

**TÜKÜRÜKTEKİ BELİRLİ
BİYOMARKERLARIN TEK
KULLANIMLIK BİYOSENSÖR
SİSTEMLERİ İLE TAYİNİ VE KANSER
ERKEN TEŞHİSİNDE
KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

ELİF BURCU AYDIN

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal
SEZGİNTÜRK**

2018

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TÜKÜRÜKTEKİ BELİRLİ BİYOMARKERLARIN TEK
KULLANIMLIK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ İLE TAYİNİ VE
KANSER ERKEN TEŞHİSİNDE KULLANIMLARININ
ARAŞTIRILMASI**

ELİF BURCU AYDIN

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 ELİF BURCU AYDIN tarafından hazırlanan “**Tükürükteki Belirli Biyomarkerların Tek Kullanımlık Biyosensör Sistemleri İle Tayini ve Kansere Erken Teşhisinde Kullanımlarının Araştırılması**” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mustafa TEKE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özgür ÖZAY

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

TÜKÜRÜKTEKİ BELİRLİ BİYOMARKERLARIN TEK KULLANIMLIK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ İLE TAYİNİ VE KANSER ERKEN TEŞHİSİNDE KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI

ELİF BURCU AYDIN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Kanser çağın hastalığı olarak bilinir ve insan sağlığını önemli ölçüde tehdit eder. Biyomarkerların tanımlanması ve tayin edilmesi kanserin erken evresinde önemli bir role sahiptir. Biyomarkerler tükürük, serum, plazma ve dokuda bulunurlar. Bu nedenle, kanser biyomarkerlarının biyolojik sıvılarda ölçülerek kanserin erken saptanması mümkündür. Biyomarker ölçümü genellikle serum örneklerinde yapılır. Bununla birlikte, son araştırmalar, tükürükte kandaki çeşitli protein bileşenlerinin de bulunduğunu göstermiştir. Tükürük, kolay erişilebilir biyolojik sıvı olması nedeniyle dikkat çekmiştir. Tükürük örneklerinin toplanması, depolanması ve transferi kolaydır. Tükürük analizi, farklı kanser türlerinin teşhisi için istenen ve umut verici bir platform sağlar. Sonuç olarak, kanser biyobelirteçlerinin doğru ve hassas tespiti, kanserin tedavisini kolaylaştırır. Bu tez çalışmasında kanser biyomarkerlarının vücut sıvılarında tespitini sağlamak amacıyla 6 farklı biyosensör üretilmiştir. Her bir biyosensörde farklı elektrot dizaynları kullanılmıştır. İnterleukin 1 α , interleukin 1 β ve interleukin 8 analizlenmesi hedeflenen kanser biyomarkerlarıdır. 6-fosfonohegzanoik asit (PHA), 3-fosfonopropiyonik asit (PHP), 3-(trietoksisilil)propil isosiyanat (IPTES), lineer polimer poly(glisilmetakrilat), Super P- poly(glisilmetakrilat) polimer kompozit ara yüzey materyalleri olarak kullanılmıştır. Anti-interleukin 1 α , anti-interleukin 1 β ve anti-interleukin 8 biyotanıma elementi olarak kullanılmıştır. Elektrot yüzeyinde yapılan modifikasyonlar elektrokimyasal

teknikler (elektrokimyasal impedans spektroskopisi, dönüşümlü voltammetri) ve morfolojik teknikler (taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu) ile karakterize edilmiştir. Ayrıca antikorlar ile antijenler arasındaki etkileşimi izlemek için sabit frekans impedans ölçümleri de yapılmıştır. Biyosensörlerin tekrarlanabilirliği, tekrar üretilebilirliği, raf ömrü, tekrar kullanılabilme yeteneği de izlenmiştir. Ek olarak, biyosensörlerin klinik başarısını izlemek için serum ve tükürük örneklerinde biyomarker tayini gerçekleştirilmiştir. Gerek ELISA testi gerekse standart katma metodu biyosensörün başarısını kanıtlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Tek kullanımlık elektrot, Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, Tükürük,

2018, 137 sayfa

ABSTRACT

PhD. Thesis

DETERMINATION OF SPECIFIC BIOMARKERS WITH DISPOSABLE BIOSENSOR SYSTEMS AND INVESTIGATION OF USEAGE IN CANCER EARLY DIAGNOSIS

ELİF BURCU AYDIN

Namık Kemal University in Tekirdağ

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Cancer is known as a disease of epoch and it threats human health significantly. The identification and determination of biomarkers has a significant role in the early stage of cancer. Biomarkers are present in saliva, serum, plasma and tissue. Therefore, the early detection of cancer is possible by measuring cancer biomarkers in biological fluids. The biomarker measurement is usually performed in serum samples. However, recent research has displayed that a variety of protein ingredients in blood are also present in saliva. Saliva, has attracted attention due to being easily accessible biological fluid. The collection, storage and transfer of saliva samples is easy. The analysis of saliva provides a desirable and promising platform for the diagnosis of different types of cancers. Consequently, the accurate and sensitive detection of cancer biomarkers facilitates the treatment of cancer. In this thesis, six different biosensors have been produced to detect cancer biomarkers in body fluids. Each biosensor is fabricated with different electrode designs. Interleukin-1a, interleukin-1 and interleukin-8 are the cancer biomarkers targeted for analysis. 6-phosphonohexanoic acid (PHA), 3-phosphonopropionic acid (PHP), 3- (triethoxysilyl) propyl isocyanate (IPTES), linear polymer poly (glycylmethacrylate) and Super P-poly (glycylmethacrylate) polymer composite interface materials. Anti-interleukin 1 α , anti-interleukin 1 β and anti-interleukin 8 were used as biorecognition elements. The modifications performed on the electrode surface are characterized by electrochemical techniques (electrochemical impedance spectroscopy, alternating voltammetry) and morphological techniques (scanning electron microscopy, atomic

force microscopy). Single frequency impedance measurements were also performed to monitor the interaction between the antibodies and the antigens. Repeatability, reproducibility, shelf life, reusability of biosensors has also been monitored. In addition, biomarker determinations were performed in serum and saliva samples to monitor the clinical success of biosensors. Whether the ELISA test is required or the standard addition method proves the success of the biosensor.

Keywords: Disposable electrode, Electrochemical impedance spectroscopy, Human saliva

2018, 137 Pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGE DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
TEŞEKKÜR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER	3
2.1.Biyosensörler	3
2.1.1. Kullanılan Biyotanıma Elementine göre sınıflandırma	4
2.1.2. Kullanılan İletici Sisteme göre Sınıflandırma	6
2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler	7
2.2.1.Amperometrik Biyosensörler	8
2.2.2.Potensiyometrik Biyosensörler	8
2.2.3.İmpedimetrik Biyosensörler	8
2.2.4.Kondüktometrik Biyosensörler	8
2.3.Elektrokimyasal Metotlar	9
2.3.1.Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	9
2.3.2.Dönüşümlü Voltammetri	12
2.3.3.Sabit frekans İmpedans Spektroskopisi (SFI)	13
2.4. Elektrokimyasal İmpedans Temelli Biyosensörler	14
2.4.1.İmmunokimya Temelli İmpedimetrik Biyosensörler	15
2.4.2. Nükleik Asit Temelli İmpedimetrik Biyosensörler	15
2.4.3.Hücre Temelli İmpedimetrik Biyosensörler	16
2.4.4.Enzim Temelli İmpedimetrik Biyosensörler	16

2.5.Kanser.....	17
2.5.1.Kanser Biyomarkerları	18
2.6.Tükürük	21
2.7.Transparent İletken Oksit İnce Filmler (TCO).....	23
2.7.1.İndiyum Kalay Oksit (ITO).....	24
2.7.1.1.ITO Temelli Elektrotların Hazırlanma Stratejileri	24
2.7.2. Florin-doplanmış Kalay Oksit (FTO).....	26
2.7.2.1. FTO Temelli Elektrotların Hazırlanma Stratejileri	27
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1.Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	28
3.3.Ölçüm Parametreleri.....	29
3.4. Dönerek Kaplama (Spin Coating) Yöntemi ile Elektrot Üretimi.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1.Hedef Biyosensörler	32
4.2.Biyosensör 1 (Bio-1)	36
4.2.1.Biyosensör 1'in Optimizasyon Basamakları	42
4.3.Biyosensör 2 (Bio-2)	48
4.3.1.Biyosensör 2'nin Optimizasyon Basamakları	53
4.4.Biyosensör 3 (Bio-3)	59
4.4.1.Biyosensör 3'ün Optimizasyon Basamakları	64
4.5.Biyosensör 4 (Bio-4)	69
4.5.1.Biyosensör 4'in Optimizasyon Basamakları	73
4.6.Biyosensör 5 (Bio-5)	79
4.6.1.Biyosensör 5'in Optimizasyon Basamakları	81
4.7.Biyosensör 6 (Bio-6)	88
4.7.1.Biyosensör 6'nın Optimizasyon Basamakları	94

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	99
6. KAYNAKLAR.....	103
EKLER	103
ÖZGEÇMİŞ	114

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 4. 1. Gerçek serum ve tükürük örneklerinde IL 1 β analiz sonuçları	47
Çizelge 4. 2. Gerçek serum ve tükürük örneklerinde IL 8 analiz sonuçları	58
Çizelge 4. 3. Tükürük örneklerinde IL 8 analiz sonuçları	68
Çizelge 4. 4. Tükürük örneklerinde IL 1 α analiz sonuçları	78
Çizelge 4. 5. Serum ve tükürük örneklerinde IL α analiz sonuçları	88
Çizelge 4. 6. Serum ve tükürük örneklerinde IL α analiz sonuçları	98

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	3
Şekil 2.2. Elektrokimyasal biyosensörlerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Nyquist eğrileri (A) Elektrokimyasal Faradaik sistem, (B) Kinetik kontrol prosesi, (C) Kinetik ve difüzyon kontrollü proses, (D) Elektrokimyasal Faradaik olmayan sistem.....	10
Şekil 2.4. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram.....	13
Şekil 2.5. Kanserdeki moleküler farklılaşma.....	17
Şekil 3.1. Dönerek kaplama (spin-coating) sistemi ile ince film üretimi.....	31
Şekil 4.1. Üretilen biyosensör 1'in şematik gösterimi.....	32
Şekil 4.2. Üretilen biyosensör 2'in şematik gösterimi.....	33
Şekil 4.3. Üretilen biyosensör 3'in şematik gösterimi.....	33
Şekil 4.4. Üretilen biyosensör 4'in şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.5. Üretilen biyosensör 5'in şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.6. Üretilen biyosensör 6'in şematik gösterimi.....	35
Şekil 4.7. Biyosensör 1'e ait immobilizasyon şeması.....	36
Şekil 4.8. Biyosensör 1'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).....	37
Şekil 4.9. PHA modifiye edilmiş elektrotların antikor immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR (A ve B), Raman (C ve D) spektrumları.....	39
Şekil 4.10. Hidroksillenmiş ITO elektrotların PHA ile modifikasyon öncesi ve sonrası yüzeylerinin elementel mapping ve spektrumları.....	40
Şekil 4.11. Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; hidroksillenmiş ITO (A ve B); ara yüzey modifikasyonu sonrası (C ve D); antikor immobilizasyonu sonrası (E ve	

	F); BSA ile bloklama sonrası (G ve H); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü. (I ve J).....	41
Şekil 4.12.	Biyosensör 1'in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PHA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).....	42
Şekil 4.13	Biyosensör 1'in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A) ve antijen inkübasyon süresi (B).....	43
Şekil 4.14.	Farklı IL 1 β konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekansta impedans (D) ölçüm sonuçları.....	44
Şekil 4.15.	Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.....	45
Şekil 4.16.	Biyosensör 2'e ait immobilizasyon şeması.....	48
Şekil 4.17.	Biyosensör 2'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).....	49
Şekil 4.18.	Antikor immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR (A ve B), Raman (C ve D) spektrumları.....	51
Şekil 4.19.	Antikor immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR (A ve B), Raman (C ve D) spektrumları ve PHA modifikasyonu öncesi (E) ve sonrası (F) EDX analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.20.	Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; ara yüzey modifikasyonu sonrası (A ve B); antikor immobilizasyonu sonrası (C ve D); BSA ile bloklama sonrası (E ve F); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü (I ve J).....	53
Şekil 4.21.	Biyosensör 2'nin optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PHA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).....	54

Şekil 4.22.	Biyosensör 2'in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A) ve antijen inkübasyon süresi (B).....	55
Şekil 4.23.	Farklı IL 8 konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekansta impedans (D) ölçüm sonuçları.....	56
Şekil 4.24.	Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.	57
Şekil 4.25.	Biyosensör 3'e ait immobilizasyon şeması.....	59
Şekil 4.26.	Biyosensör 3'ün immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).	60
Şekil 4.27.	FTO elektrotların anti-IL 8 immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları.	61
Şekil 4.28.	Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; hidrosillenmiş FTO elektrotu (A ve B); ara yüzey modifikasyonu sonrası (C ve D); antikor immobilizasyonu sonrası (E ve F); BSA ile bloklama sonrası (G ve H); Antikor-antije etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü. (I ve J).	63
Şekil 4.29.	Biyosensör 3'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) IPTES konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).....	64
Şekil 4.30.	Biyosensör 3'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B)....	65
Şekil 4.31.	Farklı IL 8 konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekansta impedans (D) ölçüm sonuçları.....	66
Şekil 4.32.	Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.	67
Şekil 4.33.	Biyosensör 4'e ait immobilizasyon şeması.....	69

Şekil 4.34.	Biyosensör 4'ün immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).	70
Şekil 4.35.	PHPile modifiye edilmiş elektrotların anti-IL 1 α ile immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları.....	71
Şekil 4.36.	Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; ara yüzey modifikasyonu sonrası (A ve B); antikor immobilizasyonu sonrası (C ve D); BSA ile bloklama sonrası (E ve F); Antikor-antiye etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü (G ve H).....	73
Şekil 4.37.	Biyosensör 4'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) IPTES konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).....	74
Şekil 4.38.	Biyosensör 4'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antiyen inkübasyon süresi (B).....	75
Şekil 4.39.	Farklı IL 1 α konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekansta impedans (D) ölçüm sonuçları.....	76
Şekil 4.40.	Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.....	77
Şekil 4.41.	Biyosensör 5'e ait immobilizasyon şeması.....	79
Şekil 4.42.	Biyosensör 5'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).....	81
Şekil 4.43.	Polimer ara yüzey ile modifiye edilmiş elektrotların anti-IL 1 α ile immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları.....	82
Şekil 4.44.	Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; ara yüzey modifikasyonu sonrası (A ve B); antikor immobilizasyonu sonrası (C ve D); BSA ile bloklama sonrası (E ve F); Antikor-antiye etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü. (G ve H).....	83
Şekil 4.45.	Biyosensör 5'in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PGMA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).....	84

Şekil 4.46.	Biyosensör 4'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B).....	85
Şekil 4.47.	Farklı IL 1 α konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekansta impedans (D) ölçüm sonuçları.....	86
Şekil 4.48.	Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.....	87
Şekil 4.49.	İletken kompozit karışımı, kompozit materyal kaplı elektrotların üretilmesi ve Biyosensör 6'ya ait immobilizasyon şeması.....	89
Şekil 4.50.	Biyosensör 6'nın immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).....	91
Şekil 4.51.	Kompozit ara yüzey ile modifiye edilmiş elektrotların anti-IL 1 α ile immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları.....	92
Şekil 4.52.	Biyosensör immobilizasyon adımlarına ait SEM ve AFM görüntüleri; kompozit modifikasyonu sonrası (A ve E); antikor immobilizasyonu sonrası (B ve F); BSA ile bloklama sonrası (C ve G); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü. (E) Super P, (F) PVDF'e ait SEM görüntüsü.....	93
Şekil 4.53.	Biyosensör 6'nın optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PGMA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B); antikor inkübasyon süresi (C); antijen inkübasyon süresi (D).....	94
Şekil 4.54.	Biyosensör 6'nın optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B)....	95
Şekil 4.55.	Farklı IL 1 α konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.....	96
Şekil 4.56.	Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.....	97

KISALTMALAR DİZİNİ

AC	: Alternatif akım
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
BSA	: Sığır serum albümin
C	: Kapasitör
CV	: Döngüsel voltametri
C_{dl}	: Çift tabaka kapasitansı
CNTs	: Karbon nanotüpler
CPE	: Sabit faz elementi
EDC	: N-(3-Dimetilaminopropyl)-N-etilkarbodiimid
EIS	: İmpedans spektroskopisi
ELİSA	: Enzim bağlantılı bağışıklık testi
FTO	: Florin katkılanmış kalay oksit
FTIR	: Fourier transform kızılötesi spektroskopisi
$Fe(CN)_6^{4-/3-}$: Ferri-ferrosiyandır çözeltisi
fg	: Femtogram
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
ITO-PET	: İndiyum tin oksit polietilen elektrot
L	: İndüktans
LOD	: Algılama sınırı
LOQ	: Kantitatif ölçme sınırı
MIP	: Moleküler baskılanmış polimer
mL	: Mililitre
NH_4OH	: Amonyum hidroksit
ng	: Nanogram
PGMA	: Poli(glisidil metakrilat)

pg	: Pikogram
PHA	: 6-fosfonohegzanoik asit
PHP	: 3-fosfonopropiyonik asit
R	: Resistör
RMS	: Kare ortalama karakök
Ra	: Ortalama pürüzlülük
R _{ct}	: Yük transfer direnci
R _s	: Çözelti direnci
SAMs	: Kendiliğinden oluşmuş tabakalar
SFI	: Sabit frekans İmpedans
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
W	: Warburg impedansı
WHO	: Dünya sağlık örgütü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden bilimsel ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, her türlü imkanı bana sağlayan, deneyimi ve bilgi birikimi ile yoluma ışık tutan, fikirleri ve yol göstericiliği ile bana her konuda destek olan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e gösterdiği sabrı, iyi niyeti için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen ve sürekli arkamda güçlerini hissettiğim, benim bu noktaya gelmemde büyük pay sahibi olan annem, babam ve kardeşime; doktora sürecimde hep yanımda olan ve beni destekleyen biricik hayat arkadaşım eşime çok teşekkür ederim.

