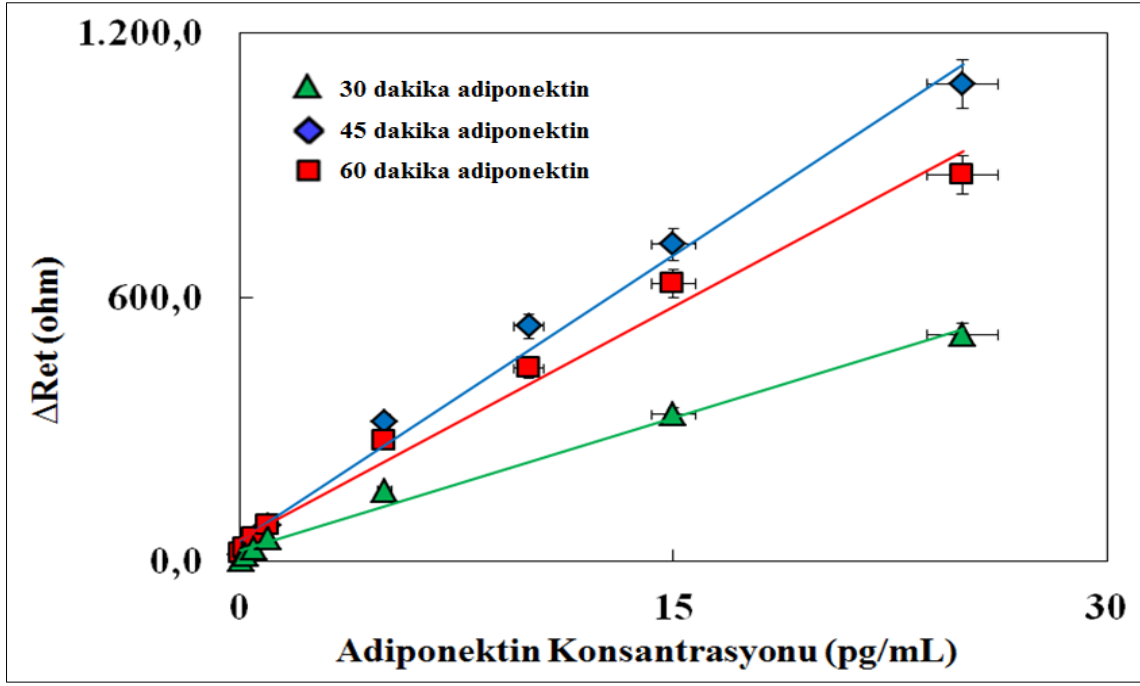
Çizelge 4. 11' de farklı anti-adiponektin inkübasyon süreleri için çizilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 11. Anti-adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
30 dakika anti-adiponektin	0,9962	$19,967x+21,855$
45 dakika anti-adiponektin	0,9902	$43,287x+47,138$
60 dakika anti-adiponektin	0,9932	$17,277x+25,065$

4.2.2.3. Adiponektin inkübasyon süresi optimizasyonu

Son optimizasyon aşaması adiponektin ile anti-adiponektin çözeltisinin en yüksek verimde etkileşebileceği adiponektin inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla, biyosensörler optimum koşullarda hazırlandıktan sonra 3 farklı periyotta adiponektin çözeltileriyle inkübasyona bırakılmış ve impedans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen impedans eğrilerinden yararlanılarak Ret değerleri hesaplanmış ve kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.20) çizilmiştir.



Şekil 4. 20. Adiponektin inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Kalibrasyon grafiklerine bakıldığında 30 dakikalık adiponektin inkübasyon süresinin anti-adiponektin/adiponektin etkileşimi için yetersiz kaldığı ve bu nedenle yük transfer direncinde 45 dakika inkübasyon süresine nazaran düşüş meydana geldiği görülmektedir. Adiponektinin inkübe edilme süresinin 60 dakika olarak denenmesiyle yine sinyallerde düşüş gözlenmiştir. Bu durumun sebebi zaman geçtikçe biyosensör yüzeyinin adiponektin ile doygunluğa ulaşması ve biyosensörün adiponektin tayin kapasitesinin azalması olarak söylenebilir. Bu sebeplerden dolayı optimum adiponektin inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

Çizelge 4. 12' de farklı adiponektin inkübasyon süreleri için çizilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 12. Adiponektinin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
30 dakika adiponektin	0,9906	20,106x+24,058
45 dakika adiponektin	0,9902	43,287x+47,138
60 dakika adiponektin	0,9847	35,236x+50,554

4.2.3. Adiponektin biyosensörünün analitik çalışmaları

4.2.3.1. Adiponektin biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi

Tüm immobilizasyon basamaklarının optimizasyonu sonrasında, biyosensörün yanıt verebildiği adiponektin konsantrasyon aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. Biyosensör artan adiponektin konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

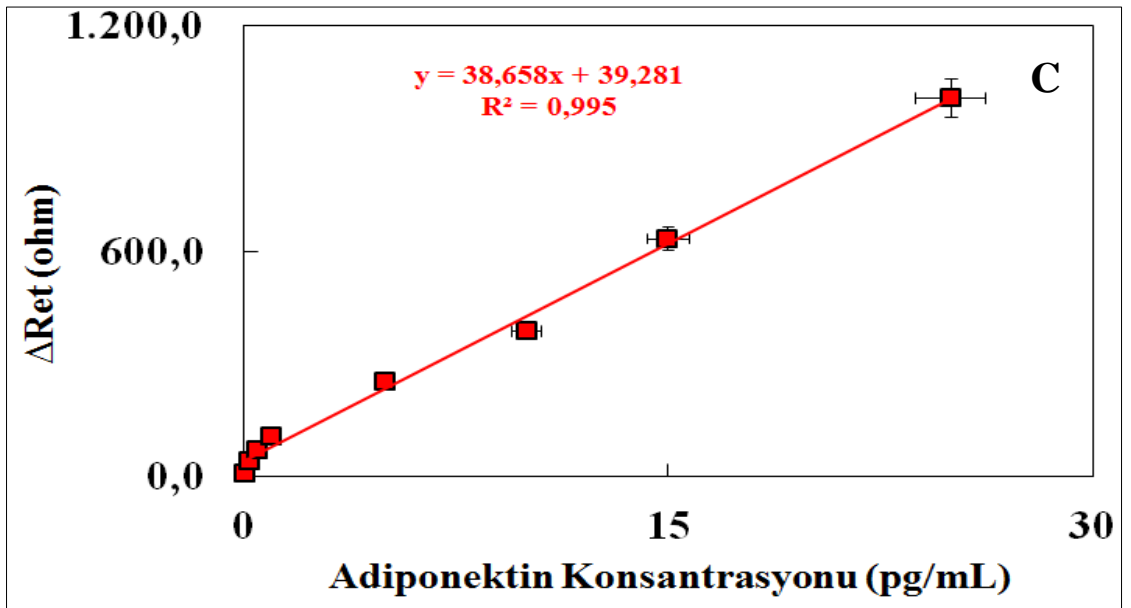
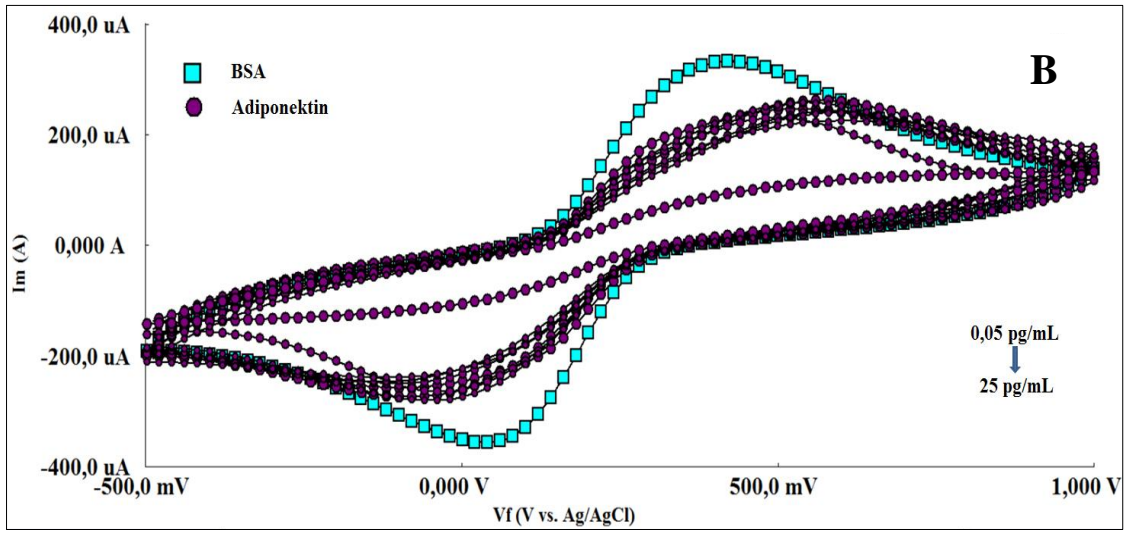
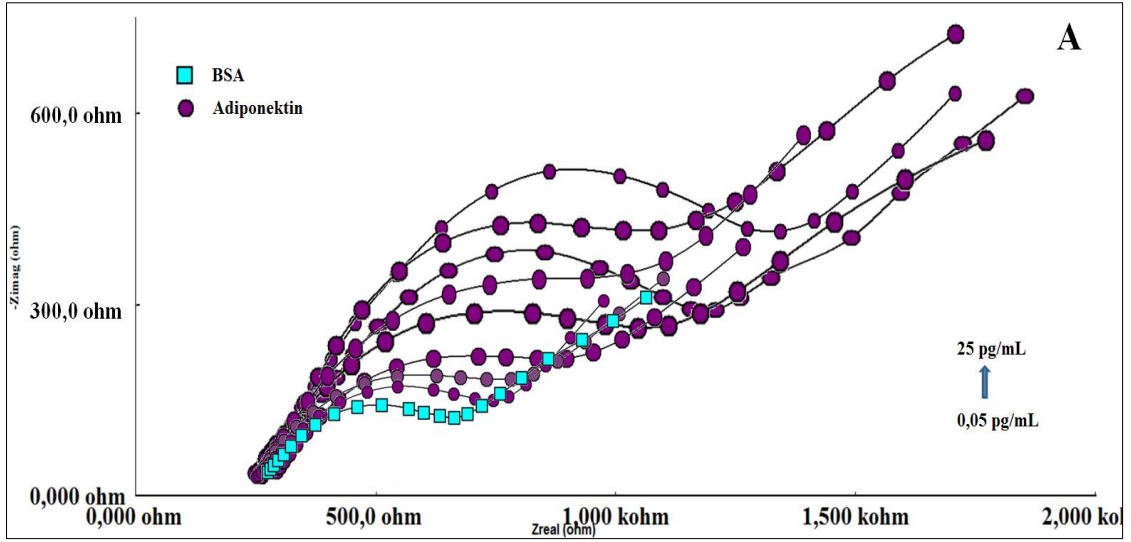
Adiponektin biyosensörünün kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklemden yararlanılarak elde edilmiştir.

$$\Delta Ret = Ret(\text{adiponektin}) - Ret(\text{BSA})$$

Ret(leptin), anti-adiponektin ve adiponektin arasındaki bağlanmadan sonra elektron transfer direncinin değeridir. Ret(BSA), BSA ile bloklanmış biyosensöre ait yük transfer direncidir.

Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörlerin artan adiponektin konsantrasyonları ile inkübasyona bırakılmasıyla elde edilen EIS eğrileri ve CV voltamogramları Şekil 4.21.A-B' de gösterilmektedir. Şekilde, yük transfer direncinin artan adiponektin konsantrasyonuyla paralel olarak arttığı açıkça görülmektedir. Bunun sebebi, biyosensörün artan konsantrasyonda adiponektin çözeltisi ile inkübasyonu yüzeyin yalıtkanlaşması ve dolayısıyla elektron transferinin zorlaşmasıdır. Şekil 4.21.B' de CV voltamogramlarında gözlenen pik akımlarının azalması da yine yüzeyde biyoaktif tabakanın yoğunlaşmasından ötürüdür. EIS spektrumlarından yararlanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.21.C), 0,995 değerinde bir belirleme katsayısı (R^2) ile 0,05 pg/mL' den 25 pg/ mL' ye kadar geniş bir tayin aralığı göstermiştir. LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0,0033 pg/mL ve 0,01 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak, adiponektin tayini için tasarlanan biyosensörün yüksek hassasiyete sahip olduğu yorumu yapılabilir.

Çizelge 4.13' te artan adiponektin konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, R_s ve kapasitans değerleri verilmiştir.



Şekil 4. 21. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün artan adiponektin konsantrasyonlarına verdiği yanıt (A) EIS eğrileri, (B) CV voltamogramları, (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 4. 13. Artan adiponektin konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, Rs ve kapasitanstaki değişiklikler

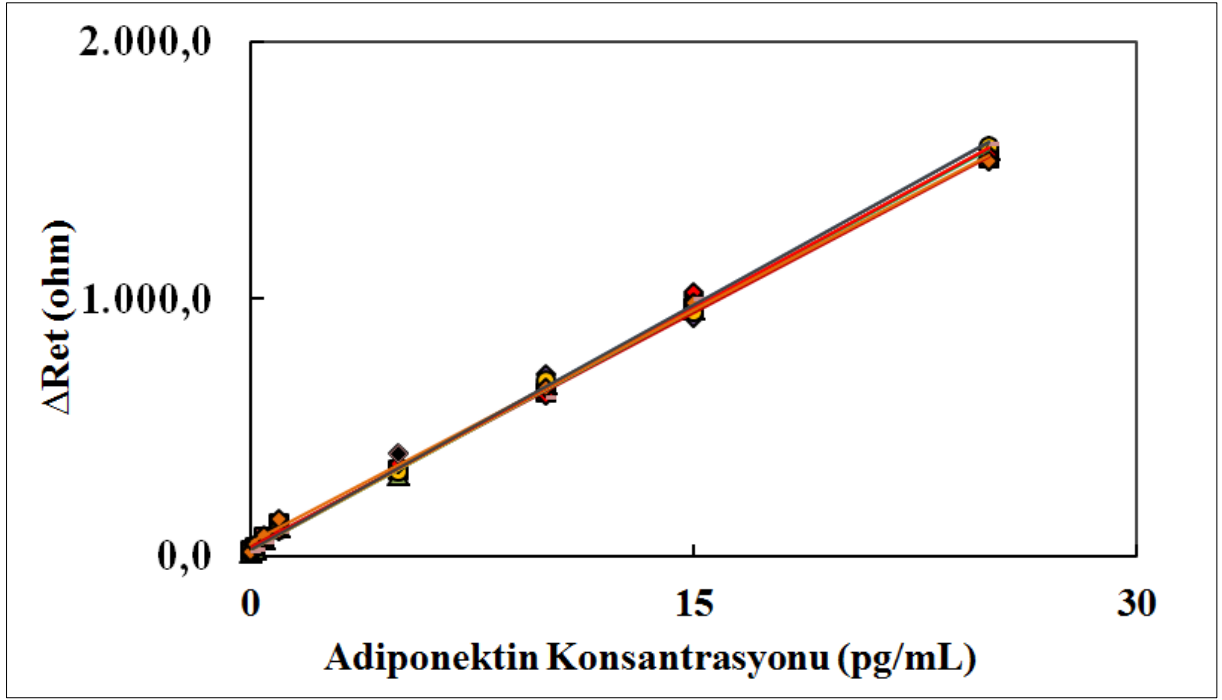
Elektrot	Ret(ohm)	Rs(ohm)	C(μF)
Biyosensör	178,8 \pm 2,121	97,25 \pm 0,7104	10,15 \pm 0,2605
Adiponektin (0,05 pg/mL)	218 \pm 2,406	98,54 \pm 0,7196	9,282 \pm 0,2145
Adiponektin (0,2 pg/mL)	271,6 \pm 2,890	97,12 \pm 0,7113	8,460 \pm 0,1728
Adiponektin (0,5 pg/mL)	309,3 \pm 3,329	114,2 \pm 0,8312	7,796 \pm 0,1617
Adiponektin (1 pg/mL)	344 \pm 3,374	66,33 \pm 0,4842	11,74 \pm 0,1839
Adiponektin (5 pg/mL)	455,9 \pm 4,330	111,3 \pm 0,813	6,769 \pm 0,1154
Adiponektin (10 pg/mL)	581,3 \pm 6,071	207,1 \pm 1,529	3,546 \pm 0,07232
Adiponektin (15 pg/mL)	726,6 \pm 7,870	302,7 \pm 2,326	1,755 \pm 0,03863
Adiponektin (25 pg/mL)	1046 \pm 10,43	300,1 \pm 2,297	1,496 \pm 0,02764

4.2.3.2. Adiponektin biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Hassas bir biyosensörün en önemli ve gerekli özelliklerinden biri tekrarlanabilir olmasıdır. Bu nedenle, geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için optimum koşullar altında hazırlanan 20 farklı elektrot, aynı konsantrasyonda (10pg/mL) adiponektin çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Herbir biyosensörün adiponektin konsantrasyonuna verdiği yanıt EIS ile takip edilmiştir. Kalibrasyon grafiği denklemi kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda standart sapma değeri $\pm 0,042439$ pg/mL, ortalama değer 10,013 pg/mL ve varyasyon katsayısı % 0,42 olarak bulunmuştur.