Temmuz, 2018

Elif Burcu AYDIN

1. GİRİŞ

Biyosensörler, seçici, duyarlı ve güvenilir analiz sistemleri oldukları için günümüzde çeşitli analitlerin tayininde oldukça önemli bir yere sahiptirler. Bir biyosensör, tayini gerçekleştirilecek olan analite spesifik biyomolekül varlığında gerçekleşen etkileşim sonucunu elektriksel bir sinyale dönüştürür. Biyosensörler, uzun süreler gerektiren diğer klasik analiz sistemlerine göre birçok avantajları barındırmaktadırlar. Biyosensör çalışmaları ve uygulamaları, özellikle son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişme ve yenilikler ile kendilerine destek bulmuş ve gün geçtikçe önem kazanmaktadırlar (Wang 2005a).

Biyosensörlerin en yaygın uygulamalarından biri olan elektrokimyasal tabanlı biyosensörlerin avantajları; küçük miktarları tanımlayabilme özellikleri, ekonomik oluşları, tespitleri için az güç ve hacim gereksinimine sahip olmaları, biyomedikal ve çevre uygulamalarında geniş ölçüm aralıklarında çalışılabilir olmaları olarak tanımlanabilir (Kafi ve Chen 2009; Wang 2005b).

Günümüze kadar birçok tipte biyosensör sistemi geliştirilmiş olup (klinik, medikal, çevre teknolojileri, endüstriyel proseslerin kontrolü gibi) ve her geçen gün yeni bir alanda kullanılmaya devam edilmektedir. Biyosensörlerin en büyük avantajlarından biri klasik analiz metotları ön işleme gerek duyarken, biyosensör sistemleri ön işleme gerek kalmaksızın duyarlı ölçümler yapılabilen minyatürize sistemler olmalarıdır (Balasubramanian ve Burghard 2006)

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) temelli biyosensörler, son yıllarda çok çeşitli analitlerin tayininde kullanılan duyarlı analitik sistemler olarak dikkat çekmektedirler. EIS, analitik çözümler sunmasının yanı sıra membran özelliklerinin belirlenmesi, biyosensör karakterizasyonu ve fabrikasyonu amaçlı araştırmaların yapılmasına olanak sağlamaktadır. EIS, enzim – substrat etkileşimlerinde olan kimyasal reaksiyonların izlenmesine ek olarak, antijen – antikör afinite etkileşimleri, prob DNA, hedef DNA etkileşimleri gibi biyomolekül etkileşimlerinde bağlanma sonrası meydana gelen yük transfer değişimleri yoluyla etkileşimin belirlenebilmesinde de kullanılmaktadır. Moleküler düzeydeki etkileşimlerin oluşturduğu elektriksel değişimler ve bu değişimlerin neticesinde akımda, voltajda, kapasitansta veya impedansta gerçekleşen farklanmaların takibi oldukça önemlidir. Makromoleküllerin yüzey immobilizasyonlarının eş zamanlı izlenmesinde pratik olarak kullanılabilirliği onu çok daha avantajlı kılar (Bahadır ve Sezgintürk 2016b).

Kanser, hücrelerde DNA hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Birçok kanser türü hastalık belirli bir evreye gelinceye kadar belirti

vermezler. Bu nedenle en büyük motivasyon, daha kanser belirtisi yokken tümörün varlığını ortaya koyabilmek olmalıdır. Bu yüzden kanserin erken teşhisine yönelik cihaz ve metotların geliştirilmesi bu hastalık ile mücadelede hayati önem taşımaktadır. Kanser biyomarkerlerinin seviyelerinin serum, idrar ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında ölçülmesi ve sürekli kontrolü hastalıkların erken teşhisine imkân verdiği için oldukça önemlidir. Risk altında olan kişilerin belirli periyotlarda biyomarker seviyelerinin ölçülmesi, kanser oluşumunun başlangıçta teşhis edilmesine olanak sağlayan faydalı bir izlem ve teşhis yöntemidir. Bu bağlamda yeni biyomarkerların bulunması ve bu biyomarkere özgü hızlı, doğru, duyarlı ve tutarlı tayin sistemlerinin geliştirilmesi kanserin erken teşhis ve tayininde büyük ve hayati öneme sahiptir (Bohunicky ve Mousa 2011).

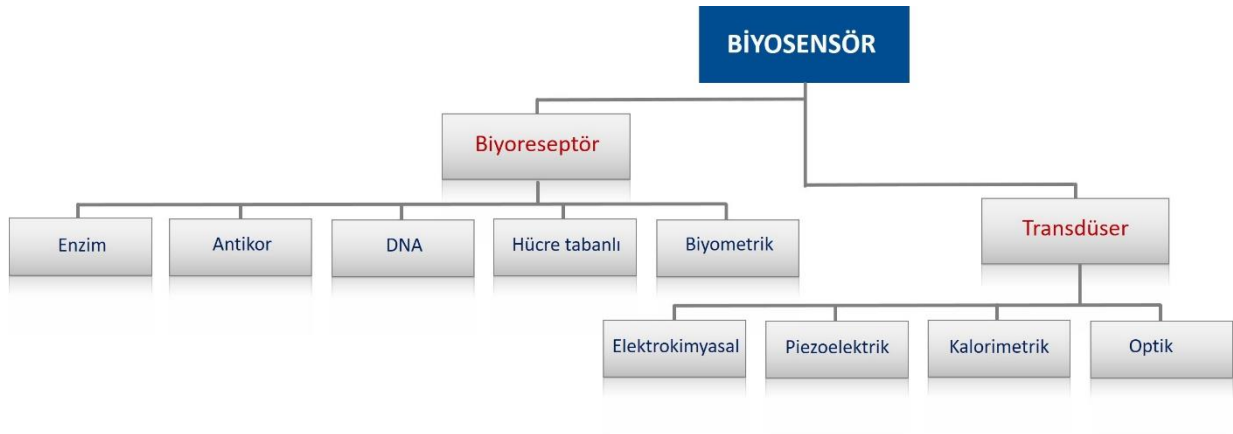
Bu doktora tez çalışmasında 3 farklı biyomarkerin (interleukin 1 β , interleukin 1 α ve interleukin 8) analizi için tek kullanımlık elektrot olarak indiyum kalay oksit (ITO) ve florin doplanmış kalay oksit (FTO) kullanıldığı 6 farklı özgül, yeni ve hassasiyeti yüksek impedimetrik biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmadaki en büyük motivasyonlardan biri geliştirilen bu biyosensörlerin düşük maliyetli, pratik uygulamaya olanak sağlayan, güvenilir sonuçlar veren, düşük tespit limitlerine ve uzun depo ömrüne sahip ve hassas impedimetrik esaslı olmalarıdır. Ayrıca impedimetrik temelli geliştirilen biyosensörlerin üretimi, karakterizasyonu, optimizasyonu ve uygulanabilirliği bu tez çalışmasında birçok ve birbirinden bağımsız teknikler ile test edilmiştir. Literatürde biyosensörlerin uygulanabilirliğinin araştırılması için yapılan birçok çalışmada biyolojik örnek olarak sıklıkla serum kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında seruma alternatif fakat yine kanser biyomarkerlerini barındıran başka bir vücut sıvısı olan ve nispeten kullanımı, elde edilmesi daha hızlı ve kolay olan tükürük üzerinden hastalıkların teşhisi ve geliştirilen sistemlerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tükürük, çok bileşenli oral bir sıvıdır ve noninvazif yollarla hastayı rahatsız etmeden toplanabilir, ayrıca genel sağlık ve hastalıkların izlenmesinde dikkat çekici potansiyele sahip olduğundan literatürde dikkatleri üzerine çekmiştir. Literatürde tükürüğün diagnostik amaçlı biyolojik sıvı olarak kullanılmasına son yıllarda başlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Clark ve Lyon'un öncülüğünde 56 yıl önce geliştirilen biyosensörler analitik çalışmalar yapan araştırmacılara ışık tutmuştur. Araştırmacılar tarafından geliştirilen biyosensörler klinik, kimya, çevre ve farmöstik alanda kullanılan ekonomik ve hızlı araçlardır. Bu biyosensörlerin basit ve portatif kullanımı kompleks örneklerin analizinde biyoanalitik sistemlerde potansiyel alternatifler sunmaktadırlar (Bahadır ve Sezgintürk 2015a).

Biyosensörler 3 temel komponentten oluşur; biyoreseptör, transduser ve sinyal proses edici sistem. Biyotanıma elementi veya biyoreseptör, spesifik hedef analiti tanımaya yarayan immobilize biyokomponentten oluşur. Bu biyokomponentler sıklıkla antiadiler, enzimler ve nükleik asitlerdir. Tranduser ise tanıma olayını ölçülebilir sinyale dönüştürürler (Perumal ve Hashim 2014). Analit ile biyoreseptör arasındaki reaksiyon yeni bir kimyasal ürün oluşumu, ısı salınımı, elektronların akışı, pH ve kütle değişimi gibi çeşitli kimyasal değişimlere sebep olur. Biyokimyasal sinyaller, elektriksel sinyallere transduser vasıtasıyla dönüşür. Sonuç olarak elektriksel sinyal güçlendirilir ve mikroelektroniklere ve data proses ediciye gönderilir (Bahadır ve Sezgintürk 2015a). Biyosensörler, kullanılan biyolojik sinyal verme mekanizmasına ve kullanılan sinyal ileticinin tipine göre sınıflandırılır (Perumal ve Hashim 2014). Şekil 2.1'de biyosensörün farklı kategorileri verilmiştir.



Şekil 2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması.

2.1.1. Kullanılan Biyotanıma Elementine göre sınıflandırma

Biyotanıma elementleri, hedef analitleri tanımadaki rolünden dolayı biyosensörlerin önemli parçalarıdır. Bu yüzden biyotanıma elementinin seçimi tamamen hedef analite bağlıdır ve tanıma elementinin hedefe yüksek bağlanma affinitesine ve stabilitesine dikkat edilir. Klasik tanıma elementleri enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve hücrelerdir. Fakat son zamanlarda fajlar, aptamerler, moleküler baskılanmış polimerler (MIP) ve affikolar dikkat çekmektedir (Justino ve ark. 2015b).

- **Enzimler**

Enzimatik biyosensörlerde, enzim substratı ile seçici bir şekilde etkileşime girer. Enzimatik biyosensör sistemleri enzimlerin katalizini ve/veya hedef tarafından inhibisyonunu ölçebilirler.

- a) Enzim analiti metabolize edebilir, böylece analit konsantrasyonu analitin katalitik transformasyonu ile ölçülür.
- b) Enzim analit tarafından inhibe edilebilir, böylece analit konsantrasyonu enzimatik ürün oluşumunun azalması ile ilişkilidir (Wang ve ark. 2014).

Bu durumda, biyosensör sırasıyla üretilen veya tüketilen türleri tespit eder. Genellikle, enzimatik biyosensörlerde sadece bir enzim kullanılır fakat multi-enzim sistemlerinde kombine enzimler aynı platformda birleştirilir (Crew ve ark. 2011).

- **Antikorlar**

Antikorlar biyosensörlerde kullanılan popüler affinite tanıma elementlerindedir. Gıda güvenliği, çevresel izleme, klinik analizler ve mekanik teşhis gibi bir dizi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Justino ve ark. 2013; Justino ve ark. 2010). Antikorlar, poliklonal (bir dizi immün hücre tarafından üretilen) veya monoklonal (tek kaynaktan; hücrenin benzer klonları tarafından üretilen) olabilir. Poliklonal antikorlar, antijenlere çeşitli yerlerden veya farklı affinite ile bağlanırlar ve monoklonal antikorlar epitop denen aynı hedef bölgeye eşit affinite ile bağlanırlar ve poliklonal antikorlara göre daha seçicidirler (Luo ve Davis 2013).

- **Nükleik asitler**

Biyotanıma elementi olarak nükleik asitler (DNA ve RNA) antikorlara göre kimyasal olarak daha stabildir. Genosensörlerde, DNA veya RNA hedef, yüksek affiniteden dolayı DNA veya RNA elementinin hibridizasyonu ile tanınır. Hibridizasyon, tamamlayıcı DNA baz çiftinin eşleşmesi ile hedef DNA dizisinin spesifik bölgesinde oluşur (Labuda ve ark. 2010).

- **Hücreler**

Canlı organizmalar örneğin bakteri, fungi, maya, alg ve doku-kültür hücreleri tanıma elementi olarak biyosensörlerde kullanılırlar. Hücre temelli biyosensörlerde, analitik sinyal yaşayan canlı organizmanın genel metabolik durumunun ölçülmesi ile tespit edilir (Wang ve ark. 2014). Böylece, büyümenin inhibisyonu, hücre canlılığı ve substrat alımı analitik sinyal olarak değerlendirilir. Biyotanıma elementi olarak hücrelerin enzimlere göre çeşitli avantajları vardır; yüksek stabilite, azaltılmış saflaştırma basamakları gereksinimi, ucuz hazırlama maliyeti, yeterli kofaktör rejenerasyonu gibi (de Carvalho 2011).

- **Fajlar**

Fajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir ve yüzeylerinde peptid ve protein bulundururlar, böylece patojenleri tespit etmede biyotanıma elementi olarak kullanılır. Ev sahibi bakteri üzerinde bulunan spesifik reseptör moleküllerin tanınması ile olay gerçekleşir. Faj biyosensörleri, immunosensörlere göre çevre koşullarına daha dayanıklıdır (Chai ve ark. 2013). Bununla birlikte fajlar bakterilerin tespitinde bakterilere olan spesifikliğinden dolayı oldukça başarılıdır. Çünkü, fajlar bakterilere spesifik olacak şekilde genetik mühendislenmiştir ve sağlam, düşük maliyetli ve üretimi ucuzdur (Tawil ve ark. 2014).

- **Aptamerler**

Aptamerler kısa zincirli 30-40 nükleobazdan oluşan in vitro ortamda hayvan ve hücre kültürüne gereksinim duyulmadan sentezlenen oligonükleotidlerdir (RNA ve tek iplikli DNA) (Barthelmebs ve ark. 2011). Aptamerlerin hedeflere yüksek affinitesi vardır. Aptamerler tipik olarak benzersiz 3 boyutlu yapıya katlanır ve bu katlanma hedef analitlere spesifik bağlanmaya izin verir. Aptamerler, termal olarak stabil olmaları, tekrar kullanılabilir olmadan immobilizasyon için kolay modifiye edilebilir olmaları gibi avantajlara sahiptirler. Kimyasal modifiye edilebilir olması analitin stabilitesini, affinitesini ve spesifikliğini artırır. Ek olarak, çok yönlülüğü ve üretim sırasında hayvan kullanımından kaçınması antikorlarla kıyaslandığında en büyük avantajlarından biridir. Aptamerler bir dizi hedef analitlere örneğin toksinler, antibiyotikler ve biyomarkere bağlanabilir (Justino ve ark. 2015b).

- **Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)**

Son yıllarda biyosensörlerin birçok prototipi örneğin, enzim ve antikorların ekstrem koşullarda düşük stabiliteden dolayı ticari hale gelememektedir. Bu yüzden biyotanıma elementi olarak MIP gibi sentetik matrikslerin kullanımı dikkat çekmektedir. MIP'ler yüksek seçicilik, stabilite, sentezinde kısa süre gereksinimi, yüksek termostabilite ve ucuz maliyet gibi

avantajlara sahiptir. MIPIler, fonksiyonel monomerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu ile hedef analit ve çapraz bağlayıcı içeren karışım içinde üretilir. Bu yüzden, MIP'ler geometrilerden dolayı hedef moleküllerle olan etkileşimlerinde spesifiktir ve bağlanma spesifikliğı tipik antikör-antijen etkileşimi ile aynıdır. Hedef analiti taklit eden kalıp molekül, moleküler oyuklara tanıma yerlerinin varlığında seçici olarak bağlanır. Bu durumda MIP'ler moleküler baskılanmış boşluklar ile sentetik çapraz bağlanmış materyaller olarak düşünülebilirler. Bu boşluklarda yapay tanıma yerleri mevcuttur ve bu sayede doğal reseptörün (örneğin, antikör) biyolojik aktivitesini taklit ederler (Chen ve ark. 2011).