4.2.3.3. Adiponektin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Anti- adiponektin temelli biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi için aynı prosedürle ancak farklı zamanlarda 8 biyosensör sistemi hazırlanmış ve herbir biyosensör sisteminin 0,05 pg/mL-25 pg/mL konsantrasyon aralığındaki adiponektin çözeltilerine verdiği yanıt incelenmiştir. Şekil 4.22’ de 8 farklı biyosensöre ait kalibrasyon grafikleri görülmektedir. Tekrar üretilebilirlik çalışması kapsamında yük transfer dirençlerinin herbir biyosensörde benzerlik gösterdiği ve grafiklerin belirtilen tayin aralığında doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 22. Adiponektin biyosensörünün tekrar üretilebilirliği (n=8)

Çizelge 4.14' te tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin grafik denklemleri ve R^2 değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 14. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

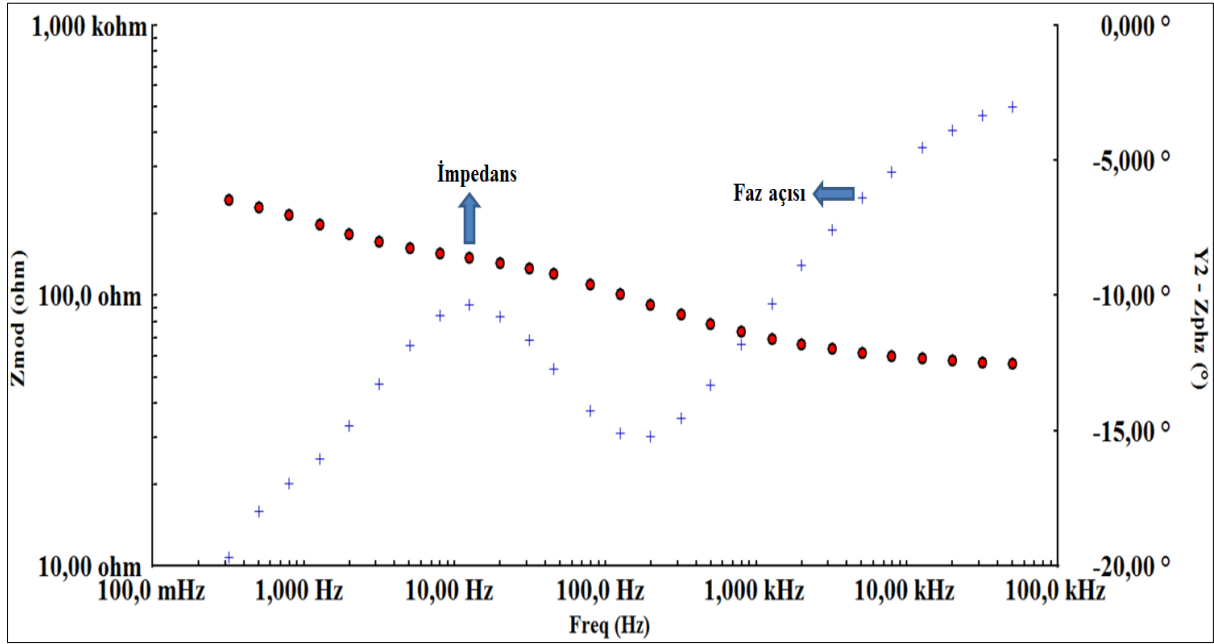
Biyosensör	R^2	Denklem	Lineer Aralık (pg/mL)
1	0,9983	$y = 63,313x+26,456$	0,05 – 25
2	0,9995	$y = 61,147x+27,429$	0,05 – 25
3	0,9992	$y = 62,323x+24,456$	0,05 – 25
4	0,9976	$y = 62,396x+25,847$	0,05 – 25
5	0,9992	$y = 62,473x+26,092$	0,05 – 25
6	0,9974	$y = 62,291x+27,825$	0,05 – 25
7	0,997	$y = 61,336x+29,898$	0,05 – 25
8	0,9976	$y = 63,403x+26,038$	0,05 – 25

Çizelge 4.14' te verilen doğru denklemleri kullanılarak, eğim ve intercept verilerine ilişkin bağıl standart sapma (RSD) değerleri sırasıyla % 1,29 ve % 6,09 olarak hesaplanmıştır.

4.2.3.4. Adiponektin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü tekniği ile analizi

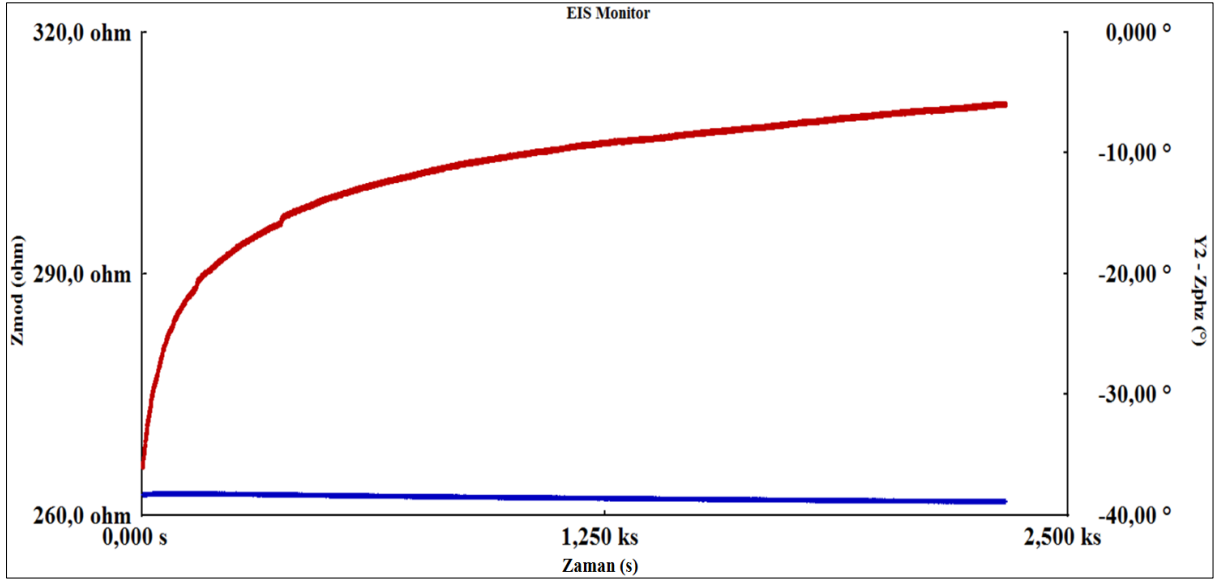
Sabit frekansta impedans ölçümü tekniği antikor / antijen bağlanmasının kinetik davranışının izlenmesi için etkili bir elektrokimyasal yöntemdir. Bu teknik ile zamana karşı sabit bir frekansta impedans ölçümü gerçekleştirilir ve bu sayede, tekrarlayan zamanda ve toplam zamanda impedans değişimleri kontrol edilebilmektedir. Ölçümün gerçekleştirilmesi için potansiyostat 10 Hz sabit frekansına ayarlanmış ve 45 dakika boyunca bu sabit frekansta impedans ölçümü zamanın ve faz açısının bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.23' te impedans ölçümünün gerçekleştirileceği sabit frekansın seçilmesinde başvurulan Bode grafiği verilmiştir.



Şekil 4. 23. Adiponektin biyosensörünün bode eğrileri

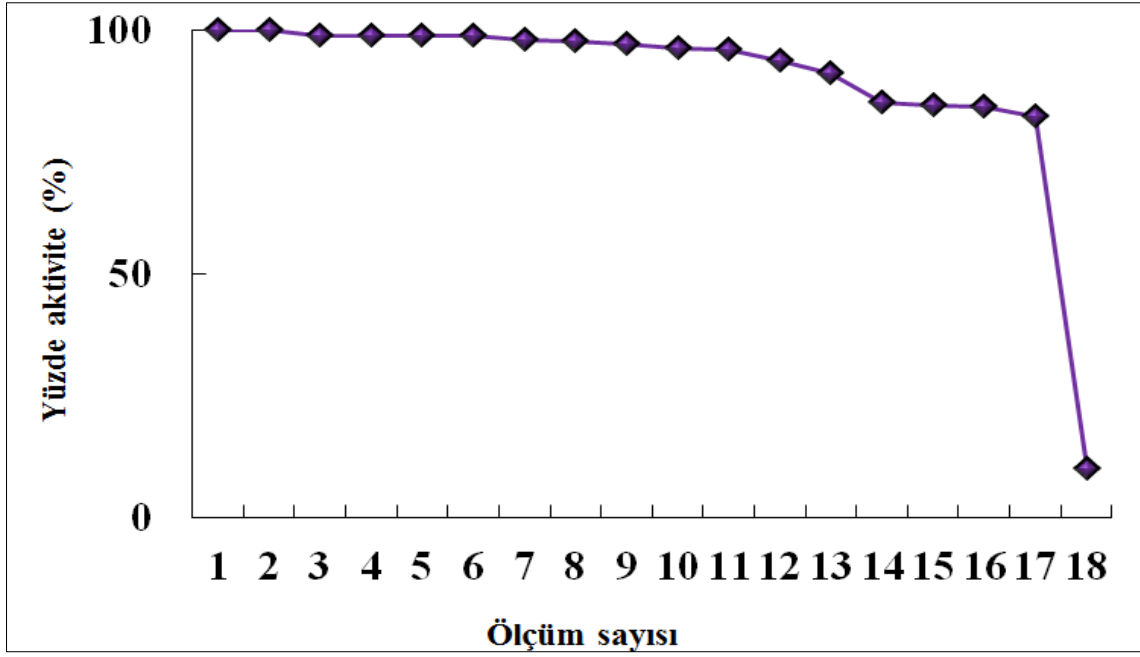
Anti-adiponektin ve adiponektin etkileşiminin takibi için sabit frekansta zamana bağlı impedans ölçümleri gerçekleştirilmiş ve impedansta ve faz açısında meydana gelen değişim Şekil 4.24' te gösterilmiştir. Ölçüm sırasında yaklaşık 2500 saniyeye kadar impedansın artış göstermesi anti-adiponektin ile adiponektin etkileşiminin devam ettiğini göstermektedir. 2500 saniyeden sonra impedansın neredeyse sabitlenmesi adiponektin doygunluğuna erişilmiş olmasındandır.



Şekil 4. 24. Adiponektin biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü

4.2.3.5. Anti-adiponektin temelli biyosensörün rejenerasyon çalışmaları

Tasarlanan biyosensörün yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için, elektrot ilk önce optimum koşullar altında hazırlanmış ve adiponektin proteini ile inkübe edilmiştir. İlk EIS ölçümünden sonra, elektrot, anti-adiponektin ve adiponektin arasındaki hidrojen bağları, Van der Waals gibi zayıf etkileşimleri ortadan kaldırmak için 3 dakika boyunca % 0,1 HCl çözeltisi (10 mM) ile muamele edilmiştir. EIS ölçümü tekrar alınmış ve yük transfer direncinde beklenildiği şekilde azalma görülmüştür. Tekrar adiponektin ile muamele sonrası impedansta artış ve asit ile muamelede impedansta azalma gözlenmiştir. Bu döngü bu şekilde 18 kez tekrarlanabilmiş ve 19. kez asit ile muamele sonucu elektrot yüzeyi tamamen bozulmuş ve biyosensörden yanıt alınamamıştır. 18 kez rejenerasyonu gerçekleştiren adiponektin biyosensörü ilk 17 aşamada aktivitesini büyük oranda korumuştur. 18. rejenerasyon döngüsünde aktivitenin %10' u korunmuştur (Şekil 4.25).

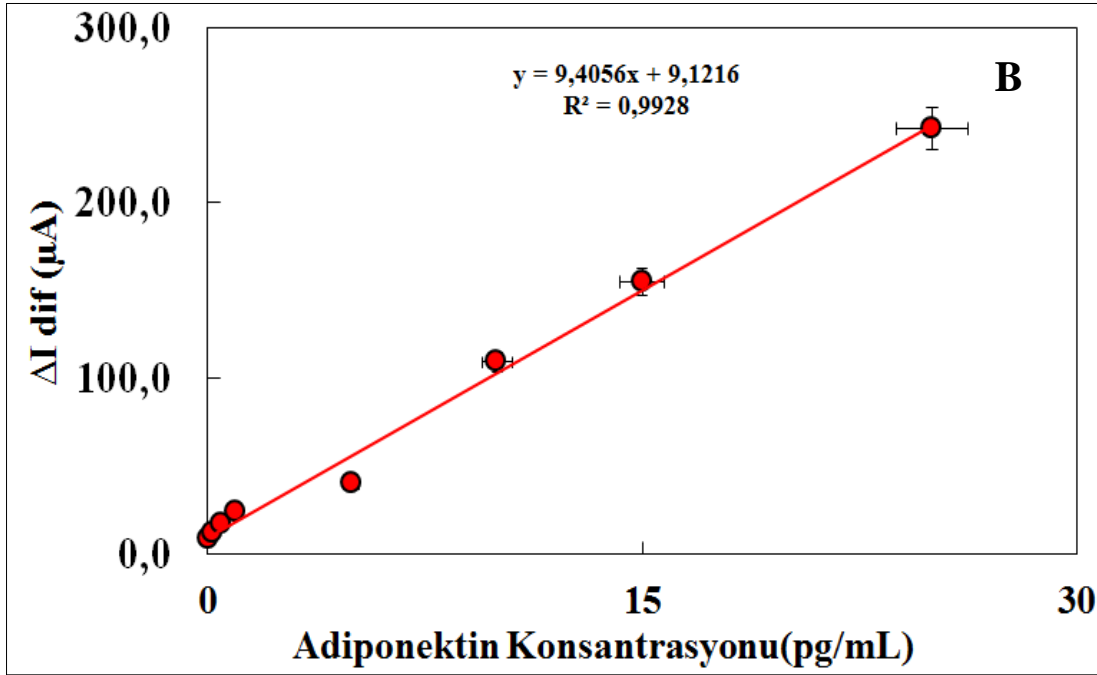
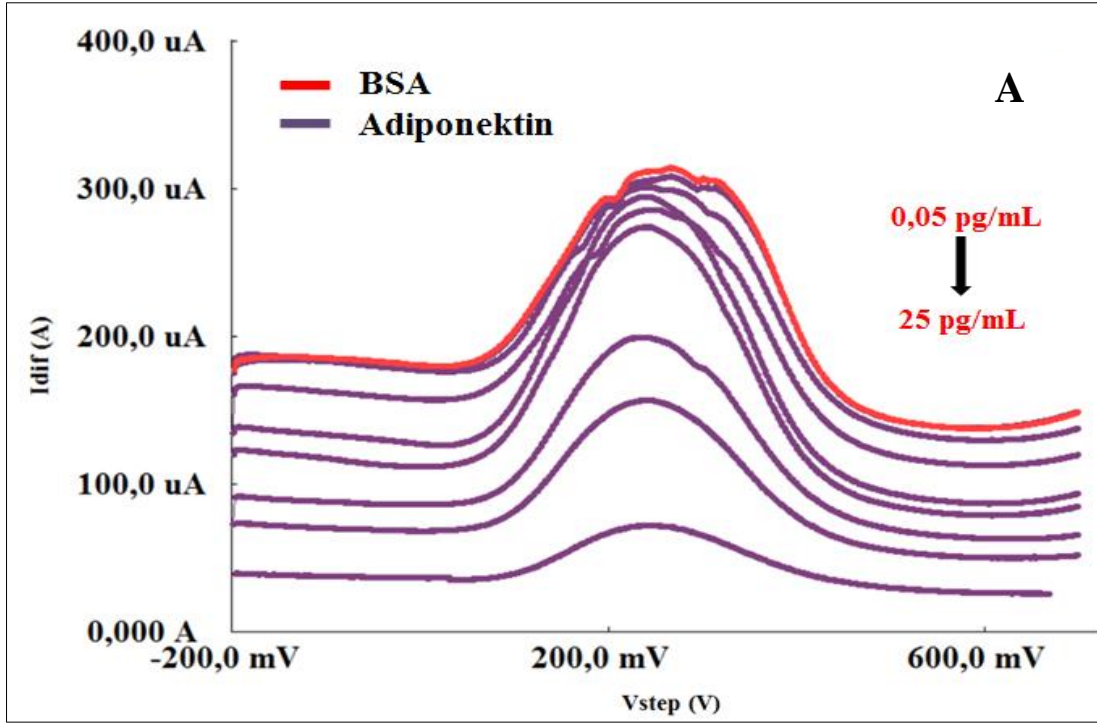


Şekil 4. 25. Adiponektin biyosensörüne ait rejenerasyon çalışmaları

4.2.3.6. Kare dalga voltametri

Adiponektin biyosensörünün hassasiyeti ve elektrokimyasal karakteristiği KDV tekniği ile de araştırılmıştır. KDV tekniği, yüksek seçicilik, duyarlılık, ölçüm süresinin çok kısa olması gibi avantajlara sahiptir.

Şekil 4.26.A' da geliştirilen 0,05 pg/mL-25 pg/mL lineer tayin aralığındaki biyosensörün KDV voltamogramları, B' de pik akımlarından yararlanılarak çizilen kalibrasyon grafiği görülmektedir. KDV voltamogramlarına bakıldığında; adiponektin konsantrasyonunun artmasıyla pik akımlarının azaldığı tespit edilmiştir.