- **Affikörler**

Affikörler, mühendislenmiş affinite proteinlerin yeni sınıfıdır ve izolasyonlarından sonra hedef protein veya peptidlere önemli derecede affinite ve spesifikliğıne sahip olurlar (Justino ve ark. 2015a). Affikörlerin tek domainleri ve 3 heliks yapıları vardır. Heliks üzerinde 13 adet aminoasit pozisyonu vardır. Affikörlerin izolasyonu non-immunoglobulin iskeletine dayanır (Nygren 2008). Affikörler görüntüleme, diagnostik ve terapötikler olarak sıklıkla kullanılmasına rağmen, biyotanıma elementi olarak biyosensörlerde kullanımı yeni başlamıştır. Fakat önümüzdeki günlerde hedef analite affinite ve spesifikliğı sayesinde kullanım açısından potansiyel oluşturmaktadırlar (Justino ve ark. 2015a).

2.1.2 Kullanılan İletici Sisteme göre Sınıflandırma

Biyosensörler kullanılan iletici sisteme göre sınıflandırılabilirler. Transduser, biyosensörün bir bileşenidir ve sinyal tespit etme prosesinde önemli bir role sahiptir. Transduser, fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkileri elektriksel sinyale yüksek hassasiyet ve minimum bozulma ile dönüştüren cihazlar olarak tanınırlar. Literatürde dört temel transduser tipi bulunmaktadır; elektrokimyasal, kolorimetrik, piezoelektrik, optik (Lowe 2007). Elektrokimyasal transduserler, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sonucu üretilen akımı ölçer. Ölçülen bu akımın, elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile ilişkisi vardır.

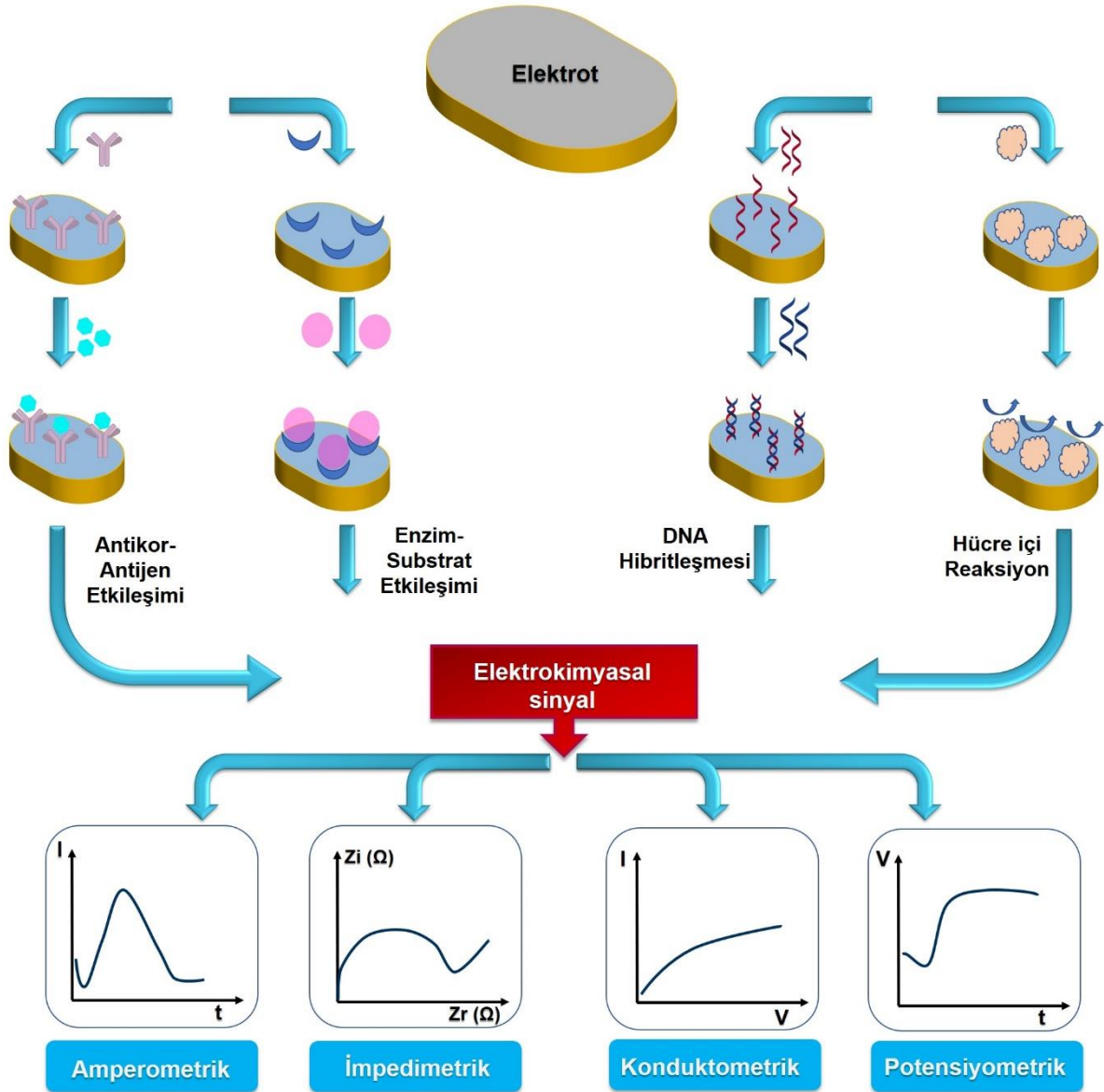
Optik transduser, biyotanıma elementi sonunda oluşan absorbans, fluoresans, fosforesans, refraksiyon ve dispersiyondaki değişimleri ölçer.

Piezoelektrik transduser, piezoelektrik materyalden yapılır ve biyomateryal piezoelektrik materyal ile kaplanır. Bu materyal belli bir frekansta titreşir. Bu frekans dış kaynaklı elektriksel sinyal ile kontrol edilir ve bu sinyal belli bir değerde akım üretir ve hedef analitin biyomateryale bağlanması frekansta kaymaya neden olur ve ilgili analitin kütlesi değişir.

Kalorimetrik transduser, oluşan kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar sonucu oluşan ısı değişimini ölçer (Perumal ve Hashim 2014).

2.2 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörlerin temel prensibi, immobilize biyomolekül ile hedef analit arasındaki kimyasal reaksiyona dayanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Elektrokimyasal biyosensörlerin şematik gösterimi.

Bu reaksiyon sırasında üretilen veya tüketilen elektronlar, elektrolit solüsyonun elektrik akımı veya potansiyel gibi ölçülebilir elektriksel özelliklerini etkiler. Elektrokimyada reaksiyon ölçülebilir bir akım üretiyorsa (amperometrik), ölçülebilir potansiyel veya yük akülasyonu

üretiyorsa (potensiyometrik), ortamın iletkenlik özelliklerini değiştiriyorsa (kondüktometrik), ortamın impedansını değiştiriyorsa (impedimetrik) olarak isimlendirilir (Bahadır ve Sezgintürk 2015b).

2.2.1 Amperometrik Biyosensörler

Biyosensörlerin en yaygın sınıfından biridir. Amperometrik ölçümlerde, akım elektroaktif türlerin oksidasyon ve redüksiyon sonucunda oluşur. Bu tip ölçümler, çalışma elektrodunun (altın, platin, karbon) referans elektroda karşı sabit genlik voltajında, sabit potansiyelde akım numuneden geçerken gerçekleşir. Tipik olarak, akım sabit potansiyelde ölçülür ve bu amperometri olarak isimlendirilir. Eğer akım, potansiyelin kontrollü değişimlerinde ölçülürse voltammetri denir. Amperometrik algılamanın basitlik ve düşük maliyet gibi çeşitli avantajları vardır (Bahadır ve Sezgintürk 2015b).

2.2.2 Potensiyometrik Biyosensörler

Çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel fark, bu iki elektrot arasında önemli bir akım yoksa voltammetre ile ölçülür. Potansiyel fark, örnek solüsyonundaki türlerin oksidasyon ve redüksiyonundan kaynaklanır. Ek olarak, potansiyometri, elektrokimyasal reaksiyonda iyon aktivitesi ile ilgili bilgi verir. İletici sistem, iyon seçici elektrot (ISE) bazlı ince film veya seçici membran olabilir. Analitik bilgi ise ISE biyotanıma prosesinin potansiyel sinyale dönüştürüldüğünde elde edilir (RK ve Kallichurn 2012).

2.2.3 İmpedimetrik Biyosensörler

İmpedimetrik ölçümler, modifiye elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyotanıma olaylarının sonucunda oluşan elektriksel değişimlerin izlenmesinde oldukça kullanışlıdır. Bu tip biyosensörler hedef moleküllerin ve yük transfer direncinin karakterizasyonunda etkili bir şekilde kullanılırlar (Bahadır ve Sezgintürk 2015b).

2.2.4 Kondüktometrik Biyosensörler

Kondüktometrik ölçümlerde, biyotanıma olayı ile iletkenlik arasında bir ilişki bulunmaktadır. İyonik türlerin konsantrasyonundaki değişim solüsyonun elektriksel iletkenliğinde veya akımda değişime neden olur. Kondüktometrik biyosensörler iki metal elektrottan oluşur. Genellikle platin veya gümüş elektrotlar kullanılır; bu elektrotlar birbirine

belli mesafededir. Ohm metre, metal elektrotlar arasındaki konduktanstaki değişimi ölçmek için kullanılır (Conneely ve ark. 2007).

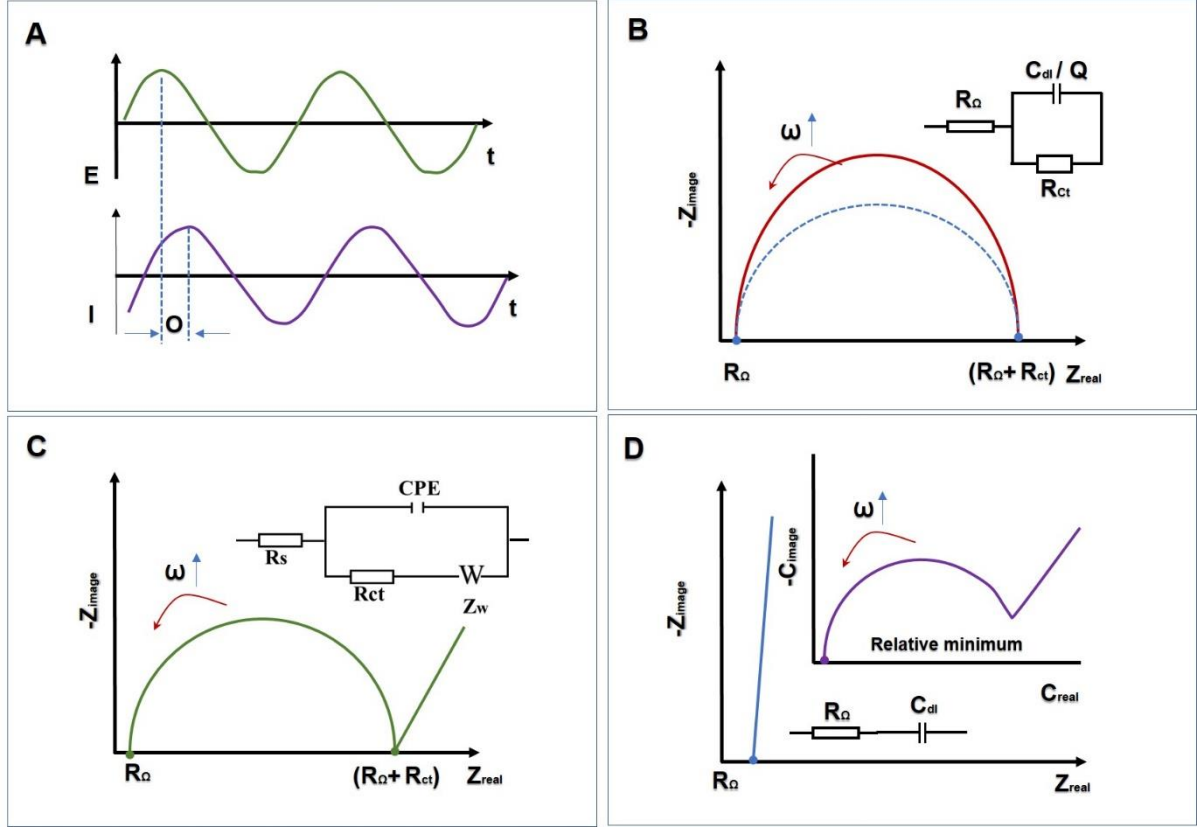
2.3 Elektrokimyasal Metotlar

2.3.1 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

EIS, sistemin kompleks elektriksel direncini analiz eden güçlü bir metottur. Elektrot ve ara yüzeyinde gerçekleşen değişimleri hassas tespit etmeye yardım eder. ‘İmpedans’ terimi, 1886 yılında elektrik mühendisi, matematikçi ve fizikçi Oliver Heaviside tarafından türetilmiştir ve kompleks sayıları elektriksel devrelerin çalışmasına adapte etmiştir. İmpedans ölçümleri elektrokimyada elektrot kinetikleri, çift tabaka çalışmaları, piller, korozyon katı-hal elektrokimyası ve biyoalgılama gibi birçok alanda kullanılmıştır (Muñoz ve ark. 2017).

EIS tekniği, elektrot ara yüzeyindeki elektrokimyasal değişimleri takip ederek kimyasal ve biyolojik analitlerin tayininde kullanılan oldukça popüler bir yöntemdir. Son yıllarda impedimetrik ölçümlere dayanan çok sayıda biyosensör sistemleri geliştirilmiştir (Lisdat ve Schäfer 2008). EIS transduser sinyalinin biyolojik sensör uygulamalarında kullanımı, biyolojik reseptör ve çözeltiden seçici bir şekilde adsorbe olan hedef türler arasındaki etkileşime dayanır. Böyle etkileşimler çözeltideki redoks probu ile iletken elektrot arasındaki ara yüzey elektron transfer kinetiğinde değişime neden olur. Bu elektrokimyasal değişim yük transfer direncinin (R_{ct}) izlenmesi ile tespit edilebilir. R_{ct} 'deki artış, elektrot yüzeyine bağlanan hedeflerin kantitatif miktarındaki artış ile orantılıdır. Bununla birlikte, biyosensör seçiciliği moleküler tanıma elementinin spesifikliğine bağlıdır. Hassasiyet, cevap zamanı, tespit limiti gibi çeşitli analitik parametreler transduserin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır; bu özellik uygun materyal kullanılması ve yeni fabrikasyon dizaynına bağlıdır (Elshafey ve ark. 2013).

EIS tekniği, frekans etki alanında elektrik bilgisi sağlar. Bu teknik ile elektrokimyasal hücrede proses oluşur. Bu proses resistörler (R), kapasitörler (C) ve/veya indüktörlerin (L) kombinasyonu kullanılarak türevlenen eşdeğer devreyle modellenenebilir (Şekil 2.3). EIS ölçümlerinin yorumlanması, impedans verilerinin eşdeğer elektriksel devreye uydurulması ile yapılır; bu fiziksel proseslerin sistemde gerçekleştiğini gösterir. Eşdeğer devreler kullanılarak, deneysel spektrum uygun devre modeli eşliğinde teorik eğriye uydurulabilir, böylece elektriksel parametre değerleri elde edilebilir (Pejcic ve De Marco 2006).



Şekil 2.3. Nyquist eğrileri (A) Elektrokimyasal Faradaik sistem, (B) Kinetik kontrol prosesi, (C) Kinetik ve difüzyon kontrollü proses, (D) Elektrokimyasal Faradaik olmayan sistem.

İmpedans, devre elementinin akımın akışına direnme yeteneği olarak tanımlanır ve bu yüzden devredeki elektriksel akıma karşıt güçtür, birimi direnç ile aynıdır (Ω). EIS genellikle elektrokimyasal hücrede uygulanan sinusoidal alternatif akımın (AC) sonucunu ve hücreden geçen AC akımı ölçer. Salınlı potansiyel elektrot yüzeyine uygulandığında, oluşan akım uygulanan potansiyel ile aynı frekansa sahiptir, fakat fazda kayma olabilir. Fazdaki bu kayma elektrokimyasal sistemin relatif direnç ve kapasitif özelliklerine bağlıdır. Sonuç olarak fazdaki kayma, elektrot yüzeyinde gözlenen fiziksel prosesler ile izlenebilir. Şekil 2.3A'da sisteme uygulanan uyarma sinusoidal sinyal ve kayan fazdaki sinusoidal akımı göstermektedir (Muñoz ve ark. 2017).

İmpedansı tanımlamak için çeşitli yollar vardır. Elektrokimyasal literatürde en sık kullanılan elektron transfer kinetiğinin kullanıldığı Nyquist diyagramlarıdır. Çünkü devre elementlerinin tahmini kolaydır. Nyquist diyagramları Cole-cole plot veya kompleks impedans düzlem plot olarak bilinir (Cole ve Cole 1941); Z_{imag} , Z_{real} 'nin fonksiyonu olarak çizimini içerir, sıklıkla yarı daire profili gösterir ve elektrokimyasal ara yüzeyde sistem dinamiklere görsel bir kavrama sağlar. Eğrideki her deneysel nokta, farklı frekanslara karşılık gelir. Bununla birlikte, Nyquist eğrisi formatı bazı dezavantajlara sahiptir. Örneğin; frekans açık bir şekilde

gözlenemez ve elektrot kapasitansı, frekans bilgisi bilinmeden hesaplanamaz. Bu yüzden, Bode eğrisi impedansın frekansa bağlılığını değerlendiren etkili bir alternatiftir (Muñoz ve ark. 2017).