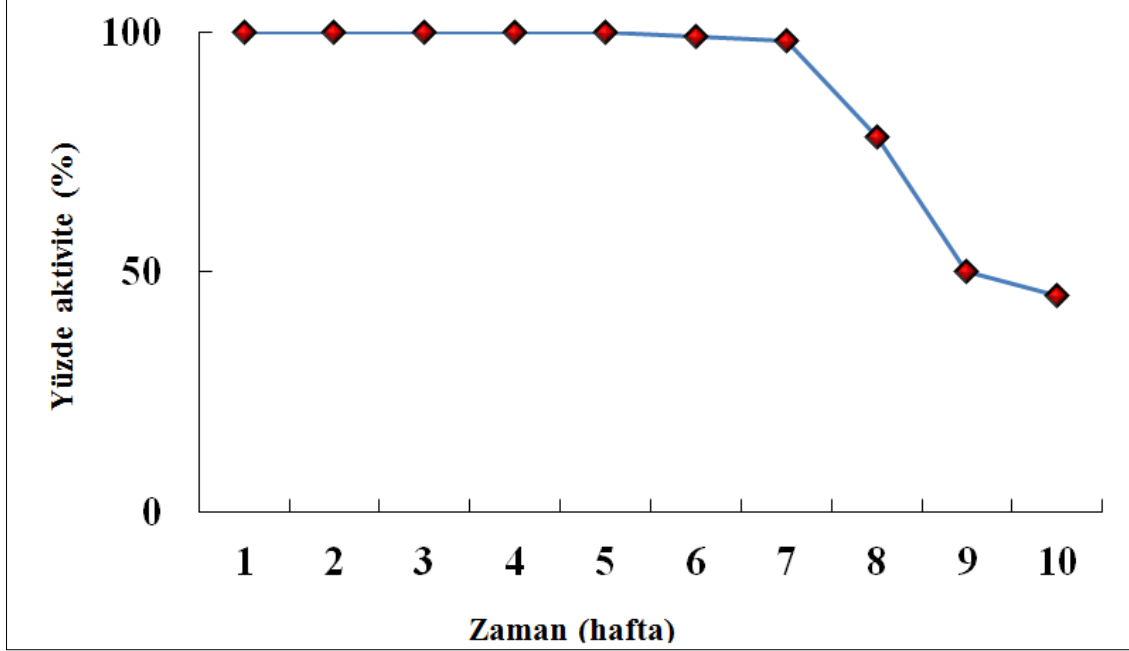


Şekil 4. 26. (A) Adiponektin biyosensörünün artan adiponektin konsantrasyonlarına KDV ile verdiği yanıt ve (B) elde edilen kalibrasyon grafiği

4.2.3.7. Adiponektin biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi

Adiponektin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün depolanma ömrü, haftalık periyotlarla biyosensörün adiponektin konsantrasyonuna (10 pg/mL) karşı impedimetrik yanıtının izlenmesi ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında hazırlanan biyosensörler adiponektin tayini gerçekleştirilene dek + 4 ° C' de saklanmıştır. Şekil 4.27' de görüldüğü

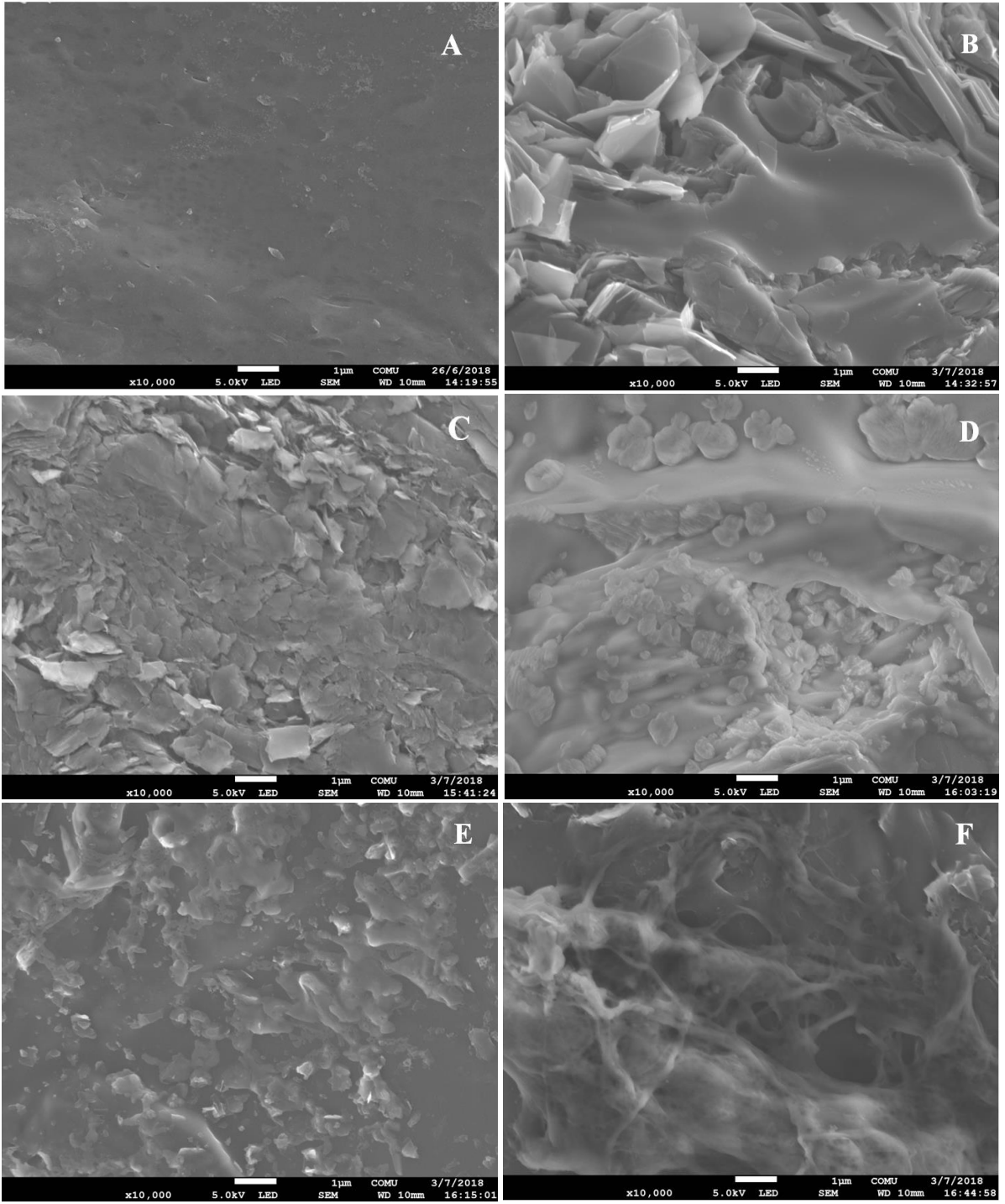
üzere, ilk 7 hafta biyosensör aktivitesinin neredeyse tamamı korunmuştur. 10. hafta sonunda ise biyosensör sinyali %55 oranında azalmıştır.



Şekil 4. 27. Adiponektin biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi

4.2.3.8. SEM cihazı ile adiponektin biyosensörünün yüzey morfolojisinin görüntülenmesi

Geliştirilen biyosensörün tüm immobilizasyon aşamalarının elektrot yüzeyinde meydana getirdiği morfolojik değişimler taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.28’ de verilmektedir. Şekil 4.28.A yalın GP elektrot yüzeyine aittir. Yüzeyde herhangi bir modifikasyon işlemi gerçekleştirilmemiş olmasından dolayı heterojen bir görünüm gözlenmemiştir. Çok belirgin olmamakla birlikte porlu bir görünüm grafit elektrot ile karakterizedir. Yüzeyin $K_2Cr_2O_7$ ve HNO_3 ile bozundurulup karboksil gruplarının açığa çıkarılmasıyla B’deki görünüm elde edilmiştir. EDC/NHS ile karboksil gruplarının aktifleştirilmesinin ardından (C) yüzeye anti-adiponektinin immobilize edilmesiyle (D) birlikte yüzeyde yoğun bir görünüm sergilenmiştir. BSA ile bloklama aşamasında da yine yoğunluk artmış ve son olarak adiponektin ile inkübasyonun gerçekleşmesiyle yüzeyde dallı ve adeta bir örümcek ağı gibi bir görünüm elde edilmiştir.

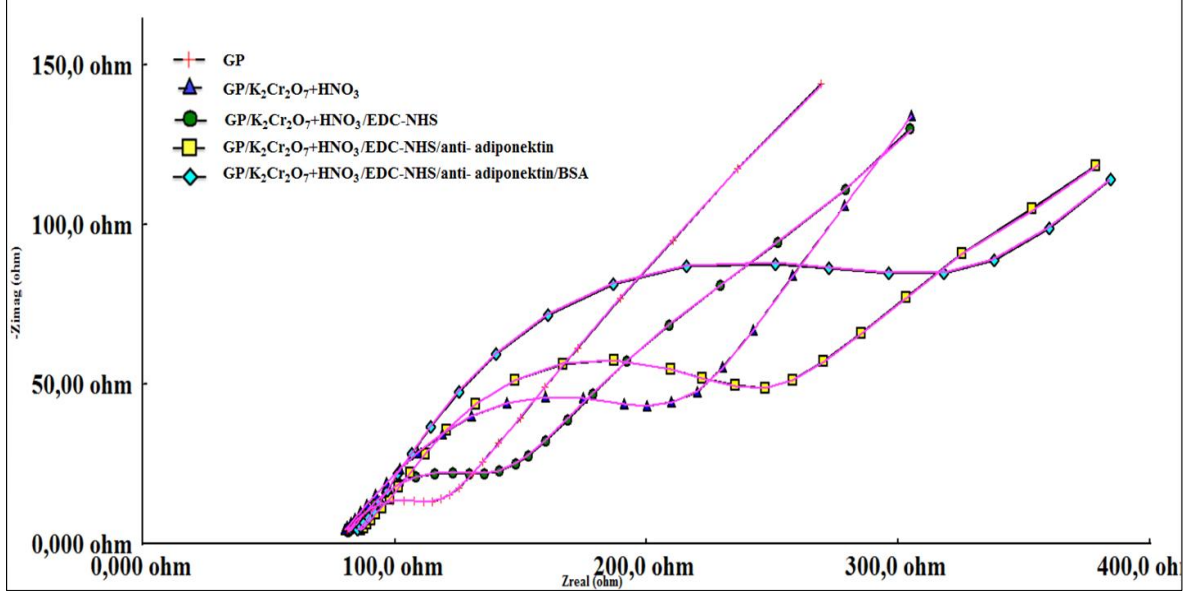


Şekil 4. 28. Adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri (A) yalın GP elektrot, (B) $K_2Cr_2O_7/HNO_3$, (C) EDC/NHS, (D) anti-adiponektin, (E) BSA, (F) adiponektin

4.2.3.9. Adiponektin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü

Geliştirilen adiponektin biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers Kronig dönüşümü kullanılmıştır. Şekil

4.29’da görüldüğü gibi, geliştirilen biyosensörün impedans eğrilerinin Kramers Kronig dönüşümleri ile örtüşmesi biyosensörün kararlılığını ve doğruluğunu onaylamaktadır.



Şekil 4. 29. Adiponektin biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü

Geliştirilen adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ilişkin Kramers Kronig dönüşüm değerleri Çizelge 4.15’ te verilmiştir.

Çizelge 4. 15. Adiponektin biyosensörü hazırlanma aşamalarına ilişkin Kramers-Kronig dönüşümleri

Biyosensör adımı	Kramers Kronig dönüşüm değeri
Yalın GP	1,147 u
GP/K ₂ Cr ₂ O ₇ +HNO ₃	4,767 u
GP/ K ₂ Cr ₂ O ₇ +HNO ₃ /EDC-NHS	1,481 u
GP/ K ₂ Cr ₂ O ₇ +HNO ₃ /EDC-NHS/anti-adiponektin	1,123 u
GP/PGA/EDC-NHS/anti-adiponektin/BSA	2,633 u

4.2.3.10. Laviron eşitliği ile adiponektin biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Başlık 4.1.3.10 de formülü verilmiş olan Laviron eşitliğinden yararlanılarak adiponektin biyosensörünün immobilizasyon adımlarında yüzeyinin ne oranda kaplandığı hesaplanmıştır.

10 farklı hızda alınan CV ölçüleriyle elde edilen gerekli değerler Laviron eşitliğinde yerine konulmuş ve yapılan hesaplamalar sonucu GP/K₂Cr₂O₇-HNO₃ yüzeyi 2,168×10⁻⁸ mol/cm² olarak bulunurken anti-adiponektinin immobilize edilmesiyle bu sayısal değer 5,474×10⁻⁸ e yükselmiştir. Bu sonuç anti-adiponektinin yüzeye immobilize edildiğine işaret etmektedir.

4.2.3.11. Anti-adiponektin temelli biyosensörün gerçek serum örneklerine uygulanması

Geliştirilen biyosensörün gerçek serum örneklerine de cevap verebilme potansiyelinin tespit edilebilmesi için 5 farklı çocuk serum örnekleri ile çalışılmıştır. Elde edilen veriler, bağıl standart sapma ve geri elde gibi analitik hesaplamalar Çizelge 4.16' da verilmiştir.

Çizelge 4. 16. Geliştirilen adiponektin biyosensörü ile serum örneklerinde bulunan adiponektin konsantrasyonunun belirlenmesi

Serum örnek numarası	Adiponektin ölçülen konsantrasyon (pg/mL)	Standart eklenen konsantrasyon (pg/mL)	Ölçülen konsantrasyon (pg/mL, n=3)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	0,82	1	1,79/1,8/1,79	0,32	98,35
		5	5,96/5,81/5,78	1,65	100,5
2	0,56	1	1,59/1,6/1,57	0,96	101,9
		5	5,54/5,45/5,44	1	98,56
3	1,6	1	2,82/2,6/2,7	4,08	103,8
		5	6,53/6,62/6,67	1,07	100
4	0,83	1	1,83/1,9/1,84	2,04	101,64
		5	5,86/5,89/5,77	1,07	100,17
5	1,02	1	2,03/1,96/2	1,76	98,5
		5	6/5,96/5,97	0,35	99,34

Yapılan literatür araştırmasıyla çocuk serumunda adiponektin konsantrasyon aralığı $10,2 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (**Asayama 2003**) ve serum örnekleri biyosensörün tayin aralığına girebilmesi için uygun katsayılarla seyreltilmiştir. Üretilen biyosensörler ile serum örneklerinde adiponektin konsantrasyonunun belirlenmesi standart ekleme tekniği kullanılarak sağlanmıştır (Çizelge 4.16).

Geliştirilen biyosensörlerin 5 farklı serum örneğinde adiponektin tayinine verdiği hata payı çok düşük yanıtlar klinik kullanım için uyarlanabilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir.

4.2.3.12. Adiponektin biyosensörünün literatürdeki yeri

Geliştirilen adiponektin biyosensörünün literatürle karşılaştırılması Çizelge 4.17' de verilmiştir.

Adiponektin obezitenin erken tanısında potansiyel bir biyobelirteç olma açısından önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle adiponektinin hassas metotlarla tayin edilebilmesi önemli bir noktadır. Yapılan literatür araştırmalarında, adiponektin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörlerin sayısının oldukça az olduğu tespit edilmiştir. Çizelge de görüldüğü gibi bu tez çalışmasında geliştirilen GP temelli adiponektin biyosensörü daha geniş tayin aralığına sahiptir ve pikogram ve femtogram düzeylerinde adiponektin konsantrasyonlarına yanıt verebilmiştir.

Bu sonuçlar, bu çalışmada geliştirilen biyosensörü literatürde sunulan çalışmalardan üstün kılmaktadır.