EIS, sıklıkla Nyquist ve Bode eğriler ile analizlenir. Yukarıda da bahsedildiği gibi EIS verileri genellikle eşdeğer elektriksel devre modeline uydurulması ile analizlenir, gerçek impedans spektrumunu simüle etmek için resistör, kapasitör, indüktans kullanılır. Resistör (R), spesifik proses veya materyalde yük taşıyıcılarını karşılar. Kapasitör (C), yüklü türlerin birikimini gösterir. İndüktans (L), pasif tabaka gibi yüzey tabakalarının birikimini gösterir (Muñoz ve ark. 2017).

Eşdeğer devrelerde kullanılan en önemli elementler;

- Çözelti direnci (R_s): İyonik konsantrasyonuna, iyonların tipine ve elektrot alanına bağlıdır.
- Yük-transfer direnci (R_{ct}): Elektron transfer hızı ile ters orantılıdır.
- Çift tabaka kapasitansı (C_{dl}): Yükleme ve arka plan akımı ile direkt ilgilidir.
- Warburg impedansı (W): Kütle transfer sınırlanmasından türevlenir ve etkili difüzyon katsayısını ölçmek için kullanılır.
- Sabit faz elementi (CPE): İndüktans, resistans, Warburg, kapasitans veya ideal olmayan dielektrik davranışı gibi çeşitli elementlerden türevlenir. Böylece impedans elektriksel ara yüzeyde gerçekleşen çeşitli proseslerle yaygın bakış açısı sunar (Amirudin ve Thieny 1995).

EIS deneyleri faradaik ve faradaik olmayan proseslerde yapılabilir. Faradaik prosesler redoks markerların kullanımı ile yapılır ve bundan dolayı R_{ct} özellikle önemlidir. Diğer taraftan faradaik olmayan sistemlerde redoks probu kullanılmaz; çift tabaka kapasitansı R_{ct} 'den daha kullanışlıdır. Faradaik yaklaşımlarda, elektrokimyasal reaksiyon sınırlayıcı mekanizma ile gerçekleşir; kinetik olarak kontrollü (elektron transfer) ve difüzyon kontrollü (kütle transfer) gibi. Eğer ara yüzeyde elektron transferi oldukça hızlı ise kütle transfer sınırlı prostestir ve durum difüzyon ile kontrol edilir.

Faradaik biyosensörler, modifiye elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyotanıma olaylarını faradaik akımdaki değişiklikleri ölçerek tespit eder. Faradaik akımdaki değişikliklere biyomoleküler arasındaki etkileşimler, hedef moleküller ile serbest yükler arasındaki elektrostatik itmeler ve destekleyici elektrolitteki elektroaktif türler neden olur. Redoks prob seçimi çeşitli parametrelere bağlıdır; yük, hidrofobisite/hidrofilisite, redoks çiftinin büyüklüğü ve modifiye elektrotların kimyasal ve fiziksel özellikleri. EIS ölçümlerinin doğruluğu cihazın teknik kararlılığına ve çalışma prosedürlerine bağlıdır. Fakat materyalin, solüsyonun bulk

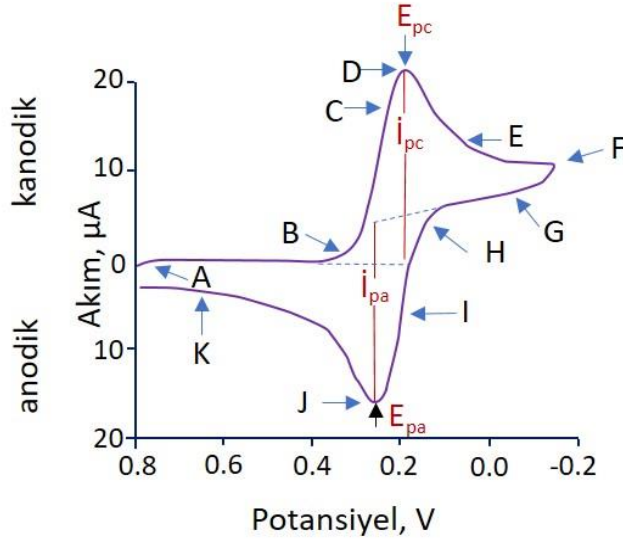
tabakasından elektroda geçişi oldukça hızlı ise, yük transfer kinetiği sınırlıdır ve durum kinetikler ile kontrol edilir (Muñoz ve ark. 2017).

Randles devresi, kinetik kontrol prosesli elektrokimyasal sistemin en basit ve en yaygın elektriksel gösterimidir (Şekil 2.3B). Eğer impedans spektra yarı daire özelliğinde ise, elektrokimyasal sistem elektron transfer hızı ile sınırlıdır ve elektrokimyasal proses kinetik kontrollü anlamına gelir. Bu, Randles hücresi için Nyquist eğrisini gösterir, bir yarı daire çapı ile yüksek ve düşük frekans bölgelerinde iki ekseni içerir, yarı dairenin başlangıcı R_s 'i, yarı daire çapı ise R_{ct} 'yi atf eder. Eğer yarı-daire profiline ek olarak lineer bölge var ise, bu faradaik akımların difüzyon prosesinden etkilendiğini gösterir, bu yüzden elektron transferi hızlıdır ve elektroaktif türlerin difüzyonu sınırlayıcı faktördür. Bu durumda proses difüzyon kontrollüdür denebilir. Bu difüzyon prosesi modifiye Randles eşdeğer devre ile modellenenir. Devre R_s , C_{dl} , R_{ct} ve W içerir. Warburg elementi kütle transfer prosesi elementidir ve düşük frekanslarda baskındır. Şekil 2.3C, karışık kinetik ve difüzyon kontrol prosesli elektrokimyasal sistemin ideal impedans spektrasını göstermektedir (Bisquert 2002). Faradaik olmayan proseslerde, yük transfer direnci ve difüzyon katkıları ihmal edilir ve elektriksel devre R_s ve C_{dl} içerir (Şekil 2.3D). Geleneksel faradaik EIS metotların tersine Faradaik olmayan EIS yaklaşımlarında redoks elementi çözültiye eklenmez ve bu yüzden eşdeğer devreye uydurulmaz, toplam kapasitansın real kısmındaki total kapasitans değerini hesaplamak çok basittir, ayrıca kapasitansın hayali kısmındaki değer oldukça küçüktür ve bu yüzden ihmal edilir (Couniot ve ark. 2015).

2.3.2 Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametrde karıştırılmayan bir çözültide küçük durgun bir elektrotun akım cevabı üçgen dalga şekilli bir potansiyel ile uyarılır.

Dönüşümlü voltametrde belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır ve sonra tarama yönü ters çevrilip potansiyel orijinal değerine getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynıdır. Ters yöndeki potansiyellere döndürme potansiyelleri denir. Döndürme potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının numunenin bileşimine bağlı olarak yönü negatif veya pozitif olabilir. Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında şekil 2.4'deki gibi bir voltammogram elde edilir.



Şekil 2.4. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram.

Yukarıdaki şekilde gösterildiği gibi, gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B'den D'ye kadar ki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe azalırken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F'de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde konsantrasyonu azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır (Skoog ve ark. 2017).

2.3.3 Sabit frekans İmpedans Spektroskopisi (SFI)

Sabit frekansta impedans ölçümü, antikor-antijen ve prob DNA-hedef DNA arasındaki biyotanıma olaylarının ve etkileşimlerin izlenmesinde oldukça önemli bir tekniktir. İmpedans sabit bir frekansta zamana karşı ölçülür. Uygulanacak frekans Bode eğrisi kullanılarak belirlenir. Çünkü Bode eğrisi frekans verisi içermektedir (Aydın ve Sezgintürk 2017b). Ayrıca

SFI tekniği biyosensör yüzeyinde zamana bağlı değişimlerin değerlendirilmesinde kullanılır (Gündoğdu ve ark. 2017). Sonuç olarak deneyin anlık ve total zamanda kontrolü mümkün olur.

2.4 Elektrokimyasal İmpedans Temelli Biyosensörler

Elektrokimyasal reaksiyonlar, elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron transferi reaksiyonları olarak bilinir; elektrolit direncini, elektroaktif türlerin adsorpsiyonunu, elektrot yüzeyinde yük transferini, bulk çözeltiden elektrot yüzeyine kütle transferini içerirler. Her reaksiyon prosesi direnç, kapasitörler veya sabit faz elementlerini paralel veya seri halde içeren bir elektriksel devre ile gösterilir. Basit bir elektrokimyasal reaksiyonun popüler elektriksel devre modeli Randles-Ershler elektriksel eşdeğer devre modelidir, elektrolit direnci (R_s), elektrot/elektrolit ara yüzeyinde yük transfer direnci (R_{ct}) ve Warburg impedansı içerir. Çözelti direnci, çözeltinin iletkenliği ve reaksiyon hücresinin geometrisi ile belirlenir. Elektrotlar arasındaki uzaklık, elektrotların asılı durduğu çözeltinin kesit alanı ile R_s arasında ilişki vardır. Çift tabaka kapasitansı, elektrot ve elektrolit arasındaki etkileşimi gösterir ve elektrot alanına, doğasına, elektrolit iyonik şiddete ve geçirgenliğe bağlıdır. R_{ct} elektron transfer kinetiğini yansıtır ve kütle transfer sınırlaması yokluğunda aşırı potansiyelin akıma oranıdır. Eşdeğer devre modelleri kısmen ve tamamen empirik olabilir, her devre bileşeni elektrokimyasal hücre içinde fiziksel prosesten kaynaklanır ve karakteristik impedans davranışına sahiptir. EIS, özellikle modifiye elektrot ara yüzeyinde oluşan biyotanıma olaylarının incelenmesinde güçlü bir araçtır. EIS tekniğinin en önemli avantajlarından biri bozucu bir teknik olmamasıdır (Bahadır ve Sezgintürk 2016b).

Biyosensörler, transduserin yüzeyinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonu izlemek için dizayn edilmiştir (Helali ve ark. 2006). Enzimler, antikorlar, hücreler ve mikroorganizmalar temel tespit elementleridir. Elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde, temel gereksinim biyomoleküllerin elektrot yüzeyine tekrar üretilebilir ve biyolojik aktivitesini koruyacak bir şekilde immobilizasyonudur. Literatüre göre, impedimetrik biyosensörlerin dizaynında çeşitli stratejiler kullanılmaktadır;

- Altın elektrotların üzerine tiyol bazlı kimyasal ile kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturma,
- Oksid bazlı (ITO, yarı iletken (Si/SiO₂) ve metal oksid) elektrotların silan tabakası ile fonksiyonlanması,
- İletken polimer kaplı elektrotların yüzeyine biyomoleküllerin tutuklanması veya kovalent bağlanması,

- Elektropolimerizasyon ile oluşturulmuş iletken olmayan filmlerin üzerine biyomoleküllerin kovalent bağlanması (Bahadır ve Sezgintürk 2016b).

2.4.1 İmmunokimya Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

İmpedimetrik immunosensörler, antikor-antijenin etiketsiz tespitinde hassas bir tekniktir. İmpedimetrik immunosensörlerde, antikorlar elektrot, optik tel veya yarı iletken çip üzerine immobilizasyon ve son yıllarda çeşitli alanlarda tespit amaçlı kullanılmaktadır. Antijenin antikora bağlanarak immunokompleks oluşturması ile elektrot yüzeyi bir bloklayıcı tabaka ile kaplanır. Bu durumda redoks probunun elektrot yüzeyine girişi engellenir ve elektron transfer direnci artar (Hou ve ark. 2013).

İmpedimetrik immunosensörlerin hazırlanmasında en önemli basamak, biyomoleküllerin elektrot yüzeyine immobilizasyonudur. Çünkü kararlı, tekrar üretilebilir ve seçici bir biyosensör geliştirmek esansiyel bir amaçtır. Örneğin, altın yüzeye fiziksel olarak adsorplanan antikorların denastürasyona uğrayıp affinite kaybetmesi beklenen bir durumdur (Chullasat ve ark. 2011).

2.4.2 Nükleik Asit Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

Elektrokimyasal nükleik asit sensörleri, kompleks örneklerde hassas ve ucuz nükleik asit tayini gerçekleştirir. Bu tip sensörler, çok az sayıda PCR bazlı amplifikasyon basamağı gerektirir ve hedef saflaştırma gerektirmez.

Aptamerler, yapay tek iplikli DNA veya RNA oligonükleotidlerdir ve son yıllarda nükleik asit bazlı biyosensörlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Proteinler, küçük moleküller, hücreler, virüsler ve bakteriler gibi çeşitli hedef moleküllere aptamerler yüksek affinite ile spesifik bağlanabilir.

İmpedimetrik teknikler kullanarak hedef zincirlerin hibridizasyonu, konformasyonel değişimler veya DNA hasarları izlenebilir. Hedefin bağlanmasından sonra 3 şekilde değişimler oluşur; (1) hibridizasyonun direk tespiti (label free), (2) hedef nükleik asit zincirinin redoks maddeler/nanopartiküllerle etiketlenmesi, (3) sinyal problemlerinin (indirek etiketler) baz çiftlerine interkalasyonu ve elektrostatik olarak fosfat sırtına bağlanması veya çift heliks kanal içine yerleşmesi (Regan ve ark. 2014).

DNA biyosensörlerinin geliştirilmesinde çeşitli nanomateryaller örneğin, altın nanopartiküller (AuNPs), kuantum noktalar, karbon nanotüpler (CNTs), FePt/ZnS

nanoçekirdek kabuk, grafen oksit/ altın nanoform R_{ct} 'deki değişimleri güçlendirmek ve DNA hibridizasyonun hassasiyetini arttırmak için kullanılmıştır (Bahadır ve Sezgintürk 2016b).

2.4.3 Hücre Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

Hücre temelli biyosensörlerde, bakteri ve prokaryotik hücreler tespit sistemi olarak kullanılır. Biyotanıma olaylarında hücrelerin kullanımı, yerinde analizlerde dış etkenlere karşı dayanıklı olması, çeşitli hücrelerin yaşaması için gerekli çeşitli büyüme ortamlarına sahip olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Banerjee ve Bhunia 2009).

Biyolojik hücreler, protein içeren lipid çift tabakadan oluşan hücre membranlarından dolayı farklı elektriksel özelliklere sahiptir. Lipid moleküllerinin hidrofilik yüzeyleri sulu ortama, hidrofobik karbon zincirleri ise membran içine yönelecek şekilde düzenlenmiştir. Hücrelerin içinde membran kaplı örneğin mitokondri, vakuol ve nükleus gibi organeller ve çözünmüş yüklü moleküller bulunur. Hücre membranları yalıtkan olmasına rağmen hücre içi oldukça iletkendir (Yang ve Bashir 2008).

Bakteriyel impedimetrik biyosensörler deneysel kurulumda bakteri hücrelerinin lokasyonuna bağlı olarak 2 tipte sınıflandırılabilir. Birinci tipte, analit ve bakteri modifiye elektrotlar arasında etkileşimler impedansta değişime sebep olur. İkinci tipte, analit varlığında büyüme sonucu üretilen metabolitler impedansta değişime sebep olur (Bahadır ve Sezgintürk 2016b).

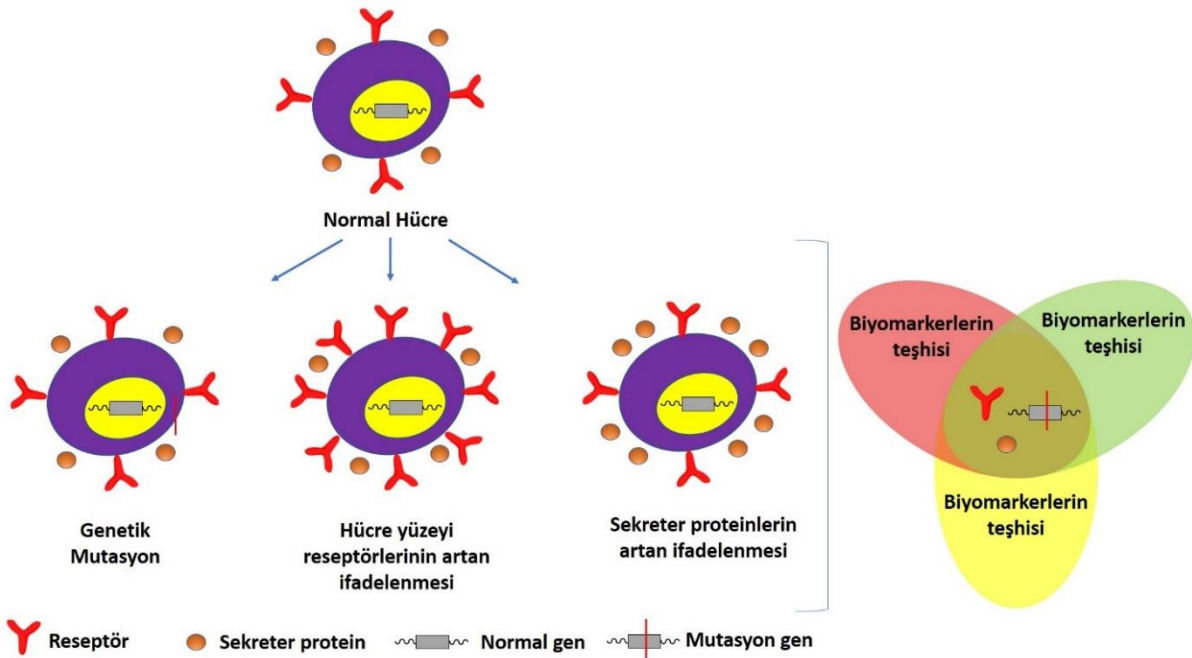
2.4.4 Enzim Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

Enzimin elektrot yüzeyine etkili immobilizasyonu, biyosensörlerin fabrikasyonunda anahtar basamaktır. Fiziksel adsorpsiyon, kovalent ataçlama, tutuklama, çapraz bağlama veya affinite çeşitli immobilizasyon stratejileridir. Her immobilizasyon metodu avantajlar ve dezavantajlar içerir. Uygun tekniğin seçimi enzimin doğası, transduser ve tespit moduna bağlıdır. Enzim immobilizasyonunda en iyi metot maksimum hassasiyet ve stabilite sağlayandır. Immobilizasyon metodu, enzim denaturasyonu veya konformasyonel değişikliğe sebep oluyorsa hassasiyet düşer. Enzim denaturasyonu ve aktif yerlerin bloklanması aktivite kaybına yol açar. Bunun çözümü ise enzim ve destek arasında ara kol kullanılmaktadır. Enzim ile (strept)avidin molekülleri, lektinler veya şekerler arasında affinite etkileşimlerine dayanan teknikler enzimlerin düzenli ve yer spesifik immobilizasyonuna imkân tanır ve etkili biyosensör geliştirme açısından önemlidir. Aynı şekilde, kendiliğinden oluşan tabakalar temelli

immobilizasyon rastgele düzenlenmeyi azaltır; tek düze, tekrar üretilebilir ve kararlı yapılar sağlar (Sassolas ve ark. 2012).

2.5 Kanser

Kanser, dünyada yaşamı tehdit eden en ölümcül hastalıklardan biri olarak bilinir ve 200'e yakın farklı kanser tipi belirlenmiştir ve her gün 1500'den fazla insanın ölümüne sebep olmaktadır. Günümüzdeki teknolojik ilerlemelere rağmen, kanser hastalığının ileriki evrelerde teşhisi ve kanserin zayıf öngörüsü yüzünden bu hastalıktan kurtulma oranı oldukça düşüktür (Jayanthi ve ark. 2017). Kanser, anormal ve kontrolsüz hücre büyümesi sonucu oluşan bir hastalıktır. Spesifik genetik akümülyasyon, çevresel ve kalıttan orjinlenen epigenetik defektler sonucu oluşur. Kontrolsüz hücre büyümesi, tümör kütesinin büyümesine neden olur (Bohunicky ve Mousa 2011). Ultrases, manyetik rezonans görüntüleme, biyopsi gibi genetik metotlar erken basamak kanser tespiti için yeterli değildir çünkü bu metotlar tümörün fenotipik özelliklerine bağlıdır. Kanser, çok basamaklı bir hastalıktır. Kanser başlangıç ve ilerlemesi, genetik veya epigenetik değişimlerle ilgilidir (Şekil 2.5). Bu değişimler hücre sel sinyalleme yi bozar, tümorigenik değişimlere ve tümörlere neden olurlar (Del Sol ve ark.. 2010).



Şekil 2.5. Kanserdeki moleküler farklılaşma.

2.5.1 Kanser Biyomarkerları

Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI), biyomarkeri ‘kan, diğer vücut sıvıları veya dokularda bulunan, normal veya anormal proses ve koşul veya hastalığın sinyali olan biyolojik molekül’ olarak tanımlamaktadır. Ayrıca, bir biyomarkerin, hastalığın tedavisinde vücut cevabının izlenmesinde kullanılabilirdiği belirtilmiştir (Bohunicky ve Mousa 2011). Biyomarkerler nükleik asitler, proteinler, metabolitler, koenzimler veya hormonlar olabilir. Biyomarkerleri teşhis, prognostik ve belirleyici olmak üzere 3 sınıfa ayrılır. Teşhis biyomarkerları, hastalıkların tespiti ile ilgilidir, oysa prognostik biyomarkerlar hastalıkların tekrarında uygulanacak yol hakkında bilgi sağlar. Belirleyici biyomarkerlar ise tedavinin cevabını tahmin etmede kullanılırlar (Fong ve Winter 2012). Hücredeki spesifik biyomarkerların varlığı, yokluğu ve değişimi kanserin gelişimini gösterir. Biyomarkerler hücre içi veya hücre dışı olabilir. Analiz öncesinde intraselüler markerların toplanması ve eğer konsantrasyonu düşük ise deriştirilmesi gerekmektedir (Chatterjee ve Zetter 2005).

Biyokimya, immünoloji ve moleküler biyolojiye dayalı metotlar ve stratejiler insan serumunda tümör markerlerinin tespitinde kullanılmaktadır. İmmünoassay teknikler, tümör markerlerinin tespitinde kullanılan yaygın test metotlarıdır. Çünkü oldukça spesifik moleküler tanıma bölgesine sahip antibadi ve antijen epitopu içerirler. Radyoimmünoassaylar, enzim-bağlı immunosorbent assay (ELİSA), fluroimmünoassay, kemilüminesans immünoassay ve elektrokemilüminesans immünoassay başlıca immünoassay tekniklerdir. Bu tekniklerin, duyarlılık, kesinlik ve seçicilik gibi avantajlara sahip olmasının yanında radyasyon tehlikesine sahip olması, uzun zaman alması, yüksek maliyet, uzmanlaşmış personel gereksinimi ve komplike cihaz gereksinimi gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Bohunicky ve Mousa 2011).

Tüm kanser türleri çok bileşenlidir ve birden fazla molekül içeren hücrede çoklu olaylar ile ilişkilidir. Bu yüzden çoklu biyomarkerların simultane tespiti doğru diagnosis ve prognosis için esansiyeldir. Klinik kanserin temelinde analitik tekniklerin geliştirilmesi bulunmaktadır. Son yıllarda kanser biyosensörlerine olan ilgi harika analitik performans ve eş zamanlı ölçümlerden dolayı hızla artmaktadır. Fizyolojik örneklerde düşük tespit limitleri sayesinde, biyomarkerların çok hassas tespitini sağlayarak kanseri erken basamakta teşhis eder. Biyotanıma elementinin tekrar kullanılması ve basit örnek hazırlama gereksinimi biyosensörlerin avantajlarındandır. Ek olarak, biyosensörler çoklu biyomarkerların eş zamanlı tespitinde oldukça yüksek potansiyel gösterir (Jayanthi ve ark. 2017).

- **İnterleukin 1 α (IL 1 α)**

İnterleukin 1 α ilk keşfedilen potansiyel öncül sitokindir, ayrıca endokrin ve merkezi sinir sisteminde sistemik ve parakin taşıyıcı olarak davranan çoklu polipeptittir. Erkek germ hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde büyüme faktörü olarak aktiftir (Sultana ve ark. 2000).

IL 1 α , 159 aminoasitten oluşur ve immün cevabın regülasyonunda rolü vardır (Schoch and Pomytkin). IL 1 α , aktiflenmiş makrofajlar, nötrofiller, epitel ve endoteliyal hücreler tarafından üretilir (Cervin Serrano ve ark. 2014). Makrofajlarda aktif üretiminin tersine, IL 1 α temel olarak iltihapla ilişkili olmayan koşullarda karaciğer, deri, özofagus, midenin ön kısmı ve testisler gibi çoklu hücrelerde üretilir (Sultana ve ark. 2000). IL 1 α , ağız yassı hücre kanseri (Chianeh ve Prabhu 2014; Mishra 2012), baş ve boyun yassı hücre kanseri (Polanska ve ark. 2014; Russo ve ark. 2016), dil kanseri (Korostoff ve ark. 2011) gibi kanser türlerinde biyomarkerdir. IL 1 α , biyomarkerinin oral yassı hücre kanserindeki aralığı serumda 0-137 pg/mL, tükürükte 175-1000 pg/mL'dir (Hamad ve ark. 2011).

- **İnterleukin 1 β (IL 1 β)**

İnterleukin 1 β , iltihaba neden olan bir anahtar sitokindir ve enfeksiyon, hücre sel yaralanma veya antijenik durumlarda salgılanır. Bu sitokin direk olarak çeşitli hücre tiplerini etkiler ve iltihaba neden durumları indükler. En büyük IL-1 β üreticileri makrofajlardır ve makrofajlardan başka epidermal doku, mukoza epitel hücreleri, tükürük bezlerinin asinar ve duktal hücreleri de IL 1 β üretirler. IL 1 β , insan akciğer, kolon, meme, ağız kanseri ve deri melanomlarının bir biyomarkeridir. IL 1 β 'nin biyolojik sıvılardaki konsantrasyonu oldukça düşüktür. Sağlıklı insanlarda IL 1 β konsantrasyonu serum ve tükürükte ~212.8 pg/mL ve <10 pg/mL'dir. Klinik bulunma düzeyi ise serum ve tükürük örnekleri için ~753.7 pg/mL ve >10 pg/mL'dir. Yeterince düşük olan IL 1 β konsantrasyonunun tespiti için hassas analitik metotlar gerekli olduğundan sıklıkla ticari ELISA kitleri kullanılmıştır. Literatürde biyosensörler ile IL 1 β tayini oldukça azdır. Krause ve arkadaşları (2015) magnetik boncuklar ve altın nanopartiküllerle güçlendirilmiş hassas mikrofluidik array geliştirerek kanser hastalarında IL 1 β tayininde kullanılmıştır (Krause ve ark. 2015). IL 1 β ve anti- IL 1 β antikora konjuge altın nanopartikülün moleküler bağlanmasına dayanan fiber optik plazmon rezonans sensor, Chiang ve arkadaşları (2010) tarafından geliştirilmiştir. Bu biyosensörün lineer aralığı ve tespit limiti 0.05-10 ng/mL ve 21 pg/mL'dir (Chiang ve ark. 2010). Baraket ve arkadaşları (2017) çalışma elektrodu silikon substrat üzerinde bulunan sekiz altın mikroelektrot olan bir biyosensör geliştirmiştir. Bu biyosensörün lineer aralığı 1-15 pg/mL, tespit limiti ise 0.3 pg/mL'dir (Baraket ve ark. 2017).

- **İnterleukin 8**

İnterleukin 8 (IL 8) iltihaba neden olan bir kemokindir ve C-X-C kemokin alt takımında yer alır (Matsushima ve Oppenheim 1989; Sun ve ark. 2014). IL 8 aktif monositler, makrofajlar, T hücreleri, nötrofiller, NK hücreleri, endotelial hücreler, bir dizi epitel hücreler ve fibroblastlar gibi çeşitli hücreler tarafından ifadenir (Mukaida ve ark. 1992). IL8 ifadenmesindeki artış beyin, meme, boyun, kolorektal (Sun ve ark. 2014), gastrik, akciğer, melanom, ovaryum, prostat, böbrek, ağız (Rajkumar ve ark. 2014) ve tiroid (Xie 2001) kanserinde gözlenmiştir. Çeşitli kanser türlerinde yüksek IL 8 düzeyleri prognostik faktör olarak tanımlanır (Zarogoulidis ve ark. 2014). Ayrıca, yüksek IL 8 düzeylerinin miyokardiyal damar tıkanıklığının işareti olduğu literatürde belirtilmiştir (Velásquez ve ark. 2014). Wong ve arkadaşları, IL 8 düzeylerinin ağız kanseri hastalarında 750 ± 236 pg/mL, kontrol grubunda 250 ± 130 pg/mL olduğunu belirtmiştir (Wong 2006). Ek olarak, IL 8 proteinin ağız kanseri hastalarındaki eşik değeri sağlıklı bireylere göre 600 pg/mL'dir (Dong ve Pires 2017; Torrente-Rodríguez ve ark. 2016). Sağlıklı bireylerde IL 8 temel klinik düzeyi 5-10 pg/mL'dir (Sharma ve ark. 2016).

IL 8 biyomarkerının tespiti için ticari olarak ELISA kitleri bulunmaktadır. Bu kitler büyük ve pahalı cihaz, ilave kimyasallar, protokol uygulaması için çok zaman gerektirir (Sharma ve ark. 2016). Biyosensörler yüksek hassasiyet, düşük maliyet ve hızlı cevap açısından bir alternatiftir. Literatürde IL 8 tayinine yönelik biyosensörler sınırlı sayıda. Wan ve arkadaşları (2011) screen-printed karbon arrayı çalışma elektrodu olarak kullanan bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Anti-IL 8 antikor, primer antikor olarak kullanılmış ve screen printed karbon elektrot üzerine immobilizlenmiştir. Karatürp peroksidaz (HRP)- çoklu duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs)- anti-tavşan IgG kompozit ise çoklu etiketlenmiş nanoprob olarak kullanılmıştır. Bu biyosensörün tespit limiti 8 pg/mLdir (Wan ve ark. 2011). Bir elektrokimyasal magnetosensör Toreente-Rodríguez ve arkadaşları tarafından IL 8 proteinini ve IL 8 mRNA'sını insan tükürüğünde tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. Tespit limitleri IL 8 mRNA için 0.21 nM IL 8 proteini için 72.4 pg/mL olarak bulunmuştur (Torrente-Rodríguez ve ark. 2016). IL 8 tespitine yönelik başka bir çalışmada, çalışma elektrodu olarak screen printed dual elektrot kullanılarak ve HRP enzimi etiketlenmesi ile amperometrik IL 8'in tespiti gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, absorbans tespit sistemine dayanan optik mikrofluidik biyosensör, tükürük protein biyomarkerlarının tespitinde kullanılmıştır. Bu biyosensör politiyofen-C70 yığından imal edilen organik fotodetektör içermektedir. Geliştirilen bu biyosensörün tespit limiti 80 pg/mL'dir. Biyosensörün başarısı IL 8 ELISA kit kullanarak test edilmiş ve biyosensörden elde edilen sonuçların ELISA kit ile uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır (Dong ve

Pires 2017). Son yıllarda, tükürükte bulunan IL 8'in birkaç fg/mL düzeyi Sharma ve arkadaşları tarafından impedimetrik olarak tayin edilmiştir. Araştırmacılar karboksilik asit uçlu monotiyoal alkan PEG asit film modifiye altın elektrot kullanmışlar ve IL 8 proteinin tespiti EIS tekniği ile gerçekleştirilmiştir (Sharma ve ark. 2016).

2.6 Tükürük

Tükürük, on yıldan fazladır diagnostik araç olarak ilgi çeken vücut sıvısıdır. Tükürük üzerinde yapılan araştırmalar sonunda araştırmacılar, tükürüğü değerli sıvı olarak nitelemişler ve hastalıklar hakkında bilgi verebileceğini ve kan veya üre ile yapılan testlere yardımcı olacağını belirtmişlerdir. Tükürük, çok bileşenli oral sıvıdır ve noninvazif yollarla toplanabilir, ayrıca genel sağlık ve hastalıkların izlenmesinde dikkat çekici potansiyele sahiptir. İnsan tükürüğü çok çeşitli proteinler ve peptidler içerir, bu proteinlerin her biri çeşitli biyolojik fonksiyon taşır. Yeni teknolojilerin gelişimi (örneğin biyoinformatik, metabolik, genomik ve proteomik) ile tükürük çok çekici klinik bir araç olarak önem kazanmıştır (Chianeh ve Prabhu 2014). İnsan tükürüğü, çeşitli biyolojik fonksiyonlarla ağız sağlığının bakımı açısından esansiyeldir. Bilim adamları geçmişte tükürüğün biyolojik fonksiyonları ile oldukça ilgilenmişlerdir ve sistematik ve oral hastalıklarda indikatör olarak kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. Tükürüğün içindeki zengin çeşitte moleküllerin varlığı, hastalık biyomarkerları açısından tükürüğü zengin kılar. Tükürüğün şu anki HIV, kanser, kardiyak hastalıkları ve oto-immün hastalıkların teşhisinde kullanımı, tükürüğün klinik teşhiste yararlı bir kurtarıcı olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, bu hastalıkların tükürük analizi ile tespiti birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir (Al Kawas ve ark. 2012).