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

Elektrot Konfigurasyonu	İmmobilizasyon Yöntemi	Ölçüm Yöntemi	Tayin Aralığı	LOD	Referans
SP Elektrot	rGO-karboksi metil selüloz hibridi	EIS	0,5 µg/mL-10 µg/mL	61 ng/mL	(Arena ve ark. 2016)
Au elektrot	3-MPA ile SAM oluşturma	EIS ve CV	0,025 µmol/L-0,75 µmol/L	7 ng/mL	(Brazaca ve ark. 2016)
SPE elektrot	MWCNT ile modifikasyon	CV	0,05 µg/mL-10 µg/mL	14,5 ng/mL	(Ojeda ve ark. 2015)
GP elektrot	K ₂ Cr ₂ O ₇ ve HNO ₃ ile modifiye	EIS ve CV	0,05 pg/mL-25 pg/mL	0,0033 pg/mL	

4.3. Nöropeptit Y Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemleri

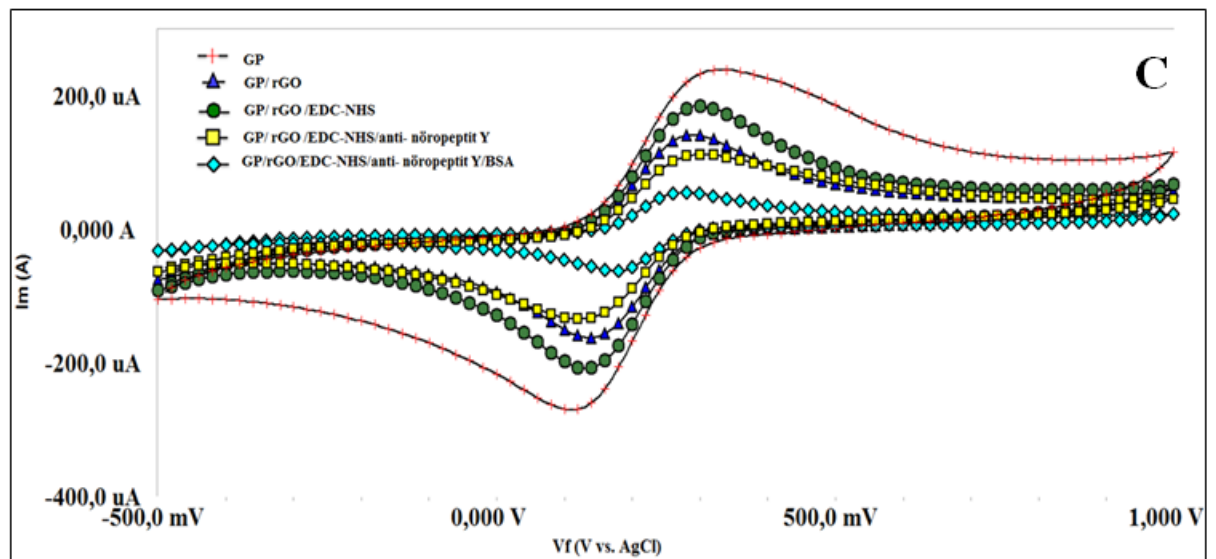
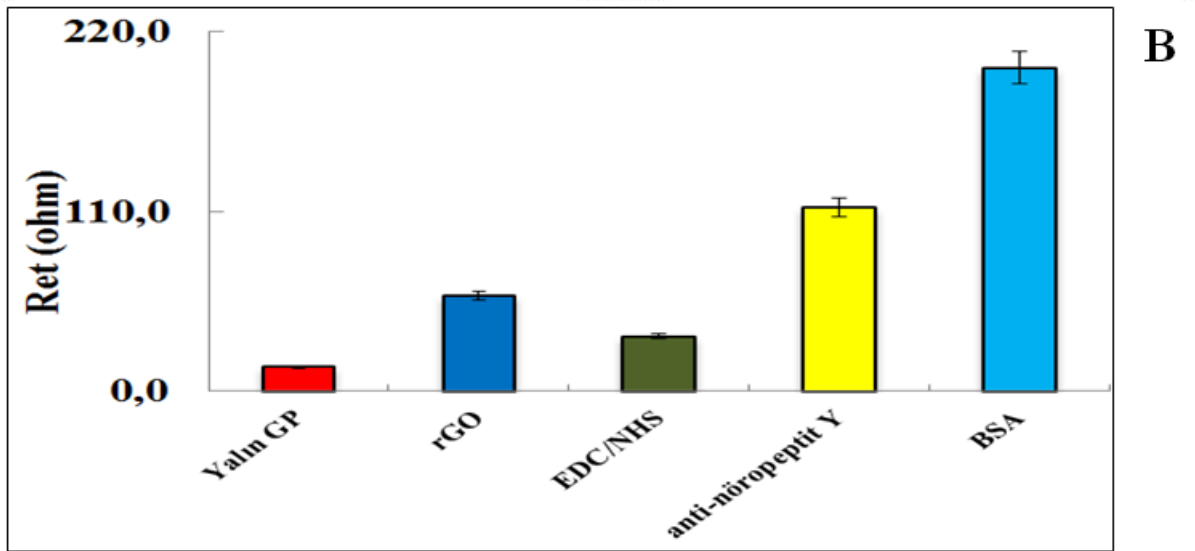
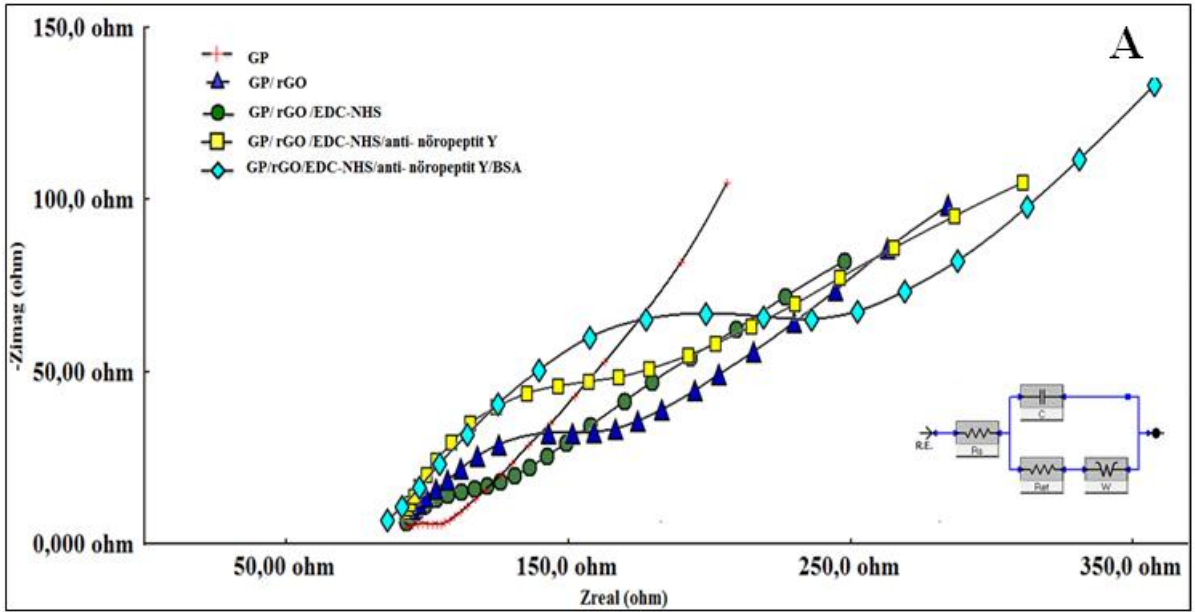
4.3.1. Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımları

Çocukluk çağı obezitesi ile ilişkili olduğu düşünülen nöropeptit Y nin tayini için geliştirilen biyosensörün temizlik prosedürü Başlık 4.1.1’ de belirtildiği şekildedir. EIS tekniği ile temizliği takip edilen pürüzsüz olmayan bir yüzeye sahip elektrotlara indirgenmiş grafen oksit (rGO) in adsorpsiyonuyla yüzeydeki gözenekli yapının doldurulması ve bu sayede anti-nöropeptit Y immobilizasyonuna olanak sağlayacak pürüzsüz ve etkili bir yüzey oluşturulması amaçlanmıştır. rGO sağlam yapısı ve geniş yüzey alanı gibi eşsiz özelliklere sahip bir nanomateryaldir. Bu çalışmada da tercih edilmesinin bir diğer sebebi geniş nöropeptit Y tayin aralığına imkan sunabilecek bir yüzey oluşturulmak istenmesidir. Şekil 4.30’ da geliştirilen biyosensörün immobilizasyon adımlarına ilişkin A) EIS eğrileri, B) EIS eğrilerinden elde edilen yük transfer direnci ve C) CV voltamogramları sunulmaktadır.

Redoks probunun biyo-tanım katmanı üzerindeki elektrokimyasal davranışı, modifikasyonun her adımında uyarlanabilir. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), bir indikatör olarak $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ün kullanılarak, antikor-antijen etkileşimi, DNA hibridizasyonu veya enzim-substrat kataliziyle indüklenen elektrolit ile elektrot arasındaki ara yüzey özelliklerinde meydana gelen değişikliği izlemek için başvurulan etkili bir yöntemdir. Yük transfer direncini (Ret) temsil eden daha yüksek frekanslarda yarım daire bölgesi ve düşük frekanslarda Warburg impedansı EIS spektrumunun ana bileşenleridir. Warburg impedansı (Zw), elektroaktif türlerin elektrodada difüzyonundan kaynaklanan gecikmeyi temsil eder. Şekil 4.30.A’ da immobilizasyon adımlarına ait EIS eğrileri görülmektedir. Çok pürüzsüz olmayan oldukça iletken yalın elektrot yüzeyine ait yük transfer direnci de çok düşük olarak tespit edilmiştir. Yüzeye rGO nun adsorbe edilmesiyle elektrot yüzeyinin gözenekli yapısı azalmış ve yüzeyde karboksil grupları oluşmuştur. rGO nun adsorpsiyonuyla oluşan karboksil grupları çalışılan ortam pH’sında (pH 7) negatif yüklü olduğundan dolayı yüzeyde elektrokimyasal yük taşınmasını engellemiş ve itici güç uygulayarak negatif yüklü redoks probunun yüzeye difüze olmasını zorlaştırmıştır. Bu durum elde edilen Nyquist eğri yarıçapında artış olarak gözlenmiştir. 30 ohm gibi oldukça düşük bir direnç gösteren yalın elektrot yüzeyine rGO disperse çözeltisinin adsorpsiyonuyla birlikte Ret değeri 65 ohm’ a yükselmiştir. rGO nun yüzeye fiziksel olarak tutunmasından dolayı sistemin kararlılığını EIS ölçümleriyle takip ederek ilerlemek gerekmektedir. EDC/NHS ile yüzeyin aktivasyonu işleminin gerçekleştirilmesi Ret değerlerinde düşüşe neden olmuştur. Anti-nöropeptit Y

çözeltilisinin yüzeye immobilizasyonu, yapısındaki amin grupları ve rGO nun aktifleşmiş karboksil terminallerinin kovalent etkileşime girmesiyle gerçekleşmiştir. Bu immobilizasyon işlemiyle anti-nöropeptit Y yüzeyde bir bariyer etki meydana getirmiş ve oluşan yalıtkan tabaka ile birlikte redoks probunun yüzeye difüzyonu engellenmiş ve yük transfer direncinde artış gözlenmiştir (112,3 ohm). Yüzeyde anti-nöropeptit Y-nöropeptit Y etkileşimi haricinde spesifik olmayan diğer bağlanmaları ve anti-nöropeptit Y ile kovalent etkileşime girememiş aktif karboksil gruplarını bloklamak amacıyla kullanılan BSA yüzeyi daha da yalıtkan hale getirmiş ve Nyquist eğri yarıçapında artış görülmüştür (Ret=197,9 ohm).

Şekil 4.30. B' de gösterilen CV voltamogramları da EIS ölçümlerini destekleyen sonuçlar sergilemektedir. rGO disperse çözeltisinin adsorpsiyonuyla indirgenme yükseltgenme pik akımlarında bariz bir düşüş gözlenmiştir. Katodik pik akımları yalın elektrot için 239,6 μ A iken rGO nun adsorbe olmasıyla 140,9 μ A e düşmüştür. rGO nun uyguladığı itici güçten dolayı elektron geçişi engellenmiştir. EDC/NHS ile aktifleşen elektrot yüzeyine anti-nöropeptit Y nin immobilize edilmesiyle oluşan yalıtkan tabaka yine pik akımlarında azalmaya neden olmuştur (112,9 μ A). Son olarak BSA bloklama adımı ile yüzey daha da yalıtkan hale gelmiş ve pik akımları daha da azalmıştır (56,07 μ A).

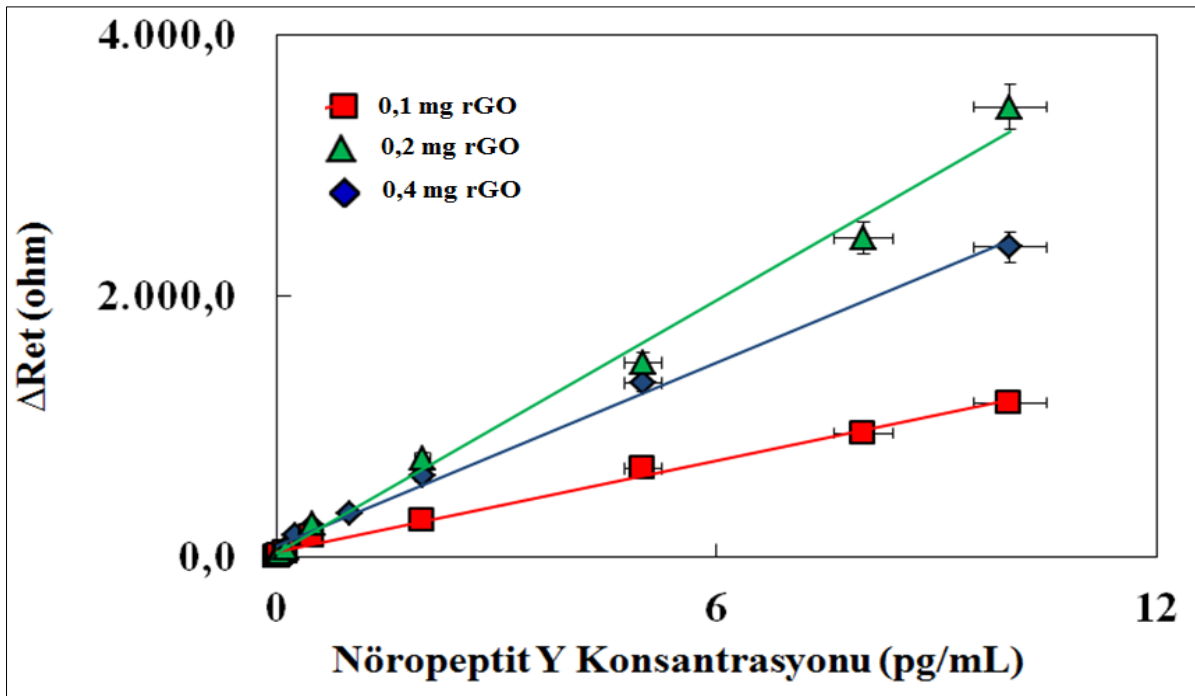


Şekil 4. 30. Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait (A) EIS eğrileri, (B) Ret değerleri ve (C) CV voltamogramları

4.3.2. Nöropeptit Y biyosensörünün optimizasyon çalışmaları

4.3.2.1. Grafen oksit miktar optimizasyonu

Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarından ilki rGO ile modifikasyondur. Anti-nöropeptit Y yüzeye immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için rGO miktarı optimize edilmesi gereken önemli bir parametredir. Bu amaçla biyosensörler diğer tüm koşullar aynı tutulup yalnızca rGO miktarlarının değiştirilmesiyle hazırlanmış ve elde edilen impedans eğrileri ve yük transfer dirençlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4. 31. rGO miktarının biyosensör yanıtı üzerine etkisi

0,1 mg, 0,2 mg ve 0,4 mg indirgenmiş grafen oksit 1 mL DMF içerisinde disperse edilmiş ve biyosensörler hazırlanan bu üç rGO dispersiyon çözeltisiyle muamele edilmiştir. Elektrot yüzeyleri dikkatli ve emin bir şekilde kurutulmuştur. rGO miktarının artırılmasıyla (0,4 mg) muhtemelen elektrot yüzeyinde fazla birikmeden dolayı düzensizlik oluşmuş, rGO dispersiyon çözeltisi yüzeye adsorbe olamamış ve yüzeyden kopmuştur. Bu sebeple anti-nöropeptit Y çözeltisinin yüzeye immobilizasyonu güçleşmiştir. Diğer yandan miktarının azaltılması da (0,1 mg) rGO dispersiyon çözeltisinin elektrot yüzeyine tutunmakta yetersiz kalmasına sebep olmuştur. Bu sebeplerden dolayı diğer çalışmalar için optimum rGO miktarı 0,2 mg olarak seçilmiştir.

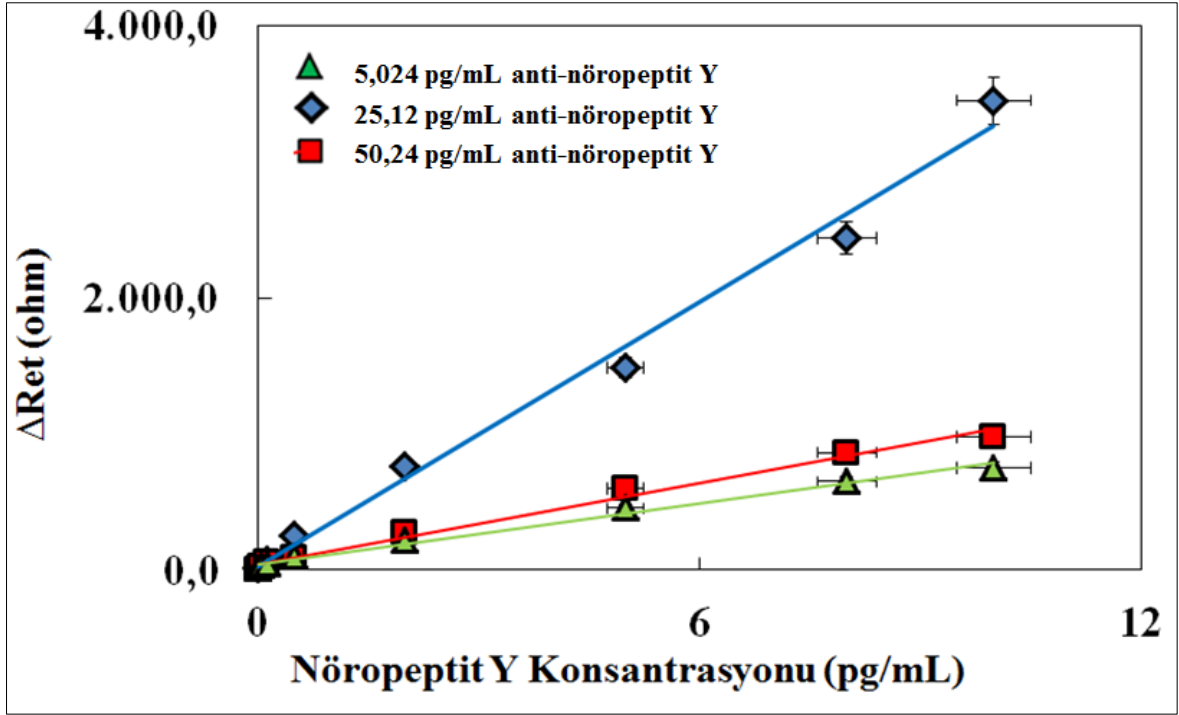
Çizelge 4.18’de rGO miktar optimizasyonu parametrelerine ilişkin grafiklerden elde edilen R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 18. rGO miktarı optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
0,1 mg rGO	0,9931	116,22x+40,427
0,2 mg rGO	0,9913	322,97x+28,078
0,4 mg rGO	0,9943	235,23x+79,628

4.3.2.2. Anti nöropeptit Y konsantrasyonu optimizasyonu

Anti-nöropeptit Y’ nin yüzeye immobilizasyonuna olanak sağlayacak olan rGO dispersiyon çözeltisinin miktar optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra bir diğer işlem anti-nöropeptit Y çözeltisinin konsantrasyonunu optimize etmektir. Değişen anti-nöropeptit Y konsantrasyonunun biyosensör yanıtı üzerine etkisinin araştırılması için 3 farklı anti-nöropeptit Y konsantrasyonu (5,024 ng/mL, 25,12 ng/mL, 50,24 ng/mL) denenmiştir. Diğer tüm koşulların sabit tutulup yalnızca anti-nöropeptit Y çözeltisinin konsantrasyonunun değiştirilmesiyle hazırlanan biyosensörlere ait impedans eğrilerinden yararlanılarak Şekil 4.32’ deki kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir.



Şekil 4. 32. Anti-nöropeptit Y konsantrasyonunun biyosensör yanıtı üzerine etkisi

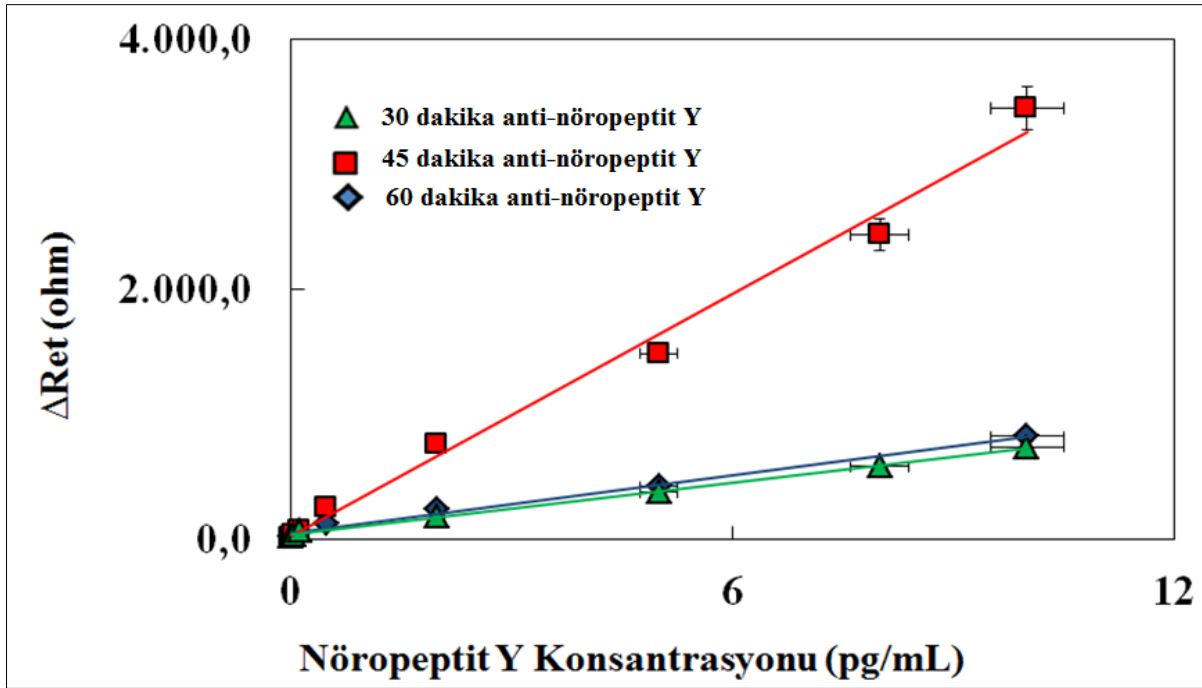
Nöropeptit Y biyosensörünün geliştirilmesinde anti-nöropeptit Y çözeltisinin 25 ng/mL konsantrasyonuna nazaran daha düşük konsantrasyonda (5,024 ng/mL) kullanılmasıyla düşük yük transfer dirençlerinin elde edilmesi yüzeye immobilizasyon için yetersiz kaldığını göstermektedir. Anti-nöropeptit Y konsantrasyonunun 25,12 ng/mL'den 50,24 ng/mL'a artırılmasıyla da yüzeydeki muhtemelen daha kompleks ve yoğun bir immobilizasyondan ötürü nöropeptit Y nin bağlanma kapasitesinin düştüğü görülmüştür. Bu sebeplerden dolayı optimum anti-nöropeptit Y konsantrasyonu 25,12 ng/mL olarak seçilmiştir. Çizelge 4.19' da farklı anti-nöropeptit Y konsantrasyonlarının kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 19. Anti-nöropeptit Y konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
5,024 ng/mL anti-nöropeptit Y	0,9915	$73,899x+47,806$
25,12 ng/mL anti-nöropeptit Y	0,9913	$322,97x+28,078$
50,24 ng/mL anti-nöropeptit Y	0,9905	$99,371x+43,62$

4.3.2.3. Anti nöropeptit Y süre optimizasyonu

Anti-nöropeptit Y immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 30, 45 ve 60 dakikalık farklı inkübasyon sürelerinde anti-nöropeptit Y immobilizasyonları gerçekleştirilerek biyosensörler hazırlanmış ve bu biyosensörlere ilişkin elde edilen her bir CV ve EIS yanıtları değerlendirilerek Şekil 4.33' teki kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.



Şekil 4. 33. Anti-nöropeptit Y inkübasyon süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi

Şekil 4.33' e bakıldığında biyosensörün anti-nöropeptit Y çözeltisi ile düşük periyotta (30 dakika) inkübasyona bırakılmasıyla anti-nöropeptit Y/nöropeptit Y etkileşiminin azaldığı ve sinyallerde düşüş olduğu görülmektedir. Anti-nöropeptit Y çözeltisinin inkübasyon süresinin 60 dakikaya artırılmasıyla yine yük transfer dirençlerinde belirgin düşüş gözlenmiştir. Bu durum anti-nöropeptit Y çözeltisinin inkübasyon süresinin 60 dakika olmasının yüzeyde muhtemelen gerçekleşen gelişigüzel bağlanmalara sebep olmasıyla açıklanabilir. Bu da anti-nöropeptit Y ile nöropeptit Y etkileşimini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu sebeplerden dolayı optimum anti-nöropeptit Y inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

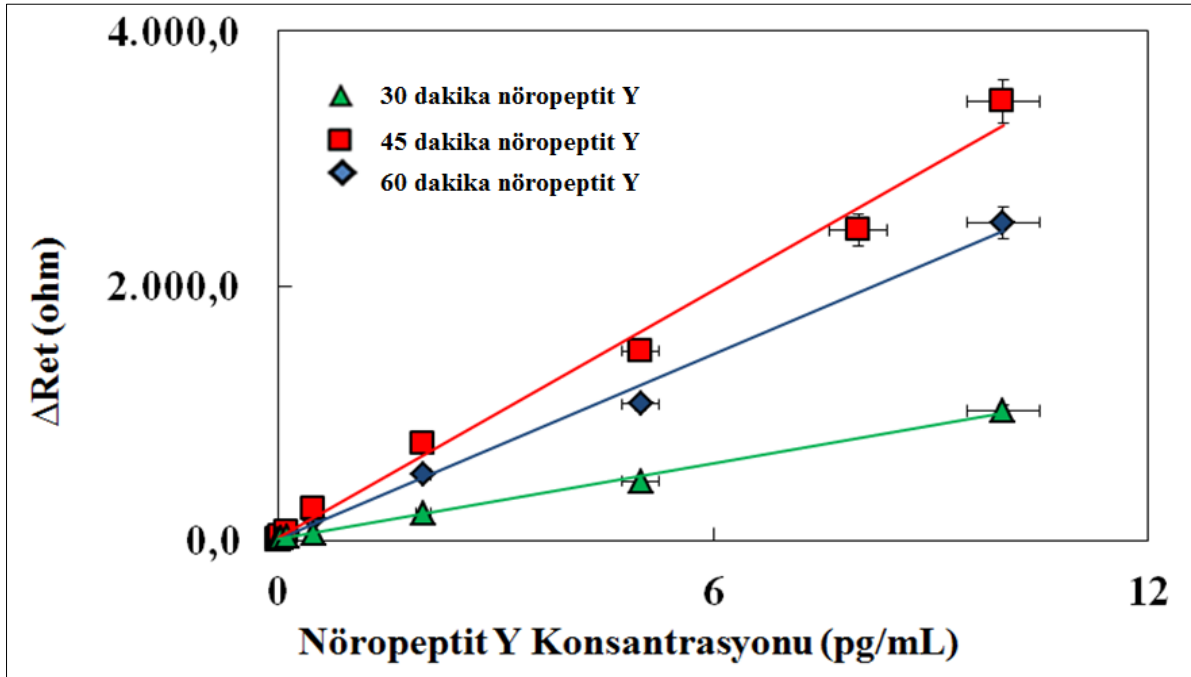
Çizelge 4.20’ de anti-nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri görülmektedir.

Çizelge 4. 20. Anti-nöropeptit Y inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
30 dakika anti-nöropeptit Y	0,9984	$69,145x+40,871$
45 dakika anti-nöropeptit Y	0,9913	$322,97x+28,078$
60 dakika anti-nöropeptit Y	0,9906	$77,509x+51,057$

4.3.2.4. Nöropeptit Y süre optimizasyonu

Son optimize edilen parametre olarak nöropeptit Y çözeltisinin inkübasyon süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaca yönelik olarak optimum şartlarda hazırlanmış biyosensörler 3 farklı periyotta (30 dakika, 45 dakika, 60 dakika) nöropeptit Y çözeltisi ile inkübe edilmiş ve EIS eğrilerinden elde edilen Ret değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.34) çizilmiştir.



Şekil 4. 34. Nöropeptit Y inkübasyon süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi

Şekil 4. 34' daki kalibrasyon grafikleri incelendiğinde 30 dakikalık nöropeptit Y inkübasyon süresinin anti-nöropeptit Y/nöropeptit Y etkileşimi için yetersiz kaldığı görülmüş ve bu nedenle yük transfer direncinde 45 dakika inkübasyon süresine göre düşüş meydana gelmiştir. Nöropeptit Y inkübasyon süresinin 60 dakika olmasıyla yine yük transfer dirençlerinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu durumun sebebi zaman geçtikçe biyosensör yüzeyinin nöropeptit Y ile doygunluğa ulaşması ve biyosensörün nöropeptit Y yi tayin edebilme kapasitesinin azalması olarak söylenebilir. Bu sebeplerden dolayı nöropeptit Y nin inkübasyon süresi olarak optimum süre 45 dakika olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.21' de farklı nöropeptit Y inkübasyon sürelerinin kalibrasyon grafiklerine ait R^2 değerleri ve doğru denklemleri gösterilmektedir.

Çizelge 4. 21. Nöropeptit Y'nin inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait R^2 ve doğru denklemleri

Optimizasyon parametreleri	R^2	y
30 dakika nöropeptit Y	0,9977	99,057x+12,602
45 dakika nöropeptit Y	0,9913	322,97x+28,078
60 dakika nöropeptit Y	0,9942	242,16x+12,517

4.3.3. Nöropeptit Y biyosensörünün analitik çalışmaları

4.3.3.1. Nöropeptit Y biyosensörünün lineer tayin aralığının belirlenmesi

Optimizasyon adımlarının gerçekleştirilmesinden sonra optimum koşullarda hazırlanan biyosensörlerin artan nöropeptit Y konsantrasyonlarına karşı sergilemiş olduğu performans incelenmiş ve yanıt alınabilen nöropeptit Y konsantrasyon aralığı tayin edilmiştir. 0,005 pg/mL-10 pg/mL olarak belirlenen oldukça geniş tayin aralığı ($R^2=0,9957$) biyosensörün pikogram ve femtogram gibi düşük seviyelerde nöropeptit Y çözeltilerine yanıt verebilme potansiyelinin olduğunu göstermiştir (Şekil 4.35.C). Bu tez çalışmasında bir önceki yapılan biyosensör sisteminde asit ile muamele edilerek elektrot yüzeylerinde doğrudan karboksil gruplarının açığa çıkarılması hedeflenmişti. Bu yöntemde yapısında karboksil grupları bulunduran rGO dispersiyon çözeltisi ile modifiye edilen biyosensörün lineer tayin aralığı

önceki yönteme göre genişlemiş ve daha da düşük seviyelerde analit konsantrasyonlarının belirlenmesi mümkün olmuştur. Bu durum rGO nun biyosensör etkinliği üzerindeki etkisini açıkça göstermektedir.

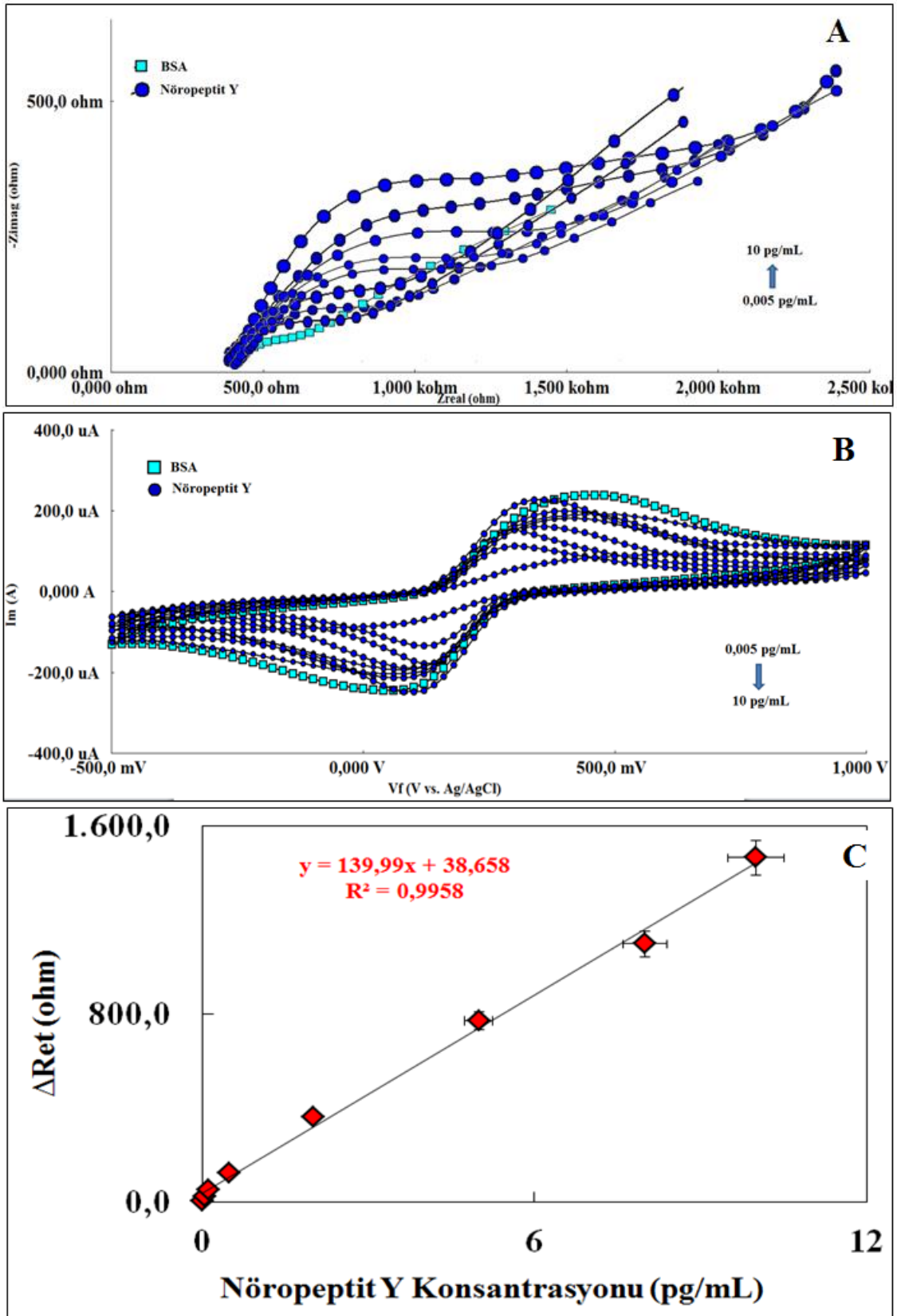
Şekil 4.35.A’ da verilen EIS spektrumları incelendiğinde, geliştirilen biyosensörlerin artan nöropeptit Y konsantrasyonlarıyla muamele edilmesi sonucunda Nyquist eğri yarıçapında ya da bir diğer deyişle yük transfer dirençlerinde artış meydana geldiği görülmektedir. Nöropeptit Y konsantrasyonunun artmasıyla elektrot yüzeyinin yalıtkanlığı da artmış ve redoks probunun difüzyonu bariyer etkiden dolayı engellenmiştir. Yük transfer dirençlerinde meydana gelen artışın sebebi de yalıtkanlıktan dolayı oluşan bu bariyer etkidir. Şekil 4.35.B’ de CV voltamogramlarında gözlenen pik akımlarının azalması da yine yüzeyin gitgide yalıtkanlaşmasıdır.