İnsan tükürüğü 3 farklı ana tükürük bezlerinden salgılanır; kulak alt bezi, çene altı bezi ve dilaltı bezidir (Zhang ve ark. 2013). Tükürükte en çok bulunan bileşen sudur ve %99'unu oluşturur (Arduini ve ark. 2016; Liu ve Duan 2012). Katı bileşenler insandan insana değişmek koşulu ile sulu fazda çözünürler ve gün içinde aynı bireyde farklı zamanlarda değişebilir. İnorganik türler, Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{+2} , HPO_3^{-2} , HCO_3^- , Mg^{+2} ve NH_3 içeren zayıf ve güçlü iyonlardan oluşur. Organik türler, vücut salgı ürünleri (üre, ürik asit ve kreatinin); bozulma ürünleri (putresin ve kadverin); lipidler (kolesterol, yağ asitleri) ve 400'den fazla tipte proteinler içerir. Bu proteinlerden birçoğu bez orjinlidir (α -amilaz, histatinler, sitatinler, laktoferrinler, lizozimler, musinler ve prolin-zengin proteinler) veya plazma-türevleri (albümin, salgı immunoglobulin A ve transferrin) (Liu ve Duan 2012; Radhika ve ark. 2016). Spesifik tükürük makromolekülleri, örneğin; proteinler veya nükleik asitler tükürük analizinde odak noktalarıdır

(Nagler 2009). İnsan tükürük proteom analizi doğal olarak ilgi çekicidir, çünkü insan tükürüğü geniş aralık konsantrasyonunda büyük çeşitlikte proteinler içerir. Örneğin, α -amilaz, oysa sitokinler tipik olarak pg/mL aralığındadır (Liu ve Duan 2012).

Sağlıklı yetişkinler günde yaklaşık olarak 500-1500 mL tükürük üretir ve üretim hızı dakikada 0.5 ml'dir, fakat çeşitli fizyolojik koşullar tükürük oluşumunu kantitatif ve kalitatif olarak değiştirir. Tükürük kandan kapiler duvarlara, doku içi boşluklara ve kanal hücrelerden tükürük bezi kanalının lümenine transfer edilir. Tükürüklerin toplanması için çeşitli protokoller önerilmiştir. Tükürüğün salınımı çeşitli yollarla uyarılmasına rağmen, uyarılmamış tam tükürük 9-12 saatleri arasında toplanan tükürük bilgi verici olduğu düşünülmektedir. Tam tükürük, majör ve minör tükürük bezi salgılarının, diş eti sıvısının, bronşiyal ve geniz salgısının, ağız yaralarının kan türevleri, mikroorganizmalar, lökositler, deskuamat epitel hücreleri ve gıda kalıntılarının karışımıdır (Chianeh ve Prabhu 2014).

Tükürüğün, hastalıkların teşhisinde örnek olarak kullanılma nedeni, insan serumunda var olan maddeleri içermesidir. Epitel hücrelerin ince tabakası, tükürüğü sistemik dolaşımdan ayırır ve maddelerin tükürüğe aktif taşıma, hücre membranından difüzyon veya konsantrasyon gradienti ile pasif difüzyonu taşınmasını sağlar. Tükürüğün, teşhis ortamı olarak kullanılmasının başlıca avantajları, örnekleme kolay ve non invanzif olması böylece kan toplanması sırasında rahatsızlık ve ağrıyı, üre toplamı sırasında oluşan mahremiyet hissini elime eder. Ek olarak, kan ile karıştırıldığında, tükürük küçük miktarda proteinler içerir, bu yüzden nonspesifik interferans ve hidrostatik etkileşimlerin potansiyel riskini azaltır. Kan içinde protein konsantrasyonu proteinlerin yarı ömrüne bağlı olarak birkaç saniyeden birkaç aya kadar değişir. Tükürüğün kompozisyonu kompleks değildir, zamanla vücut akış koşullarını daha doğru yansıtır. Sonuç olarak, tükürük yerel olarak ifadelenen proteinleri ve diğer maddeleri içerir, bu hastalıkların indikatörleri olarak kullanılabilir. Bu bileşenler biyomarkerler olarak adlandırılır, bireyin sağlık koşulları ile doğrudan ilgilidir ve hastalık vücudu etkilediğinde büyük oranda değişir (Liu ve Duan 2012). Tükürüğün vücudun sağlığını yansıttığı düşünülmese rağmen, tükürüğün diagnostik araç olarak kullanılmasını sınırlayan sebep, tükürükte bulunan biyomarkerler hakkındaki bilgi eksikliği, hastalık etiolojisi ile korelasyonu ve bu biyomarkerleri tespit edecek metot eksikliğidir. Tükürükte bulunan bazı biyomarkerlerin günlük/24 saatlik değişimleri, serumdaki konsantrasyonların gerçek değerindeki değişimini yansıtmaz, bu da tükürüğün diagnostik ortam olarak kullanılmasında dezavantajdır. Tükürükteki bazı biyomarkerlerin konsantrasyonu kandan 300-3000 kat daha azdır. Doğru ve hassas tespit metotları tükürüğün potansiyel diagnostik ortam olarak kullanılmasını sağlar (Chianeh ve Prabhu 2014).

Tükürük biyomarkerlarının kullanım gerekçeleri:

- Tükürük geniş aralıkta bileşenler içerir,
- Kolayca ulaşılabilir,
- Bağışlama prosedürü stressizdir,
- Hastalık tespitinde non-invasif metottur,
- Güvenlidir,
- Kan örneklerine göre daha az bulaşma olasılığı vardır,
- Saklanması ve transferi kolaydır,
- Pıhtılaşma sorunu yoktur (Chianeh ve Prabhu 2014; Liu ve Duan 2012).

Tükürük analitlerinin tespitinde bugünkü ilerlemeler elektrokimyasal metotları içerir. Elektrokimyasal sensörler, yüksek hassasiyet, spesifikklik ve yıkıcı olmayan metotlardır ve çeşitli biyomoleküllerin tayininde kullanılır. Hızlı, kullanımı basit, non-invanzif ucuz ve biyomarkerlerin doğru tespitini erken basamakta sağlayan metotlar umut vaat etmektedir. Bu çalışmada, farklı aşamalar kullanılarak modifiye edilmiş tek kullanımlık elektrotlar, tükürükte kanserin erken teşhis belirteçleri olan biyomarkerlerin tespiti araştırılacaktır. Tek kullanımlık elektrotlar, elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde ucuz ve iletken olmasından dolayı avantaj sağlarlar. Tek kullanımlık elektrotların son yıllarda çalışma elektrodu olarak kullanılması dikkat çekmiştir (Arduini ve ark. 2016).

2.7 Transparent İletken Oksit İnce Filmler (TCO)

Transparent iletken oksit ince filmleri raporlayan ilk araştırmacı Badeker'dir (Mattox ve Mattox). TCO'ların iyi elektriksel iletkenlik ve ışığı düşük absorblama yeteneği olmak üzere iki önemli özelliği vardır. TCO'lar sıklıkla ince film teknolojisi ile fabrike edilir ve dokunma panellerinde, düz panel göstergelerinde transparan elektrot olarak kullanılır. Bu aplikasyonların yanı sıra, biyosensör ve sensör teknolojisinde elektrot materyali olarak kullanılır (Khan 2016; Sohn ve Han 2011). İlk TCO, CdO ince filmidir ve Cd metalinin termal olarak oksitlenerek film oluşturmasıyla hazırlanır. Kalay oksit (TO) ileri oksidasyon metodu ile 1937 yılında ilk kez hazırlanmıştır. Transparan iletken indiyum oksit ise 1954 yılında metal ince filmlerin ileri oksidasyonu ile hazırlanmıştır. En önemli TCO kalay doplanmış indiyum oksittir ve indiyum kalay oksit olarak bilinir (Mattox ve Mattox). Diğer TCO materyaller ise Al-doplanmış ZnO, CdInOx, SnO₂ ve F-doplanmış In₂O₃ (Lewis and Paine 2000). ITO materyalinin mevcudiyeti indium elementinin bulunabilirliğine bağlıdır. Endüstri analiz firması NanoMarkets'e göre

2019 yılında iletkenler 4.6 milyar \$ ve ITO dışındaki transparen iletkenler ise 1.8 milyar \$ bütçeye sahip olacağını öngörmektedirler (Aydın ve Sezgintürk 2017a).

2.7.1 İndiyum Kalay Oksit (ITO)

İndiyum Kalay Oksit (ITO), 9:1 oranında indium (III) oksit (In_2O_3) ve kalay (V) oksit (SnO_2) içeren çözelti karışımıdır (Stadler 2012). ITO ince film direk akım/radyo frekans magnetron püskürtme, iyon ışın püskürtme, elektron ışın buharlaştırma, kimyasal buhar depolama ve kimyasal çözeltide depolama gibi birçok teknoloji ile üretilir. Özellikle kimyasal çözeltide depolama metodu daldırma veya döndürerek kaplama tekniğini kullanan basit ve ucuz bir metottur (Khondoker ve ark. 2012).

ITO, iyi optik transparanlık, geniş çalışma aralığı, yüksek elektriksel iletkenlik, düşük kapasitif akım ve kararlı elektrokimyasal ve fiziksel özelliklere sahip harika bir materyaldir. Bu benzersiz özellikleri yüzünden biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılır (Tang ve ark. 2006). ITO tabakalar geleneksel elektrotlara (altın, gümüş, platin) göre oldukça ucuzdur ve bu yüzden sıklıkla tercih edilir (Fan ve ark. 2015). Birçok araştırmacı tarafından tercih edilmesine rağmen indiyumun artan maliyeti ve üretim prosesi sırasında yüksek sıcaklık gereksinimi gibi dezavantajlara sahiptir (Lee ve ark.. 2016).

Son yıllarda, ITO kaplı cam veya polietilen tereftalat (PET) elektrotlar klinik teşhis, gıda analizleri ve çevresel izlemede kullanılmıştır (Aydın ve Sezgintürk 2017a).

2.7.1.1 ITO Temelli Elektrotların Hazırlanma Stratejileri

Son yıllarda birçok araştırmacı TCO bazlı biyosensörler geliştirmişler ve bunların tespit mekanizması elektrokimyasal, kemilüminesans ve optik tekniklere dayanmaktadır. ITO tabakalar ucuz olmasından dolayı tek kullanımlık elektrot olarak kullanılmıştır. ITO elektrot modifikasyonunda genellikle silanlama, elektroforetik depolama, elektrokimyasal depolama, polimerizasyon ve adsorpsiyon olmak üzere 5 farklı metot kullanılmıştır.

Nanomateryaller çeşitli yapıda, boyutta ve kompozisyonda biyosensörlerin fabrikasyonunda sıklıkla harika elektronik iletkenlik ve büyük yüzey alanından dolayı kullanılmıştır. Ek olarak nanomateryal kullanımı sensör sinyalini ve hassasiyetini artırır, biyotanıma elementleri için immobilizasyon matriksi olarak, elektrokimyasal reaksiyonlarda katalizör ve elektron transferini hızlandırmak için kullanılmaktadır. Metal ve metal oksit nanopartiküller örneğin, AuNPs, CNTs, grafen, PAMAM, ve yarı iletkenler ITO bazlı

biyosensörler geliştirmede ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır (Aydın ve Sezgintürk 2017a).

- **Silanlama**

Antibadiler, reseptörler, enzimler ve DNA gibi biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu biyosensör geliştirmede en önemli basamaktır. Elektrot yüzeyinde organik kendiliğinden oluşmuş tabakalar (SAMs) biyotanıma elementi için çok fonksiyonlu ara yüzey tabakalar olarak kabul edilir. Silan temelli SAM'ler ITO elektrot yüzeyinde hazırlığı basitliğı, iyi tekrar üretilebilirlik ve yüksek stabiliteleri sayesinde sıklıkla kullanılmıştır (Yang ve Li 2005). ITO elektrot, H₂O₂ içeren bazik solüsyona daldırıldığında hidroksil grupları oluşur. Silan bazlı kimyasallar Si-O bağıları nedeniyle ITO yüzeyindeki hidroksil gruplarından dolayı çapraz bağılayıcı olarak davranırlar (Arya ve ark. 2007). Silan SAM'ların son grupları biyotanıma elementleri için immobilizasyon matriksi olarak davranırlar. Ek olarak, SAM'ler çok ince yalıtkan bir tabakaya neden olurlar ve bu da akımı ve spesifik olmayan adsorpsiyonu engeller (Yang ve Li 2005).

Silanlama metodu ile çeşitli silanlayıcı ajanlar kullanılarak birçok ITO temelli biyosensörler geliştirilmiştir (Aydın ve Sezgintürk 2017b; Bahadır ve Sezgintürk 2016a; Canbaz ve Sezgintürk 2014; Gündoğdu ve ark. 2017; Ozmen ve ark. 2009). Silanlayıcı ajanlar ITO yüzeyinde tek düze bir tabaka oluşturduğundan biyotanıma elementlerinin sıralı immobilizasyonuna imkan tanır (Aydın ve Sezgintürk 2017a).

- **Elektroforetik Depolama**

Elektroforetik depolama, ITO elektrot modifikasyonunda kullanılan diğeri bir tekniktir. Kumar ve ark. (2016) (Kumar ve ark. 2016) hafnia nanopartikülleri hidroksillenmiş elektroda elektroforetik olarak depolamıştır. Başka bir çalışmada Tiwari ve ark. (2015) grafen oksit-demir oksit-kitosan hibrid nanobiyokompoziti katodik depolama ile ITO elektrot yüzeyine depolamışlardır. Sharma ve ark. (2016) ise oksalik asit-Fe₃O₄ nanoçubukları ITO elektrot yüzeyinde elektroforetik olarak depolamıştır. Yüksek voltajda daha fazla nanoçubuğun immobilize olduğunu ve tekdüze bir tabaka oluştuğı gözlenmiştir (Tiwari ve ark. 2015).

- **Elektrokimyasal Depolama**

Çeşitli materyallerin direk elektrokimyasal depolanması ITO temelli biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Singh ve ark. (2015) altın nanoagregatları ITO substrat yüzeyine elektrodepolayarak bir DNA biyosensörü geliştirmişlerdir (Singh ve ark. 2015). Başka bir çalışmada Yagati ve ark. (2016) grafen oksit-altın nanopartikül hibrid yapıları indirgenme

prosesi kullanarak katodik koşulları ITO mikrodisk elektrot çip üzerine elektrodepolamışlardır (Yagati ve ark. 2016).

- **Adsorpsiyon**

Biyosensör fabrikasyonunda hayati basamak, biyotanıma elementleri için gerekli düzenli yapıların oluşturulmasıdır. Lagmuir Blodgett tekniği elektrot yüzeyinde tek tabakaların oluşturulmasında önemlidir. Son yıllarda, çinko, demir, titanyum gibi nanoyapılı metal oksitler istenilen oryantasyonda ve konformasyonel değişime neden olmadan biyotanıma elementi immobilizasyonuna imkân tanıdığından sıklıkla kullanılmaktadır. Pandley ve ark. (2016) amino fonksiyonlanmış silika kaplanmış çinko oksidi ITO elektrot yüzeyine tabaka tabaka (LBL) tekniği kullanarak immobilizlemişlerdir (Pandey ve ark. 2016).

Döndürerek kaplama yüzeylerde tek düze ince film oluşturmak için kullanılan oldukça basit bir tekniktir. Bu tekniğin prensibi küçük bir damla sıvının substrat merkezine damlatılması ve substratın yüksek hızla döndürülmesine dayanır. Merkezkaç kuvveti damlanın substrat yüzeyinde ince bir film oluşturmasını sağlar (Tyona 2013). Örneğin El-Said ve arkadaşları (2014) polistiren partiküllerin ITO yüzeyinde ince film oluşturulmasını sağlamıştır. Başka bir çalışmada Singh ve ark. (2015) Grafen oksit ve karboksil fonksiyonlanmış karbon nanotüpleri ITO ve grafit elektrot üzerine immobilizlemişlerdir (El-Said ve Choi 2014). Çeşitli polielektrolitler ITO elektrot yüzeyine tabaka tabaka tekniği ile kaplanmıştır. LBL tekniği ucuz bir metottur ve oldukça hassas nanosensörlerin fabrikasyonuna imkân tanır (Han ve ark. 2016).

- **İletken polimerlerin elektropolimerizasyonu**

İletken polimerler, elektrokimyasal biyosensörlerin üretilmesinde dikkat çeken materyallerdir. Çünkü iletken polimerler elektrot yüzeyinde hızlı elektron transferine neden olurlar. Polianilin ve polipirol basit sentez mekanizmalarından, yüksek iletkenlik özelliğinden, yüzey özelliklerinin kontrol edilebilirliğinden ve çevresel stabilitelerinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Bu polimerler geçiş metallerle kompozit oluşturularak başarılı bir şekilde biyosensörlerde kullanılmaktadır. Bu polimerler elektrokimyasal ölçümler için iyi iletkenlikleri sayesinde yüksek hassasiyet ve düşük tespit limitleri sağlarlar (Aydın ve Sezgintürk 2017a).

2.7.2 Florin-doplanmış Kalay Oksit (FTO)

Florin doplanmış kalay oksit (FTO) filmler en düşük özdirence sahip TCO'lardır. Kimyasal buhar depolama (CVD), püskürtme, spreylendirme ve sol-jel döndürerek kaplama gibi

metotlar kullanılarak hazırlanırlar. Sol-jel döndürerek kaplama büyük yüzey alanlarında, eşit kalınlıkta ve uygun morfolojide en basit ve en ucuz tekniktir (Velázquez-Nevárez ve ark. 2016). FTO spektrumun görünür aralığında yüksek optik transparanlık ve yüksek iletkenlik gösterir. Bu yüzden güneş hücreleri, optoelektronik cihazlar, organik ışık yayma diyotları ve transparan transistörlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Noroozifar ve ark. 2014). FTO mekanik olarak, kimyasal olarak ve elektrokimyasal olarak stabildir (Banyamin ve ark. 2014). İndiyumun dünyada hızla azalmasından dolayı ITO pahalı ve termal olarak stabil değildir. FTO, ITO'ya göre daha maliyetsiz ve stabildir. Bu yüzden ITO'nun yerini alacağı düşünülmektedir (Lee ve ark. 2014).