LOD (algılama sınırı) ve LOQ (kantitatif ölçme sınırı) değerleri sırasıyla 0,00011 pg/mL ve 0,00036 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Algılama sınırı (LOD), biyosensörün laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit konsantrasyonu; kantitatif ölçme sınırı (LOQ) ise miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanabilir.

Çizelge 4.22’ de artan nöropeptit Y konsantrasyonuna bağlı olarak hesaplanan Ret, Rs ve kapasitans değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 22. Artan nöropeptit Y konsantrasyonuna bağlı olarak yük transfer direnci, Rs ve kapasitansdaki değişiklikler

Elektrot	Ret(ohm)	Rs(ohm)	C(µF)
Biyosensör	147,4±2,320	114,7±0,9592	3,027±0,09941
Nöropeptit Y (0,005 pg/mL)	159,4±2,490	113±0,915	6,204±0,1922
Nöropeptit Y (0,05 pg/mL)	149,4±2,035	83,24±0,6692	4,921±0,1296
Nöropeptit Y (0,125 pg/mL)	195,6±2,490	96,17±0,7632	4,531±0,1107
Nöropeptit Y (0,5 pg/mL)	233±3,667	126,7±0,9901	4,440±0,1177
Nöropeptit Y (2 pg/mL)	418,9±6,036	251,9±2,078	1,333±0,03702
Nöropeptit Y (5 pg/mL)	666,9±9,104	328,6±2,793	0,7244±0,01779
Nöropeptit Y (8 pg/mL)	879,5±9,320	373,9±3,013	0,9219±0,02047
Nöropeptit Y (10 pg/mL)	1106±11,92	491,6±3,973	0,6702 ±0,01540



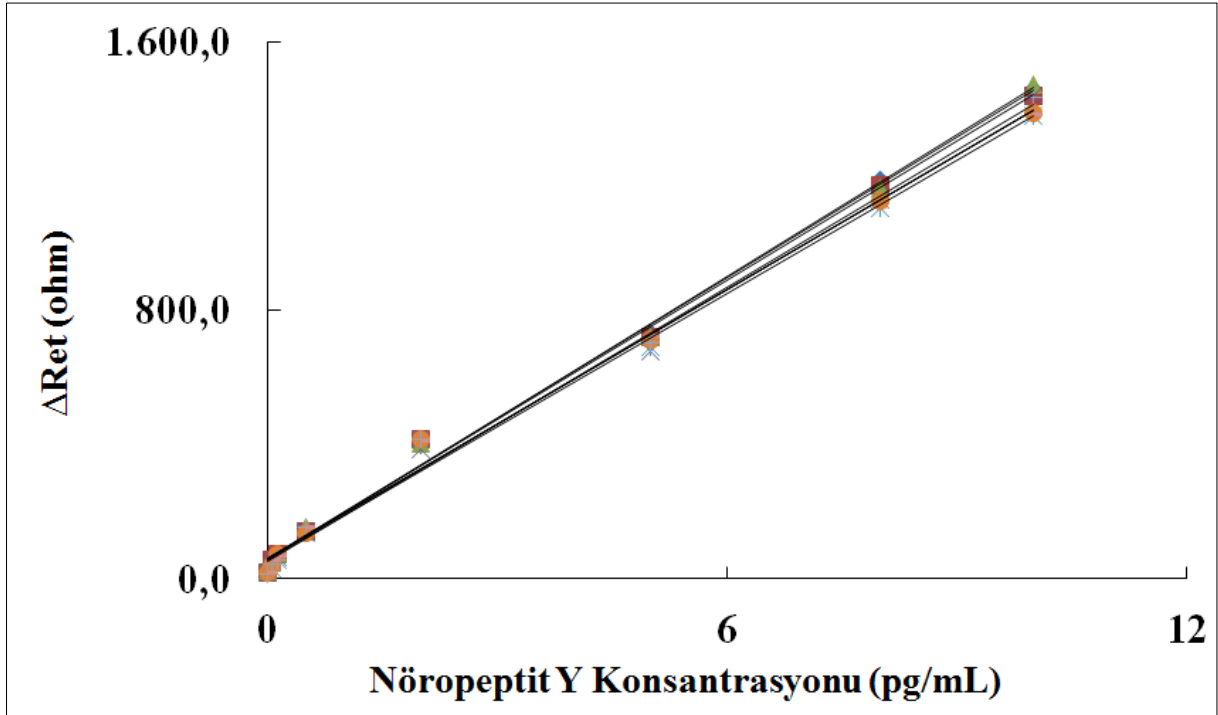
Şekil 4. 35. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün artan nöropeptit Y konsantrasyonlarına verdiği yanıtı (A) EIS spektrumları (B) CV voltamogramları (C) EIS verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

4.3.3.2. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Nöropeptit Y tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi için optimum koşullarda 20 farklı biyosensör hazırlanmış ve bu biyosensörlerle aynı konsantrasyonda nöropeptit Y (5 pg/mL) çözeltisinin tayini gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu işlemlerin sonucunda ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı gibi analitik parametreler hesaplanmış ve sırasıyla 4,9992 pg/mL, $\pm 0,005095$ ve %0,1 olarak bulunmuştur. 20 biyosensörde hesaplanan standart sapma değerinin bu kadar düşük çıkması, geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik kapasitesinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

4.3.3.3. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Bir biyosensörün güvenilirliği ve doğruluğu için tekrar üretilebilirlik kapasitesinin incelenmesi en gerekli ve belirleyici aşamalardan biridir. Bu sebeple aynı koşullarda fakat farklı zamanlarda 8 farklı biyosensör hazırlanmış ve 0,005 pg/mL-10 pg/mL konsantrasyon aralığındaki nöropeptit Y çözeltilerine verdiği yanıt incelenmiştir. Şekil 4.36' da hazırlanan 8 biyosensöre ait kalibrasyon grafikleri görülmektedir. Grafiklerin doğrusallığı, biyosensörlere ait EIS eğrilerinden elde edilmiş Ret değerlerinin birbirleriyle benzerliği yani kısacası biyosensörlerden nöropeptit Y konsantrasyonlarına karşılık alınan yanıtların benzer olması tekrar üretilebilirlik kapasitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 36. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliği (n=8)

Çizelge 4.23' te nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin grafik denklemleri ve R^2 değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 23. Nöropeptit Y biyosensörünün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 değerleri ve denklemleri

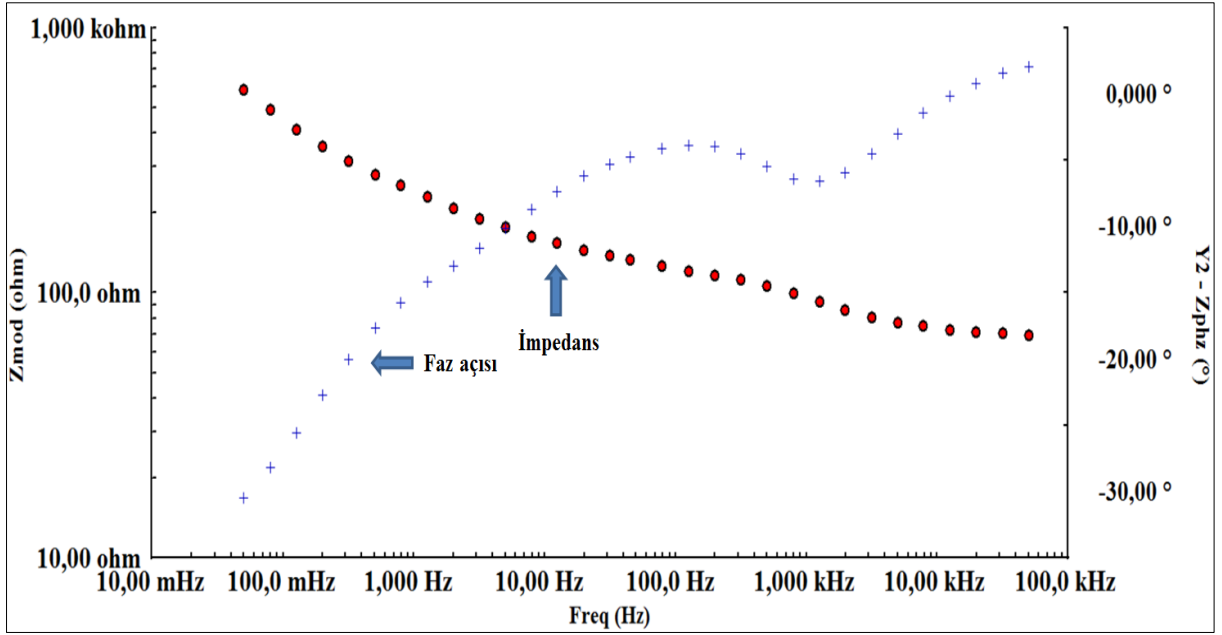
Biyosensör	R^2	y	Lineer Aralık (pg/mL)
1	0,997	140,8x+56,806	0,005 – 10
2	0,9956	138,17x+61,66	0,005 – 10
3	0,9961	139,72x+58,85	0,005 – 10
4	0,9955	136,29x+51,95	0,005 – 10
5	0,9936	132,33x+55,078	0,005 – 10
6	0,9944	133,53x+59,999	0,005 – 10
7	0,9924	137,63x+56,431	0,005 – 10
8	0,9937	133,02x+66,615	0,005 – 10

Şekil 4.36' da verilen kalibrasyon grafiklerine ait eğim ve interceptlerin bağıl standart sapma değerleri (%RSD) sırasıyla % 2,34 ve % 7,6 olarak hesaplanmıştır.

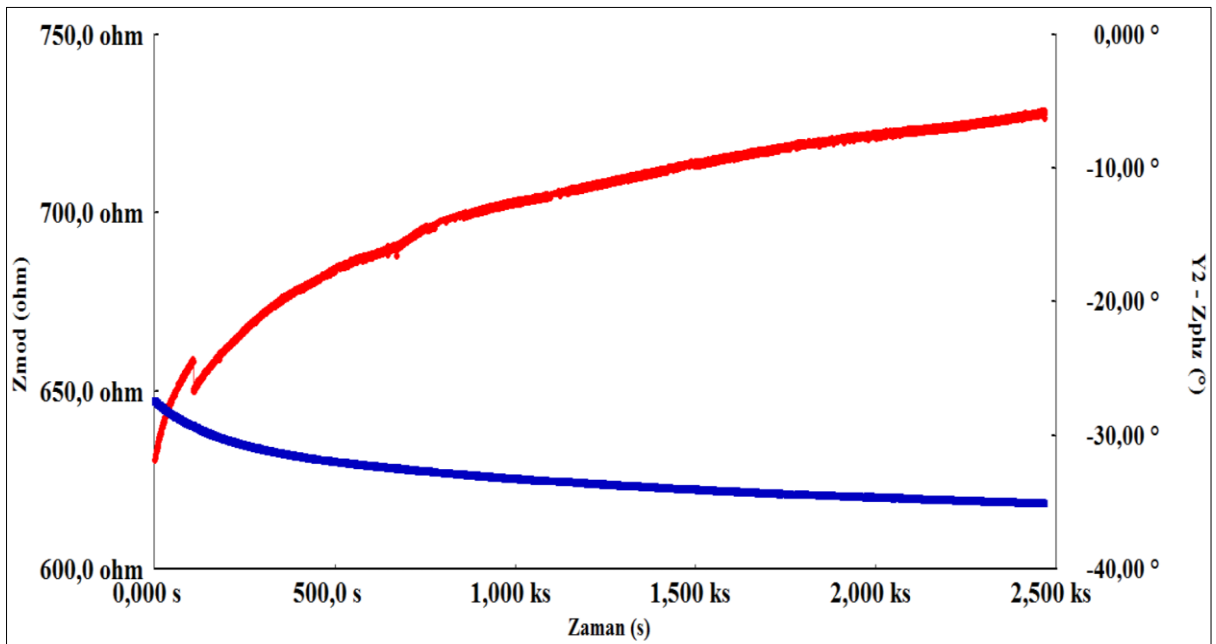
4.3.3.4. Nöropeptit Y biyosensörünün sabit frekansta impedans tekniği ile analizi

Anti-nöropeptit Y ve nöropeptit Y arasında oluşan etkileşimin impedimetrik davranışı sabit frekansta faradayik olmayan ortamda analiz edilmiştir.

Sisteme uygulanacak olan sabit frekans (10 Hz) Bode grafiğinden (Şekil 4.37) yararlanılarak seçilmiştir. 45 dakika boyunca 10 Hz sabit frekansta pH 7 fosfat tamponu içerisinde impedans ölçümü gerçekleştirilmiş ve anti-nöropeptit Y/nöropeptit Y biyokompleksi oluşumu takip edilmiştir. 2500 saniye civarında nöropeptit Y doygunluğuna erişilmesinden dolayı impedans artışı artık belirginliğini kaybetmiş ve durmuştur (Şekil 4.38).



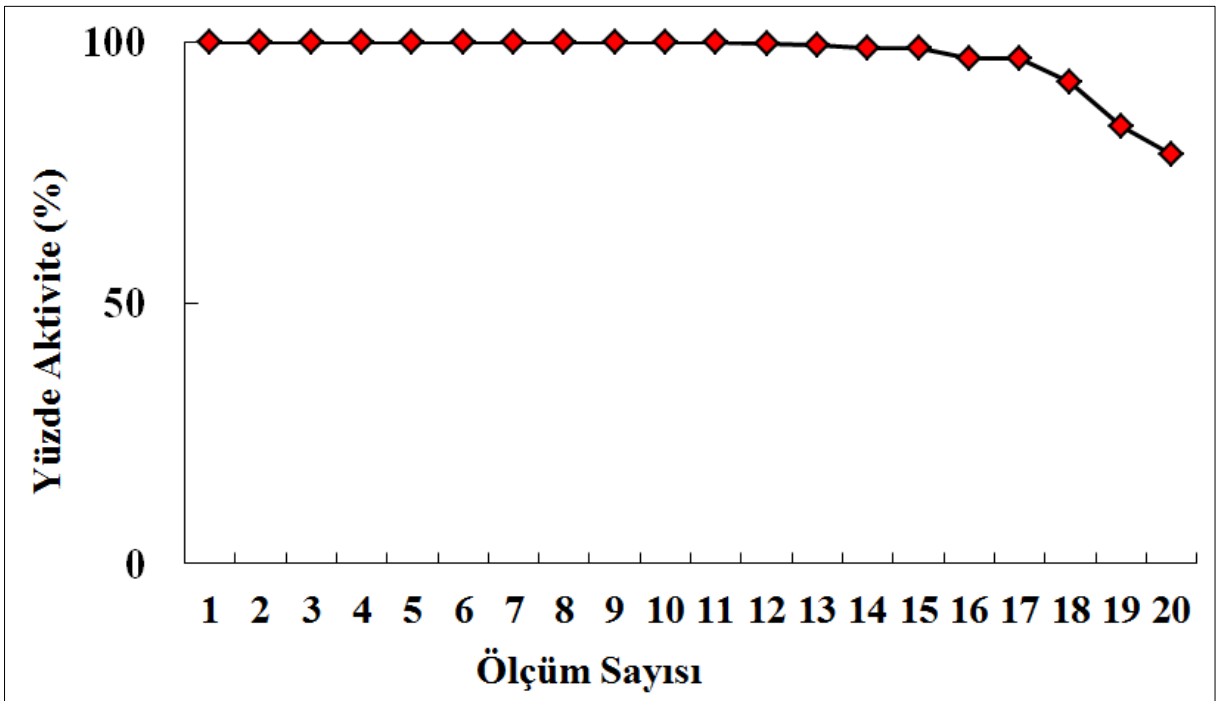
Şekil 4. 37. Nöropeptit Y biyosensörünün bode eğrileri



Şekil 4. 38. Nöropeptit Y biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümü

4.3.3.5. Anti-nöropeptit Y temelli biyosensörün rejenerasyon çalışmaları

Tasarlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için biyosensör optimum şartlarda hazırlandıktan sonra nöropeptit Y çözeltisiyle ve devamında %0,1 HCl çözeltisiyle muamele edilmiştir. Nöropeptit Y nin anti-nöropeptit Y ile etkileşiminin sonlanarak yüzeyden ayrılması hedeflenmiştir. Bütün bu işlemler EIS ile takip edilmiştir. Bu şekilde tekrarlanan rejenerasyon işlemleri 20 kez gerçekleştirilmiştir. 21. asit ile muamele aşamasında yüzey tamamen harap olmuş ve biyosensörden yanıt alınamamıştır. İlk 18 rejenerasyon adımıyla biyosensör aktivitesinin hemen hemen tamamını korurken rejenerasyon sonlandığında %78,6' sını korumuştur (Şekil 4.39).

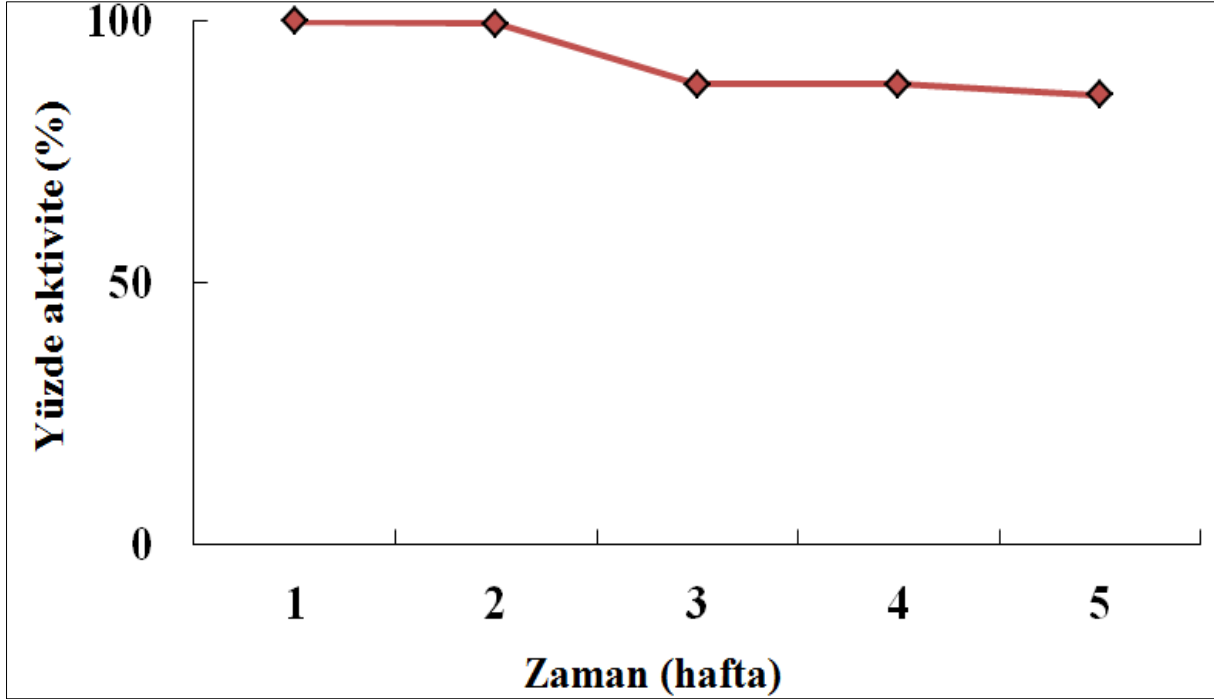


Şekil 4. 39. Nöropeptit Y biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

4.3.3.6. Nöropeptit Y biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün depolanma ömrünün araştırılması biyosensörün kararlılığının belirlenmesi için önemli bir aşamadır. Kararlılık, biyosensörün ömrünün uzunluğu hakkında bilgi verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analizin yapılabileceğini anlatır. Bu sebeplerden dolayı optimum koşullarda hazırlanan biyosensörler haftalık periyotlarla nöropeptit Y çözeltisi ile inkübe edilmiş ve elde edilen sonuçlar EIS ile takip edilmiştir. Şekil 4.40' da biyosensörün depolanma potansiyeline ait grafik verilmiştir. 3.haftaya kadar

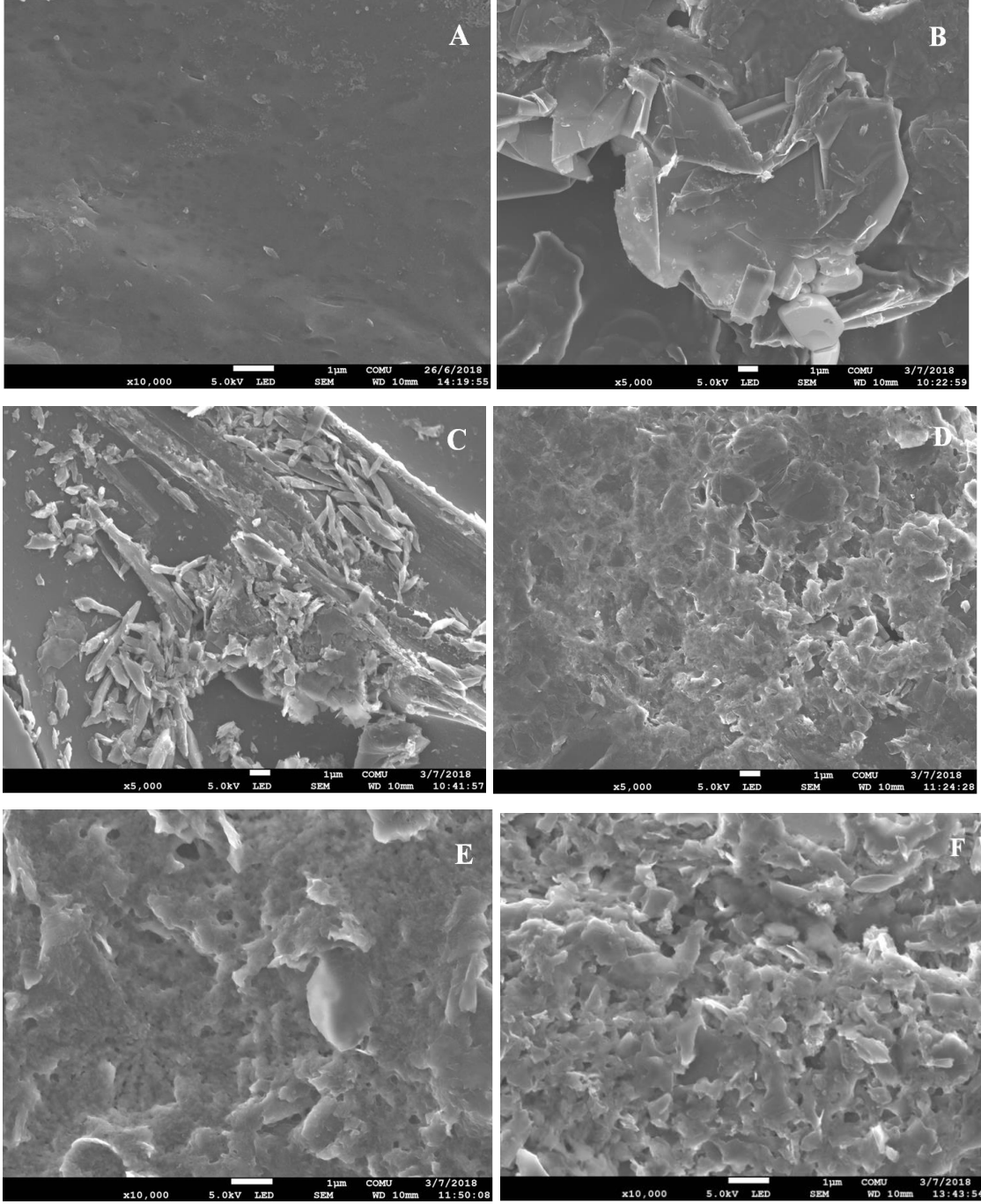
biyosensörün aktivitesi tamamen korunurken 3. haftadan itibaren çok az da olsa bir kayıp yaşanmış ve % 87 si korunabilmiştir.



Şekil 4. 40. Nöropeptit Y biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi

4.3.3.7. SEM cihazı ile nöropeptit Y biyosensörünün yüzey morfolojisinin görüntülenmesi

Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ilişkin SEM görüntüleri Şekil 4.41' de verilmiştir. A' da yalnız GP elektrot yüzeyi görüntülenmiştir. GP elektrot yüzeyinde çok belirgin olmamakla birlikte gözenekli bir görünüm elde edilmiştir. B' de biyosensör yüzeyine rGO' nun adsorbsiyonu gerçekleşmiş ve görüntülenmiştir. Daha sonra EDC/NHS ile yüzey aktivasyonunun gerçekleşmesiyle C' deki görünüm elde edilmiştir. Anti-nöropeptit Y nin yüzeye immobilize edilmesiyle D' de de görüldüğü gibi yüzey yoğunlaşmaya başlamıştır. BSA ile bloklama adımında (E) ve son olarak nöropeptit Y ile inkübasyon işlemlerinde (F) adım adım yüzey yoğunluğu artmıştır.

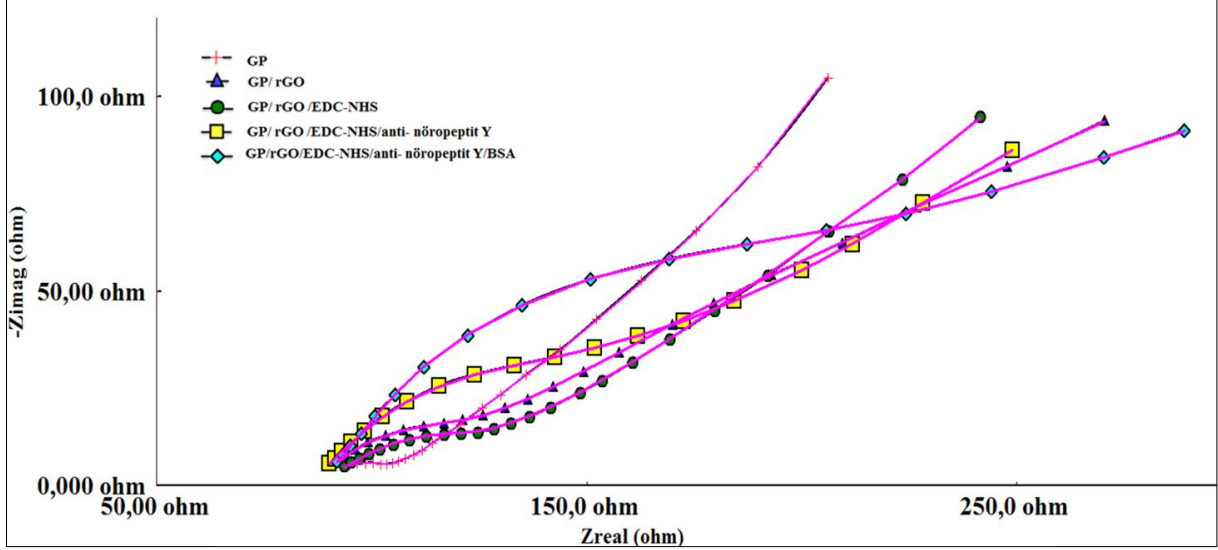


Şekil 4. 41. Nöropeptit Y biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ait SEM görüntüleri (A) yalın GP elektrot, (B) rGO, (C) EDC/NHS, (D) anti-nöropeptit Y, (E) BSA, (F) nöropeptit Y

4.3.3.8. Nöropeptit Y biyosensörünün Kramers Kronig dönüşümü

Geliştirilen biyosensörün immobilizasyon adımları gerçekleştirilirken impedans ölçümlerinin herhangi bir dış etkenden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğinin tespiti için Kramers Kronig dönüşümü kullanılmaktadır. Şekil 4.42' de

impedans eğrileri ile Kramers Kronig dönüşümlerinin örtüştüğünü gösteren spektrumlar gösterilmektedir. Bu örtüşme biyosensörün doğruluğu adına bilgi vermektedir.



Şekil 4. 42. Nöropeptit Y biyosensörünün Kramer Kronig dönüşümü

Çizelge 4.24' te biyosensörün immobilizasyon adımlarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri listelenmiştir.

Çizelge 4. 24. Nöropeptit Y biyosensörü immobilizasyon aşamalarına ilişkin Kramers-Kronig dönüşümleri

Biyosensor adını	Kramers Kronig dönüşüm değeri
Yalın GP	768,8 n
GP/rGO	5,614 u
GP/ rGO/EDC-NHS	384,9 n
GP/ rGO/EDC-NHS/anti-nöropeptit Y	88,85 n
GP/ rGO/EDC-NHS/anti-nöropeptit Y/BSA	1,280 u

4.3.3.9. Laviron eşitliği ile nöropeptit Y biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Çalışmanın bu aşamasında Başlık 4.1.3.10 da verilen Laviron eşitliğinden yararlanılarak immobilizasyon adımlarında yüzeylerin kaplanma oranları araştırılmıştır. Bu

amaçla öncelikle biyosensörün 10 farklı tarama hızında CV ölçümleri alınmış ve voltamogramlardan elde edilen değerler Laviron eşitliğinde yerine konulmuştur. Yapılan hesaplamalar sonucunda GP/rGO yüzeyi $2,396 \times 10^{-8}$ mol/cm² olarak bulunmuşken anti-nöropeptit Y immobilizasyonu ile değer $5,284 \times 10^{-8}$ e yükselmiştir. Bu sonuç anti-nöropeptit Y nin yüzeye immobilize edildiğine işaret etmektedir.

4.3.3.10. Anti-nöropeptit Y temelli biyosensörün gerçek serum örneklerine uygulanması

Nöropeptit Y biyosensörünün gerçek serum örneklerine verdiği yanıtın incelenmesi amacıyla 5 farklı çocuk serum örnekleri kullanılmıştır.

Yapılan literatür araştırmasıyla çocuk serumunda nöropeptit Y konsantrasyon aralığı 276,2 pM olarak bulunmuş (**Choi 2012**) ve gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörün serum örneklerinde nöropeptit Y konsantrasyonlarını tayin edebilmesi standart ekleme yöntemi kullanılarak sağlanmıştır. Standart olarak eklenen nöropeptit Y konsantrasyonları 2 pg/mL ve 5 pg/mL'dir.

Sonuçlardan yola çıkılarak hesaplanan bağıl standart sapma ve geri elde gibi değerler Çizelge 4.25' te verilmiştir.

Geliştirilen biyosensörün klinik alanda kullanım potansiyelinin bulunması hem ticari bağlamda hem de doğruluğu açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensörün böyle bir kapasitesinin olup olmadığının araştırılması için gerçekleştirilen bu çalışma basamağında umut verici sonuçlar alınmıştır. Çizelge 4.25' e bakıldığında hata payının oldukça düşük olduğu ve biyosensörün nöropeptit Y konsantrasyonunu tayin edebilmede yüksek potansiyele sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir.

Çizelge 4. 25. Geliştirilen nöropeptit Y biyosensörü ile serum örneklerinde bulunan nöropeptit Y konsantrasyonunun belirlenmesi

Serum örnek numarası	Nöropeptit Y ölçülen konsantrasyon (pg/mL)	Standart eklenen konsantrasyon (pg/mL)	Ölçülen konsantrasyon (pg/mL, n=3)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	3	2	4,95/5/4,97	0,5	99,4
		5	7,84/8,13/8,15	2,16	100,5
2	2	2	4,04/3,96/4,03	1,09	100,25
		5	6,9/6,92/7,18	2,23	100
3	0,89	2	2,92/2,91/2,88	0,72	100,35
		5	5,89/5,91/5,87	0,34	100
4	1,44	2	3,7/3,45/3,47	3,92	102,9
		5	6,3/6,46/6,5	1,65	99,69
5	0,87	2	2,88/2,89/2,9	0,35	100,7
		5	5,9/5,85/5,89	0,45	100,17

5. SONUÇ

Çocukluk çağı obezitesi, 21. yüzyılın en ciddi halk sağlığı sorunlarından biridir. Aşırı kilolu ve obez çocuklarda bu durum yetişkinlik çağında da devam etmekte ve daha genç yaşta diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bulaşıcı olmayan hastalıklara yakalanma ihtimali daha yüksek olmaktadır. Tüm bu kritik durumlardan dolayı hastalığın erken teşhisi büyük önem teşkil etmektedir. Bu amaçla doktora tezi kapsamında çocukluk çağı obezitesinin erken tanısına yönelik biyosensör sistemleri geliştirilmiş ve bu biyosensörlerde çalışma elektrotu olarak yenilikçi bir materyal olan grafit kağıt elektrot kullanılmıştır. Sağlam, tek kullanımlık, ucuz ve pratik bir elektrot olması, mükemmel bir iletkenliğinin olması bu elektrotun tercih edilme sebeplerindedir. Aynı zamanda yapılan literatür araştırmalarında grafit kağıt elektrot ile tasarlanan immunosensör çalışmaları ile karşılaşılmamıştır. Tasarlanan elektrokimyasal temelli 3 farklı biyosensör sisteminde de tüm optimizasyon aşamaları ve karakterizasyon çalışmaları EIS, CV ve KDV gibi tekniklerle takip edilmiştir. Tüm biyosensörler için gerçekleştirilen ‘sabit frekansta impedans ölçümü’ tekniği ile biyoaktif tabakada analit ile etkileşimin eş zamanlı incelenmesi literatüre ekibimiz tarafından kazandırılmıştır.