2.7.2.1 FTO Temelli Elektrotların Hazırlanma Stratejileri

FTO elektrotların biyosensör teknolojisinde kullanımı oldukça yenidir. Bu yüzden çok fazla örneği literatürde bulunmamaktadır. ITO modifikasyonu için kullanılan teknikler FTO modifikasyonunda da kullanılmıştır. Prabhakar ve ark. (2016), kitosan-demir oksit nanokompozit içeren solüsyona FTO elektrotları daldırarak bir film oluşturmuşlardır. Daha sonra nanokompozit kaplı elektrot streptavidin ve biyotinlenmiş aptamer immobilizasyonu ile hedef molekül olan malatyon tespitine hazır hale gelmiştir (Prabhakar et al. 2016). Başka bir çalışmada Kaur ve ark. (2016) poli(3,4-etilendioksitiyofen)-MWCNTs nanokompozitini FTO elektrot yüzeyine depolayarak asetilkolon esteraz enzimi için gerekli olan matriksi hazırlamışlardır. Asetilkolin esteraz enzimi matrikse kovalent olarak bağlanarak malatyon analizinde kullanılmıştır (Kaur ve ark. 2016). Song ve ark. (2014) FTO elektrodu aseton-saf su kaynamış etil alkol kullanarak temizledikten sonra 3-iyodopropiyonik asit içeren çözeltiye daldırılmış, 1 gece bekleterek tek düze tabakaların kendiliğinden oluşmuş tabakaların oluşması sağlamıştır. Hazırlanan bu elektrot kullanılarak serotonin analizi gerçekleştirilmiştir (Song ve ark. 2014). Li ve ark. (2017) nitrojen depolanmış grafen/altın nanopartikül nanokompoziti FTO elektrot üzerine elektrokimyasal olarak depolamıştır. Kitosan ile aktif karboksil uçlar oluşturulduktan sonra fruktosilamino asit oksidaz enzimi elektrot yüzeyine immobilizlenerek glikat hemoglobin tayin edilmiştir (Li ve ark. 2017).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar

DeneYler esnasında kullanılan tüm analitik saflıktaki kimyasallar, çalışma elektrodu olarak kullanılan İndiyum kalay oksit ile kaplanmış polietilen tereftalat film (Yüzey öz direnci ve transmittansı 60 ohm/cm ve 500 nm (>%79); ITO-PET) ve florin doplanmış kalay oksit ile kaplanmış cam (Yüzey öz direnci ve transmittansı <10 ohm/cm; FTO) ve çalışmada biyotanıma elementi olarak kullanılan Interleukin-8 (IL-8), Interleukin 1 α (IL-1 α), Interleukin 1 β (IL-1 β) antikolar ve bu antikolara spesifik antijenler Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)’den temin edilmiştir. İletkenlik arttırıcı karbon siyahı (TIMCAL Carbon Super P® conductive carbon black +99 %) ve kompozit içerisinde bağlayıcı (binder) olarak kullanılan Polivinildenflorür (PvDF, 99.5%) MTI-XTL’den temin edilmiştir. Çalışma elektrotu olarak kullanılan FTO cam (eni 0,5 cm, boyu 1 cm), ITO PET (eni 0,5 cm, boyu 2 cm) boyutunda kesilerek kullanılmıştır. Elektrot üzerinde kendiliğinden oluşan tabakalar elden etmek için kullanılan 6-fosfonohexanoik asit, 3-fosfonopropiyonik asit, 3-(trietoksisilil)propil isosiyanat ve elektrot yüzeyinde film oluşturmak için kullanılan poliglisisidil metakrilat polimeri Sigma-Aldrich’ten temin edilmiştir. Tüm antijen ve antikolar, sıgır serum albumin (BSA) 0,01 M pH=7,4 fosfat tamponu kullanılarak ile hazırlanmıştır ve -20°C’ de saklanmıştır.

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmaları kapsamında, kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiş ölçüm parametreleri, stratejileri, yöntemleri ve kullanım amaçlarından kısaca bahsedilmiştir.

- **Potentiostat / Galvanostat**

FTO cam ve ITO PET elektrotta uygulanan bütün immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımlarının takibi için döngüsel voltametriden (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. Ölçümler Gamry Potentiostat/Galvanostat (Reference 1000, Gamry Cihazlar, Warminster, PA, USA) kullanılarak 3’lü elektrot sisteminde yapılmıştır. Tek kullanımlık elektrot olan FTO/ITO çalışma elektrodu; platin elektrot yardımcı elektrot, Ag/AgCl ise referans elektrot olarak kullanılmıştır. 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 K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda

gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır.

- **FTIR Spektrometresi (FTIR)**

Elektrot yüzeyinde yapılan immobilizasyon çalışmaları öncesi ve sonrası FTIR spektrumları için Bruker VERTEX 70 FTIR-ATR infrared spektrometresi kullanılarak 4000-400 cm^{-1} arasında ölçümler yapılmıştır.

- **Dispersif Raman Spektrometresi (DXR RAMAN)**

Elektrot yüzeyinde yapılan immobilizasyon çalışmaları öncesi ve sonrası RAMAN spektrumları için 780 nm lazer ile donatılış Thermo DXR RAMAN spektrometresi kullanılarak 3200-400 cm^{-1} arasında ölçümler yapılmıştır.

- **Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Geliştirilen biyosensörlerin yüzey ve morfolojik özelliklerinin aydınlatılmasında, immobilizasyon basamakları sırasında yüzeydeki değişikliklerin takibi ve tayini amacıyla FEI QUANTA FEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı kullanılmıştır. SEM ölçümleri sırasında hazırlanan elektrotlar herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan düşük vakum (low vacuum) çalışma modunda ve düşük ivmelendirme potansiyellerinde elektrotlara zarar verilmeden görüntülenmiştir.

- **Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)**

Üretilen biyosensörlerin yüzey ve morfolojik özelliklerinin aydınlatılması immobilizasyon basamakları sırasında yüzeydeki değişikliklerin takibi ve tayini ve ayrıca yüzey SEM görüntülerinin desteklenmesi için NanoMagnetics AFM Plus Atomik Kuvvet Mikroskobu kullanıldı. Hazırlanan elektrotların AFM ölçümleri Tapping modda oda sıcaklığında ölçülmüştür.

- **Dönerek Kaplama Cihazı**

Elektrot yüzeylerin ara yüzey materyalleri ile kaplama işlemleri MTI Corp. VTC-50 spin coater serisi kaplama cihazı yardımıyla yapılmıştır.

3.3. Ölçüm Prosedürleri

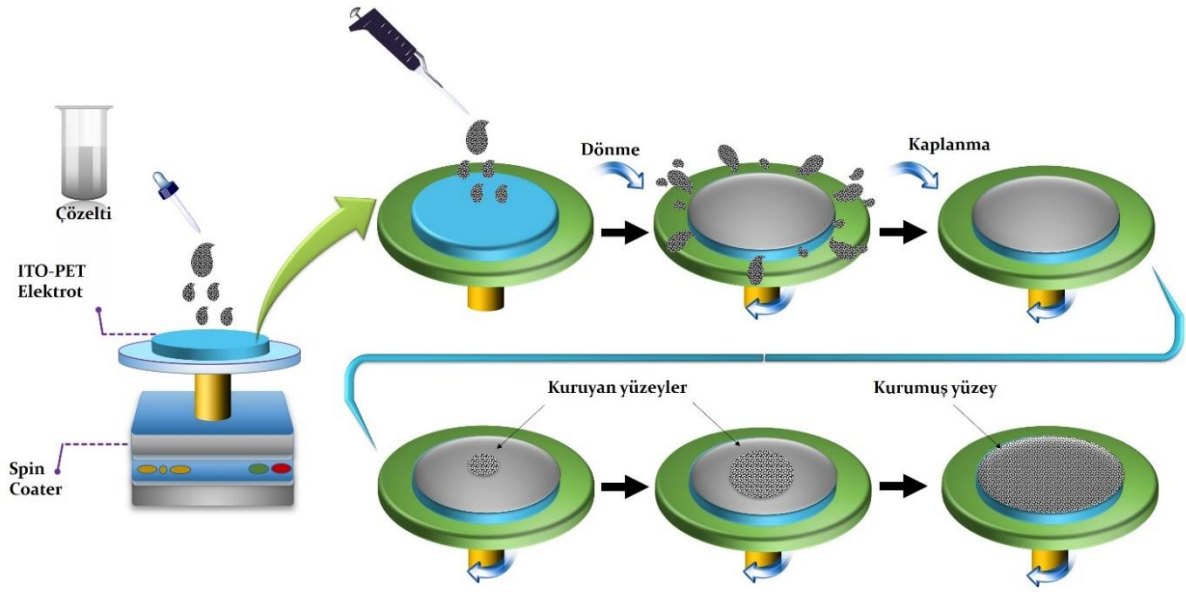
Tek kullanımlık biyosensör olarak kullanacak ITO ve FTO elektrotlar, öncelikle elektrotların yüzeyinde bulunan organik kontaminantları uzaklaştırmak için ultrasonik banyoda

10'ar dakika süre ile sırasıyla aseton-sabun çözeltisi ve saf su uygulanarak elektrotların temizliği sağlandı. Daha sonra antikorların immobilizasyonuna imkân tanıyacak şekilde elektrotlar modifiye edildi. Üzerinde kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturmak için elektrotlar 1:1:5 oranında sırasıyla $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ içeren çözeltinin içerisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İyice yıkanan elektrotlar SAM oluşturmak için uygun konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltilere daldırıldı. Döndürerek kaplama ile modifiye edilecek elektrotlar ise uygun konsantrasyonda hazırlanan polimerin uygulanması ile döndürerek kaplama cihazı ile modifiye edildi. Böylece elektrotlar antikor immobilizasyonuna hazır hale geldi. Maksimum immunosensor cevabına ulaşmak için antikorun konsantrasyonu ve inkübasyon süresi optimize edildi. Elektrot yüzeyinde açıkta kalan fonksiyonel grupları kapatmak için elektrotlar sığır serum albumin çözeltisine (BSA) daldırıldı. Daha sonra elektrotlar antikorlara spesifik antijen içeren fosfat tamponuna daldırıldı ve inkübasyon süresi optimize edildi.

3.4. Dönerek Kaplama (Spin Coating) Yöntemi ile Elektrot Üretimi

Tek kullanımlık biyosensörlerin üretimi ve geliştirilmesinde, kullanılacak elektrot materyalleri olarak ITO (indiyum-kalay-oksit) elektrotlar uygulama kolaylığı ve maliyet bakımından hem avantajlı hem de en çok tercih edilen materyallerdendir. ITO elektrotların tek kullanımlık biyosensörlerde kullanımı ile ilgili literatürde oldukça fazla çalışma bulunmaktadır (Aydın ve Sezgintürk 2017a; Sivasubramanian ve Sangaranarayanan 2015). İstenilen fonksiyonel gruplara sahip elektrot üretimi için polimer tabanlı malzemeler hem düşük maliyette hem de kolay uygulanabilme açısından en güçlü adaylardır. Burada karşılaşılan en büyük problem polimerlerin ITO yüzey üzerine bağlanmasıdır.

Bu çalışmada dönerek kaplama (spin coating) yöntemi ile biyosensör elektrotların ara yüzey polimer modifikasyonları tek adımda hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem özellikle ince film üretiminde ucuz, oldukça pratik ve uygulanabilirliği kolay olan bir yöntemdir. Bu metodun temel özelliği oluşturulacak film tabakasının homojen yapıda olmasıdır. Spin coating yöntemi aşama aşama şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Spin coating yöntemi, bir çözelti damlasının kaplanacak destek malzemenin merkezine damlatılması ve sonrasında sistemin yüksek dönme hızlarında döndürülmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntemin temel özelliği, istenilen çözeltilerin kaplanacak yüzey üzerine her yerde aynı kalınlıkta olacak şekilde homojen bir şekilde kaplanabilmesidir.



Şekil 3.1. Dönerek kaplama (spin coating) sistemi ile ince film üretimi.

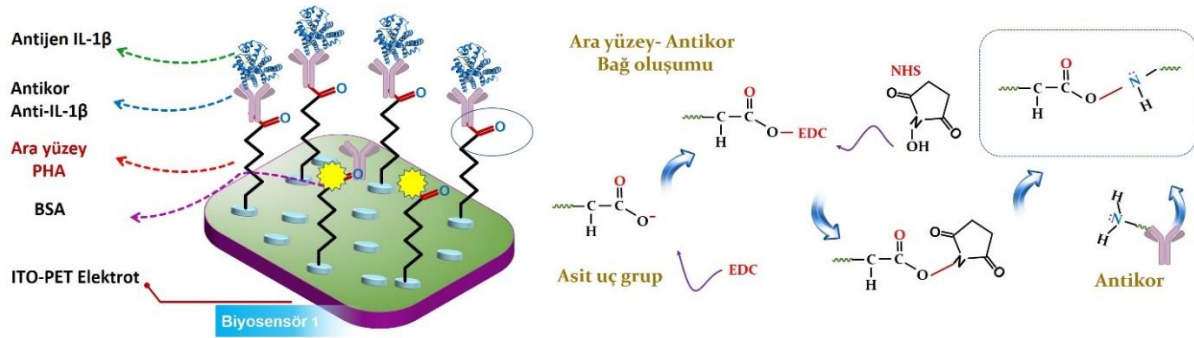
Şekil 3.1’de gösterildiği gibi bu yöntem tipik olarak birkaç basamaktan oluşmaktadır. (1) Kaplanacak substrat malzeme üzerine çözeltinin damlatılması, (2) Sistemin yüksek hızda döndürülmesi ve çözeltinin fazlasının etrafa saçılması, (3) Kalan çözelti substrat yüzeyinde ince film şeklinde yayılarak film oluşturması, (4) Oluşan film tabakanın kurutulması ve kaplama işlemi tamamlanmasıdır. Spin coating yöntemi ile kaplama sonrasında film kalınlığı birçok parametreye (kullanılan çözelti vizkozitesi, devir hızı, kullanılan çözücünün buharlaşma hızı v.b.) bağımlı olarak değişkenlik göstermektedir. Sistemin güzel taraflarından biri farklı ebatlarda ve boyutlarda birçok farklı özellikte malzeme substrat yüzey olarak kullanılabilir. Bu sistemde substrat genelde sistem içerisinde vakumlanarak sabitlenir ve istenilen devir ve hızda dönmesi bu şekilde mümkün kılınır. Hızı kontrol etmek aslında film kalınlığını kontrol edebileceğimiz anlamına gelmektedir (Lawrence 1988). Bu yöntemde çözeltinin dağıtılmasında genelde iki farklı yol izlenir. Dinamik ve statik dağıtımlar dinamik dağıtımda düşük hızlarda döndürülerek statik dağıtımda yüksek hızlarda döndürülerek kaplama yapılmaktadır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hedef Biyosensörler

Bu tez çalışmasında kanser hastalıklarında vücutta aktif olarak artıkları bilenen biyomarkerların tayinine yönelik biyosensörlerin tasarlanması hedeflenmiştir. Tez çalışması toplamda birbirinden bağımsız altı farklı biyosensörün üretim, geliştirme, test ve uygulanabilirlik bölümlerinden oluşmaktadır. Her bölüm içinde farklı ara yüzey materyalleri ve farklı antikor-antijen çiftleri ile biyosensörler üretilmiştir. Üretilen biyosensörler, çeşitli kanserler ve hastalıkların erken tanı ve teşhisinde kullanılarak sonuçları tartışılmıştır. Geliştirilen biyosensörlerin, kullanılan elektrot taşıyıcı materyaller, ara yüzey kimyasalları, antijen-antikor çiftleri aşağıda şematik olarak özetlenmiştir.

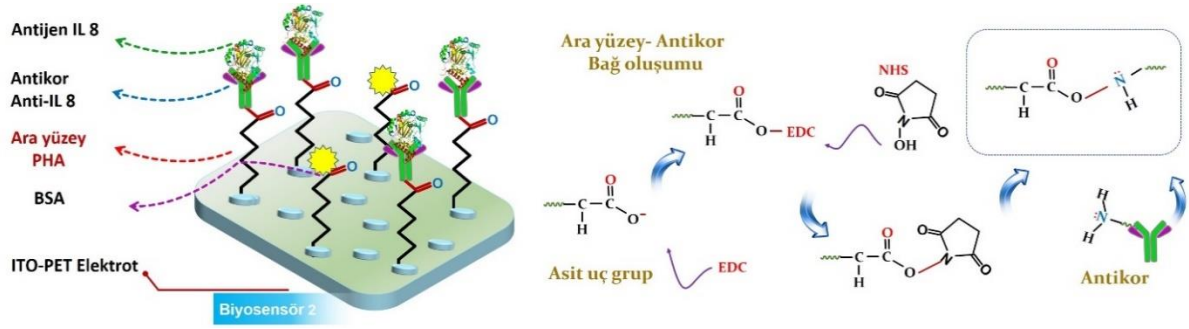
- **Biyosensör 1 (ITO/PHA/Anti-IL 1 β /BSA/IL 1 β)**



Şekil 4.1. Üretilen biyosensör 1' in şematik gösterimi.