Geliştirilen biyosensörle tayininin gerçekleşmesi hedeflenmiş ilk biyobelirteç protein yapılı bir hormon olan leptindir. ‘Obezite hormonu’ olarak bilinen leptin seviyesi obez bireylerde yükselmektedir. Bu seviye değişiminin belirlenebilmesinin obezitenin erken teşhis edilmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bir diğer geliştirilen biyosensörle adiponektin analizi hedeflenmiştir. Tek kullanımlık bu biyosensörle geniş konsantrasyon aralığında adiponektin tayini gerçekleştirilmiş ve pikogram düzeyinde hassasiyet sergilenmiştir.

Son olarak geliştirilen biyosensörle nöropeptit Y’ nin tayin edilmesi amaçlanmıştır. Bu biyosensör sisteminde yüzeyin modifiye edilmesi için kullanılan indirgenmiş grafen oksit dispersiyon çözeltisi sahip olduğu biyouyumluluk, hızlı elektron taşınımı, sağlamlık gibi özelliklerinden dolayı biyosensör uygulamalarında önem kazanmaya başlamıştır. Bir önceki çalışmada geliştirilen adiponektin biyosensöründe elektrot yüzeyi doğrudan asit ile bozundurulup karboksil grupları açığa çıkarılmıştı. Nöropeptit Y tayini için geliştirilen bu biyosensörde yüzey rGO ile modifiye edilmiş ve yüzeyde karboksil grupları oluşturulmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde GO modifiyeli biyosensörün lineer tayin aralığının daha geniş

olduğu ve daha düşük konsantrasyonlarda analit tayinine imkan sağladığı belirlenmiştir. Bu veriler indirgenmiş grafen oksitin bu çalışma için etkinliğini kanıtlamaktadır.

Geliştirilen 3 biyosensörün de yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla yüksek hassasiyet, tekrar üretilebilirlik, tekrar kullanılabilirlik, geniş tayin aralığı gibi birçok avantaj sergilediği tespit edilmiştir.

Aynı zamanda geliştirilen tüm biyosensör sistemlerinin klinik alanda kullanım potansiyellerinin araştırılması için yaş grubu 1 ile 7 arasında olan 5 sağlıklı çocuktan alınan serum örneklerine verdiği yanıtlar incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 3 biyosensör sisteminin de klinik alanda uygulanabilirlik potansiyellerinin yüksek olduğu açıkça görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- Arenas CB, Sánchez-Tirado E, Ojeda I, Gómez-Suárez CA, González-Cortés A, Villalonga R, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2016). An electrochemical immunosensor for adiponectin using reduced graphene oxide–carboxymethylcellulose hybrid as electrode scaffold. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 223: 89-94.
- Arshak K, Mohamed Z, Souna E, Anthony T (2008). *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. Springer Science and Business Media, New York.
- Asayama K, Hayashibe H, Dobashi K, Uchida N, Nakane, Kodera K, Shirahata A, Taniyama M (2003). Decrease in Serum Adiponectin Level Due to Obesity and Visceral Fat Accumulation in Children. *OBESITY RESEARCH*, 11:1072-1079.
- Atkinson AJ (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 69: 89-95.
- Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK (2018) Highly sensitive electrochemical immunosensor based on polythiophene polymer with densely populated carboxyl groups as immobilization matrix for detection of interleukin 1 β in human serum and saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 270:18-27.
- Bağrıaçık N, Onat H, İhan B (2009). Obesity profile in Turkey. *International of Journal Diabetes Metabolism*, 17:5-8.
- Bekpınar S (2015). *Beslenme Temel Kuralları ve Obezite*. Tıbbi Biyokimya, Ed: F.Gürdöl, Nobel Tıp Yayınları, İstanbul, 481-490.
- Benvidi A, Yazdanparast S, Rezaeinasab M, Dehghan MT, Abbasi S (2018). Designing and fabrication of a novel sensitive electrochemical aptasensor based on poly (L-glutamic acid)/MWCNTs modified glassy carbon electrode for determination of tetracycline. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 808: 311-320.
- Berg AH, Combs TP, Du XL, Brownlee M, Scherer PE (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 7(8):947-953.
- Brabant G, Horn R, Mary M, Wuster U, Schnabel D, Heindenreich F (2000). Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia*, 43: 438-42.
- Brazaca LC, Janegitz BC, Cancino-Bernardi J, Zucolotto V (2016). Transmembrane Protein-Based Electrochemical Biosensor for Adiponectin Hormone Quantification. *ChemElectroChem*, 3: 1006 – 1011

- Brooks NL, Moore KS, Clark RD, Perfetti R, Trent CM, Combs T (2006). Do low levels of circulating adiponectin represent a biomarker or just another risk factor for the metabolic syndrome?. *DIABETES, OBESITY AND METABOLISM*, 9:246-258.
- Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Concidine RV (1996). Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, 45: 1455-1462.
- Chen W, Lei Y, Li CM (2010). Regenerable Leptin Immunosensor Based on Protein G Immobilized Au-Pyrrole Propylic Acid-Polypyrrole Nanocomposite. *Electroanalysis*, 22: 1078–1083.
- Choi MS, Jee SH, Kim Y, Rae Moon K (2012). Leptin, Neuropeptide Y and Islet Amyloid Polypeptide Levels in Obese Children. *PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, HEPATOLOGY & NUTRITION*, 5:166-174.
- Cole TJ, Freeman JV, Preece MA (1995). Body mass index reference curves for the UK, 1990. *Arch Dis Child*, 73:25-29.
- Comba FN, Romero MR, Garay FS, Baruzzi AM (2018). Mucin and carbon nanotube-based biosensor for detection of glucose in human plasma. *Analytical Biochemistry*, 550: 34-40.
- Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GRC, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*, 145(1):367-383.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML (1996). Serum immuno-reactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334(5): 292–5.
- Demirbakan B, Sezgintürk MK (2017). A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1. *Talanta*, 169: 163-169.
- de Onis M, Onyango A, Borghi E, Siyam A, Blössner M, Lutter C (2012). Worldwide implementation of the WHO Child Growth Standards. *Public Health Nutr*, 15:1603-1610.
- Dong F, Luo R, Chen H, Zhang W, Ding S (2014). Amperometric Immunosensor Based on Carbon Nanotubes/Chitosan Film Modified Electrodes for Detection of Human Leptin. *Int J Electrochem Sci*, 9: 6924 – 6935
- Ellis KJ, Shypailo RJ, Pratt JA, Pond WG (1994). Accuracy of dual-energy x-ray absorptiometry for body-composition measurements in children. *Am J Clin Nutr*, 60:660-665.

- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest*, 110: 1093-1103.
- Filip J, Zavahir S, Klukova L, Tkac J, Kasak P (2017). Immobilization of concanavalin A lectin on a reduced graphene oxide-thionine surface by glutaraldehyde crosslinking for the construction of an impedimetric biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 794: 156-163.
- Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM (1997). Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J. Clin. Invest*, 99:14-18.
- Gross A (1998). Bacterial γ -Poly(glutamic acid). *Biopolymers from Renewable Resources*, 3:195-219.
- Guerre-Millo M (2004). Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes & metabolism*, 30(1):13-19.
- He Y, Wong X, Zhang Y, Gao F, Li Y, Chen H, Wang L (2013). An ultrasensitive chemiluminescent immunosensor for the detection of human leptin using hemin/G-quadruplex DNAzymes-assembled signal amplifier. *Talanta*, 116: 816-821.
- He Y, Sun J, Wang X, Wang L (2015). Detection of human leptin in serum using chemiluminescence immunosensor: Signal amplification by hemin/G-quadruplex DNAzymes and protein carriers by Fe₃O₄/polydopamine/Au nanocomposites. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221: 792-798.
- Himms-Hagen J (1999). Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36:575-655.
- Higashiura K, Ura N, Ohata J, Togashi N, Takagi S, Saitoh S, Murakami H, Takagawa Y, Shimamoto K (2004). Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol*, 61(6):753-759.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y (2001). Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 50(5):1126-1133.
- Karaboğa MN (2018). Bazı Nörodejeneratif Hastalıkların Erken Tanısına Yönelik Nörobiyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Klinik Uygulamalarının Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.

- Karaboğa MN, Sezgintürk MK (2018). Determination of C-reactive protein by PAMAM decorated ITO based disposable biosensing system: A new immunosensor design from an old molecule. *Talanta*, 186: 162-168.
- Kılıç M, Taşkın E, Üstündağ B, Gürgöze MK, Kurt AN, Aygün AD (2004). Malnütrisyonlu çocuklarda serum leptin, lipid ve protein düzeyleri ve antropometrik ölçümlerin değerlendirilmesi. *Türk Pediatri Arşivi*, 39: 14- 20.
- Kim DK, Park TJ, Tamiya E, Lee SY (2011). Label-Free Detection of Leptin Antibody-Antigen Interaction by Using LSPR-Based Optical Biosensor. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11:4188-4193.
- Kong D, Jiang L, Liu Y, Wang Z, Han L, Lin J, Lu CH, Chi Y, Chen G (2017). Electrochemical investigation and determination of procaterol hydrochloride on poly(glutamic acid)/carboxyl functionalized multiwalled carbon nanotubes/polyvinyl alcohol modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 174: 436-443.
- Kumar P, Kim KH, Deep A (2015). Recent advancements in sensing techniques based on functional materials for organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 70: 469-481.
- Laviron E (1967). Influence of adsorption of depolariser or of a product of electrochemical reaction on polarographic currents. *Bulletin De La Societe Chimique De France*, 3717-3723.
- Lawal AT (2018). Progress in utilisation of graphene for electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 106: 149-178.
- Lin Y, Liu K, Liu C, Yin L, Kang Q, Li L, Li B (2014). Electrochemical sensing of bisphenol a based on polyglutamic acid/amino-functionalised carbon nanotubes nanocomposite. *Electrochim. Acta*, 133: 492-500.
- Marin S, Merkoci A (2012). Nanomaterials based electrochemical sensing applications for safety and security. *Electroanalysis*, 24: 459-469.
- Martínez-García G, Agüí L, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2017). Multiplexed electrochemical immunosensor for obesity-related hormones using grafted graphene-modified electrodes as platforms for antibodies immobilization. *Procedia Technology*, 27: 187-189.
- Meier U, Gressner AM (2004). Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. *Clin Chem*, 50: 1511-1525.

- Morris BJ (1989). Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol*, 290: 358-368.
- Munyaka PM, Khafipour E, Ghia JE (2014). External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Front Pediatr.*, 2:1-9.
- Must A, Dallal GE, Dietz WH (1991). Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht²) and triceps skinfold thickness. *Am J Clin Nutr* , 53:839-846.
- Nam SY, Kratzsch J, Kim KW (2001). Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of leptin, NPY, and α -MSH in obese women and their relationship to negative energy balance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86: 4849-4853.
- Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigoriva IV, Firsov AA (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Nature*, 306: 666-669.
- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM (2007). The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*, 132:2087-2102.
- Ojeda I, Barrejón M, Arellano LM, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Langa F, Pingarrón JM (2015). Grafted-double walled carbon nanotubes as electrochemical platforms for immobilization of antibodies using a metallic-complex chelating polymer: Application to the determination of adiponectin cytokine in serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 74: 24-29.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules –Adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 100:2473-2476.
- Özcan B, Sezgintürk MK (2017). A novel label free immunosensor based on single-use ITO-PET electrodes for detection MAGE1 protein. *Journal of Electrochemical Chemistry*, 792:31-38.
- Rasmussen MH, Frystkyk J, Andersen T (1994). The impact of obesity, fat distribution and energy restriction on Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1), IGF binding protein-3, insulin and growth hormone metabolism 1994;43:315-9.
- Richard A, Margaritis A (2001). Poly(glutamic Acid) for Biomedical Applications. *Crit. Rev. Biotechnol*, 21:219-232.
- Sanghavi BJ, Varhue W, Chavez JL, Chou CF, Swami NS (2014). Electrokinetic Preconcentration and Detection of Neuropeptides at Patterned Graphene-modified Electrodes in a Nanochannel. *Analytical Chemistry*, 86: 4120-4125.

- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Boeing H (2003). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, 361(9362):1060.
- Silva Magalhães EI, Rocha Sant'Ana LF, Priore SE, Castro Franceschini SD (2014). Waist circumference, waist/height ratio, and neck circumference as parameters of central obesity assessment in children. *Rev Paul Pediatr*, 32:273-281.
- Tanaka M, Yoshioka K, Hirata Y, Fujimaki M, Kuwahara M, Niwa O (2013). Design and Fabrication of Biosensing Interface for Waveguide-Mode Sensor. *Langmuir*, 29: 13111-13120.
- Tatemoto K (1982). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci*, 79: 5485-5489.
- Thanakun S, Watanabe H, Thaweboon S, Izumi Y (2014). Comparison of salivary and plasma adiponectin and leptin in patients with metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6: 19.
- Trashin S, Pchelintsev N (2010). Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev*, 39:1747–1763.
- Trayhurn P, Hoggard N, Mercer J.G (1999). Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity*, 23: 22-28.
- Wang J (2006). *Analytical Electrochemistry*. 3rd ed. Wiley, 272 s, USA.
- Wang M, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR, Wenner BR, Bain JR, Charron MJ, Newgard CB, Unger RH (2010). Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *PNAS*, 107: 4813-4819.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS (2004). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med*, 350:2362-2374.
- Xia N, Gao YP (2015). Carbon nanostructures for development of acetylcholinesterase electrochemical biosensors for determination of pesticides. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 10: 713-724.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med*, 7(8):941-946.
- Yesil M, Donmez S, Arslan F (2016). Development of an electrochemical DNA biosensor for detection of specific *Mycobacterium tuberculosis* sequence based on poly(L-glutamic acid) modified electrode. *J. Chem. Sci*, 128:1823-1829.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the Mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-431.

Zhang Q, Qing Y, Huang X, Li C, Jianjiang X (2018). Synthesis of single-walled carbon nanotubes–chitosan nanocomposites for the development of an electrochemical biosensor for serum leptin detection. *Materials Letters*, 211: 348-351.

EKLER

Etik Kurul Onay Belgesi



T.C
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı:2013/107

05/09/2013

Sayın: Doç. Dr. M. Kemal SEZGİNTÜRK

Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz **“Tümör-İlişkili Otoantikorlar 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 GİRİŞİMSEL 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
GÖKAEK 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 İçin: Engin Deniz RENÇBER
e- posta: edrencber@nku.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Burcu ÖZCAN, 1989 yılında İstanbul'da doğdu. 2012 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 2015 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya-Biyokimya anabilim dalından yüksek lisans derecesini aldı.

Yayınlar:

Özcan B, Demirbakan B, Yeşiller G, Sezgintürk MK (2014). Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: single frequency impedance analysis for biosensing systems. *Talanta*. 125, 7-13.

Özcan B, Sezgintürk MK (2016). Graphene oxide based electrochemical label free immunosensor for rapid and highly sensitive determination of tumor marker HSP70. *Talanta*. 160, 367,374.

Özcan B, Sezgintürk MK (2017). A novel label free immunosensor based on single-use ITO-PET electrodes for detection MAGE1 protein. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 792,31-38.

Bildiriler

Özcan B, Sezgintürk MK, Determination Of C1 Inhibitor Human By Using Screen-printed Gold Electrode Modified with Silane: Highly Sensitive and Disposable Biosensor, Poster Sunumu, 12th Bbmec Workshop On International Biosensor Conference, 25 Eylül 2017- 29 Eylül 2017.

Özcan B, Sezgintürk MK, A Sensitive Immunosensor Based On Indium Tin Oxide Electrodes Modified With Carbonyldiimidazole And Silane For Determination of Tnf α , Poster Sunumu, 3rd International Congress On Biosensors, 05 Ekim 2016-07 Ekim 2016.

Özcan B, Sezgintürk MK, Study Of Disposable ITO Electrode Modified With Organosilanes to Determine SOX2: A Novel Sensitive And Regenerative Biosensor, Poster Sunumu, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 Eylül- 02 Ekim 2016.

Özcan B, Sezgintürk MK, Grafen Temelli, Yüksek Hassasiyete sahip Elektrokimyasal Immunosensör Ve Uygulamaları, Sözlü Sunum, 27.ulusal Kimya Kongresi, 23 Ağustos 2015- 28 Ağustos 2015.

Özcan B, Sezgintürk MK, MAGE-1 Determination By An Impedimetric Immunosensor, Part I: Optimization Experiments, Poster Sunumu, 2nd International Congress On Biosensors, 10 Haziran 2015- 12 Haziran 2015.

Özcan B, Sezgintürk MK, Graphene Based Electrochemical Immunosensor For Determination Of Hsp70, Poster Sunumu, 4th International Conference On Bio-sensing Technology 2015, 10 Mayıs 2015-13 Mayıs 2015.

Özcan B, Sezgintürk MK, Demirbakan B, Yeşiller G, Karaboğa MN, Design of an Ultrasensitive Impedimetric Biosensor Using Anti-PTH for Quantification of Parathyroid Hormone, Poster Sunumu, BIOMED 2013, 12 Kasım 2013-15 Kasım 2013.

Projeler:

113Z678, Tümör-iliskili otoantikolar için kullan-at biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi, 1001 -Araştırmacı, Burslu, 15.03.2014 - 15.12.2016.