Biyosensör 1'in fabrikasyonu sırasında ITO transducer ve 6-fosfonohekzanoik asit (PHA) ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Biotanıma elementinin immobilizasyonu, ITO elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturularak gerçekleştirilmiştir. PHA, hidroksillenmiş elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanır. Anti-IL 1 β antikor, biotanıma elementidir ve elektrot yüzeyine PHA'nın karboksil gruplarının aktiflenmesinden sonra amid bağı ile bağlanmıştır. Geliştirilen bu biyosensör tükürük ve serum numunelerinde IL 1 β tayini için kullanılmıştır.

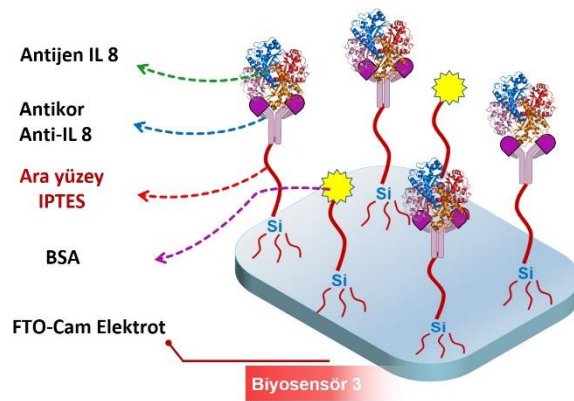
- **Biyosensör 2 (ITO/PHA/Anti-IL 8/BSA/IL 8)**



Şekil 4.2. Üretilen biyosensör 2' in şematik gösterimi.

Biyosensör 2'nin fabrikasyonu sırasında ITO transduser ve 6-fosfonohekzanoik asit (PHA) ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Biyotanıma elementinin immobilizasyonu, ITO elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturularak gerçekleştirilmiştir. PHA, hidroksillenmiş elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanır. Anti-IL 8 antikor, biyotanıma elementidir ve elektrot yüzeyine PHA'nın karboksil gruplarının aktiflenmesinden sonra amid bağı ile bağlanmıştır. Geliştirilen bu biyosensör ile tükürük ve serum numunelerinde IL 8'in tayini için kullanılmıştır.

- **Biyosensör 3 (FTO/IPTES/Anti-IL8/BSA/IL8)**

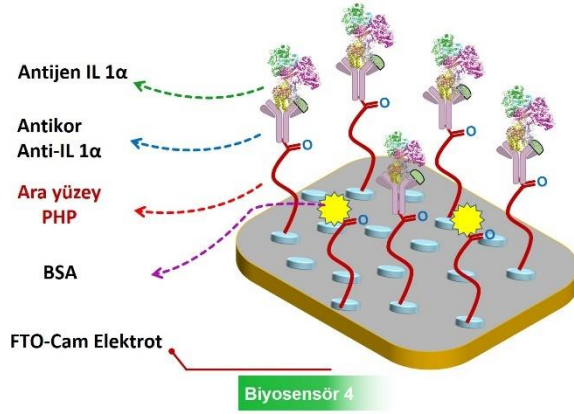


Şekil 4.3. Üretilen biyosensör 3' ün şematik gösterimi.

Biyosensör 3'ün fabrikasyonu sırasında FTO transduser ve 3-(trietoksisilil)propil isosiyanat) (IPTES) ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Biyotanıma elementinin immobilizasyonu, FTO elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturularak gerçekleştirilmiştir. IPTES, hidroksillenmiş elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanır. Anti-

IL 8 antikor, biyotanıma elementidir ve elektrot yüzeyine IPTES'teki isosiyano gruplarına kovalent bağlanmıştır. Bu biyosensör ile tükürük numunelerinde IL 8 tayini için kullanılmıştır.

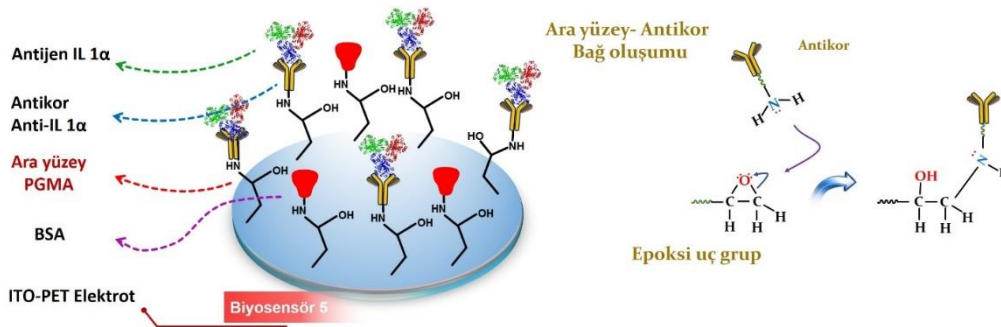
- **Biyosensör 4 (FTO/PHP/Anti-IL1 α /BSA/IL IL1 α)**



Şekil 4.4. Üretilen biyosensör 4' ün şematik gösterimi.

Biyosensör 4'ün fabrikasyonu sırasında FTO transduser ve 3-fosfonopropiyonik asit (PHP) ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Biyotanıma elementinin immobilizasyonu, FTO elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturularak gerçekleştirilmiştir. PHP, hidroksillenmiş elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanır. Anti-IL 1 α antikor, biyotanıma elementidir ve elektrot yüzeyine PHP'nin karboksil gruplarının aktiflenmesinden sonra amid bağı ile bağlanmıştır. Bu biyosensör ile tükürük numunelerinde IL 1 α tayini için kullanılmıştır.

- **Biyosensör 5 (ITO/GMA/Anti- IL1 α /BSA/IL1 α)**

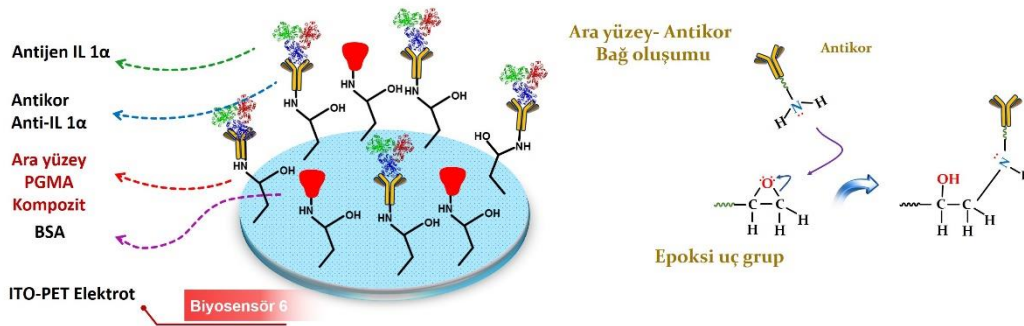


Şekil 4.5. Üretilen biyosensör 5' in şematik gösterimi.

Biyosensör 5'in fabrikasyonu sırasında ITO transduser ve poliglisidil metakrilat

(PGMA) ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmada dönerek kaplama (spin coating) yöntemi ile ITO elektrotların ara yüzey polimer modifikasyonları tek adımda hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Asetonda çözülmüş PGMA polimeri ITO elektrot merkezine damlatılır ve sonrasında sistemin yüksek dönme hızlarında döndürülür. Bu şekilde polimer ITO elektrot yüzeyine her yerde aynı kalınlıkta olacak şekilde homojen bir şekilde kaplanır. Anti-IL 1 α antikor, biyotanıma elementidir ve elektrot yüzeyine polimerin epoksi gruplarına kovalent olarak bağlanmıştır. Bu biyosensör ile tükürük ve serum numunelerinde IL 1 α tayini için kullanılmıştır.

- **Biyosensör 6 (ITO/Super P-GMA/Anti- IL1 α /BSA/IL1 α)**

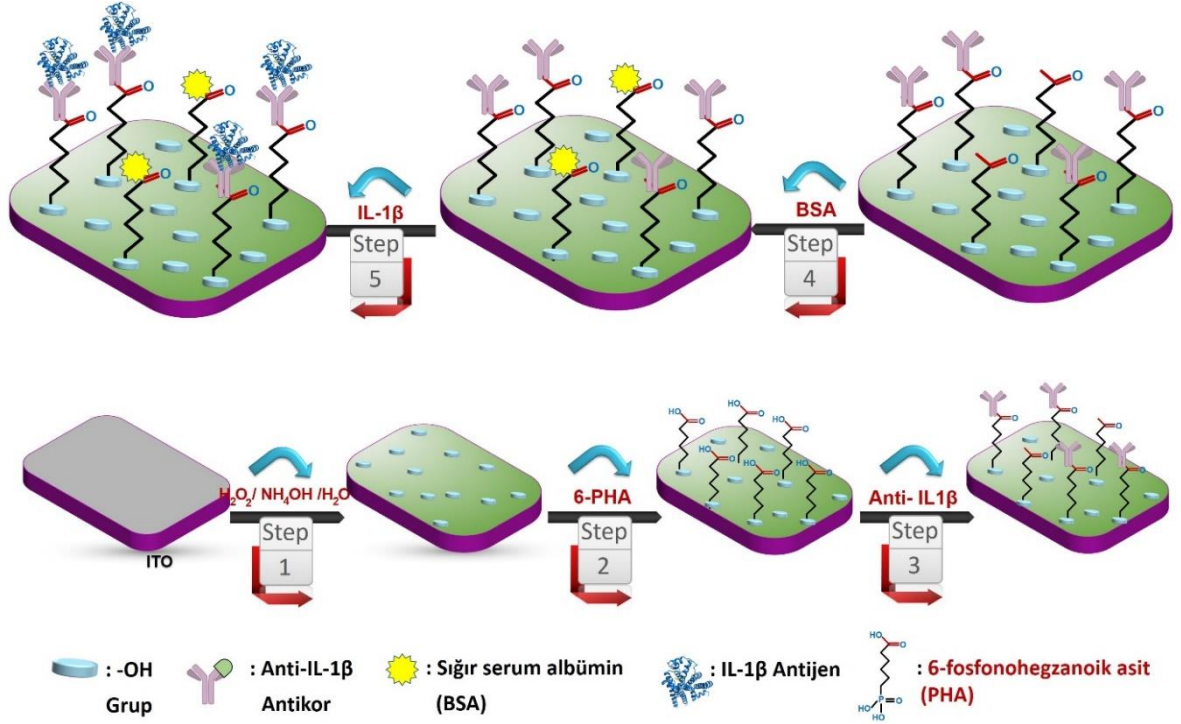


Şekil 4.6. Üretilen biyosensör 6' nın şematik gösterimi.

Biyosensör 6'nın fabrikasyonu sırasında ITO transduser ve kompozit (poligliseril metakrilat (PGMA), polivinilidenflorid (PVDF), karbon siyahı-super P) ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmada dönerek kaplama (spin coating) yöntemi ile ITO elektrotların ara yüzey modifikasyonları tek adımda hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Asetonda çözülmüş PGMA polimerini içeren kompozit, ITO elektrot merkezine damlatılır ve sonrasında sistemin yüksek dönme hızlarında döndürülür. Bu şekilde kompozit ITO elektrot yüzeyine her yerde aynı kalınlıkta olacak şekilde homojen bir şekilde kaplanır. Anti-IL 1 α antikor, biyotanıma elementidir ve elektrot yüzeyine polimerin epoksi gruplarına kovalent olarak bağlanmıştır. Bu biyosensör ile tükürük ve serum numunelerinde IL 1 α tayini için kullanılmıştır.

4.2. BİYOSENSÖR 1 (Bio-1)

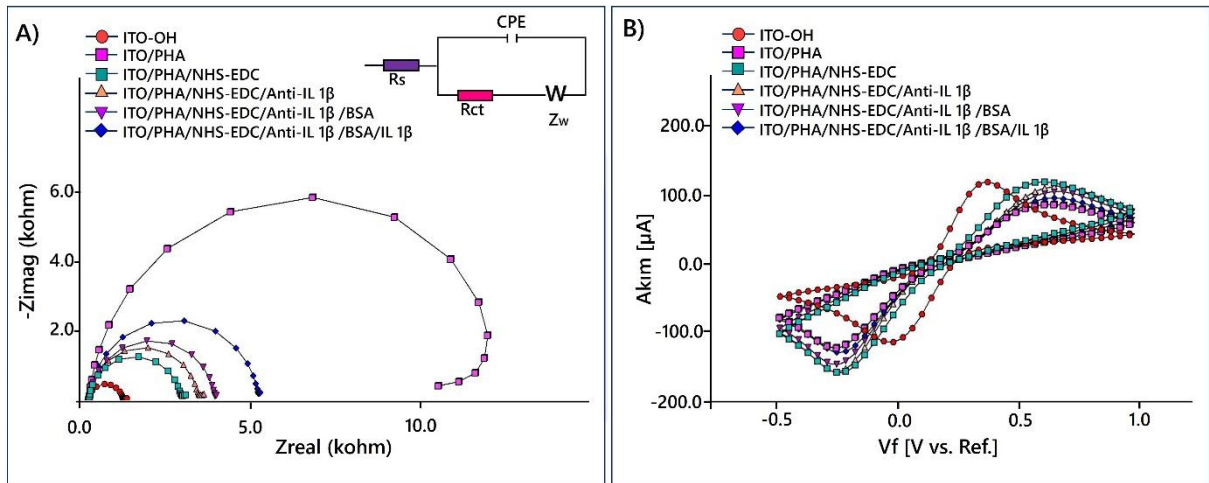
Bu bölümde daha önce literatürde bulunmayan, yüzeye fosfanat gruplarından bağlı asit uç grupları taşıyan ara yüzey tabanlı bir biyosensör, antijen IL 1 β 'nın tayini ve tespiti için geliştirilmiştir. Şekil 4.7'de geliştirilen biyosensör 1'e ait immobilizasyon şemasında yapılan işlemler basamaklar halinde özetlenmiştir.



Şekil 4.7. Biyosensör 1'e ait immobilizasyon şeması.

Şekil 4.7' deki immobilizasyon şeması incelendiğinde biyosensör geliştirilirken yapılan işlemlerin toplamda beş basamakta gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu işlemlerin ilkinde tek kullanımlık biyosensör olarak kullanacak ITO kaplanmış PET elektrotları yüzeyinde bulunabilecek organik kirlilikleri uzaklaştırmak için ultrasonik banyoda 10'ar dakika süre ile sırasıyla aseton-sabun çözeltisi ve saf su içerisinde temizliği sağlandı. Bir sonraki adımda (step 1); temizlenen elektrot yüzeylerinde hem iletkenliği arttırmak hemde ara yüzey materyallerinin bağlanabileceği ve sonraki adımlarda immobilizasyonların başarıyla gerçekleştirilmesi için gerekli, yüzeyde aktif -OH uç fonksiyonel grupları oluşturulmuştur. Bu işlem temizlenen ITO elektrotların 1:1:5 oranında sırasıyla NH₄OH/H₂O₂/H₂O içeren çözeltinin içerisinde daldırılarak ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki basamakta (step 2); aktif -OH uç grupları taşıyan elektrotlar dimetil sülfoksit (DMSO)-saf su (1:1) karışımında çözülerek hazırlanan 6-fosfonohegzanoik asit (PHA) ara yüzey kimyasal

çözeltisine daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı ve böylece elektrot yüzeylerinde antikolar ile kolayca kimyasal bağlar oluşturabilecek asit fonksiyonel uç grupları taşıyan ara yüzey tabakalar oluşturuldu. İnkübasyon sonrasında elektrotlar saf su ile yıkanıp kurutulduktan sonra CV-EIS ölçümleri alındı. Bu step sonrasında yüzeylerinde SAMs tabakaları oluşturulmuş elektrotlar antikoların kovalent immobilizasyonuna hazır fonksiyonel uç gruplara sahip oldu. Üçüncü stepde (step 3); elektrotlar üç farklı konsantrasyonda hazırlanan anti-IL 1 β antikor içeren fosfat tamponuna daldırılıp yine üç farklı sürede inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işlemi sonrasında zayıf bağlanmış yada etkileşimler ile yüzeye tutunana antikoları uzaklaştırmak için elektrotlar yıkanıp saf argon altında nazikçe kurutuldu ve CV-EIS ölçümleri alındı. Biyosensör üretiminde bir sonraki basamakta (step 4); ara yüzey materyali üzerinde antikoların bağlanmadığı serbest haldeki fonksiyol uç grupları bloklamak için elektrotlar, %0.5 sığır serum albümin (BSA) içerençözeltide 1 saatlik inkübasyona tabi tutuldu ve sonrasında tekrar yıkanıp kurutuldu. Bu basamaktada elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. Immobilizasyon basamaklarının sonucunda (step 5); antijen analizine hazır hale getirilen elektrotlar, 8 farklı ve artan konsantrasyonlarda IL 1 β içeren fosfat tamponu çözeltilerinde inkübe edildi. Her elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınmış ve böylece IL 1 β tayini için biyosensör üretilmiş oldu. Biyosensörün fabrikasyonu sırasında immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltamogramları ve impedans eğrileri şekil 4.8'de gösterilmektedir. Ayrıca yüzeyde gerçekleşen bu değişimleri izlemek için SEM ve AFM cihazı kullanılmış ve yüzeylerin morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 4.10).

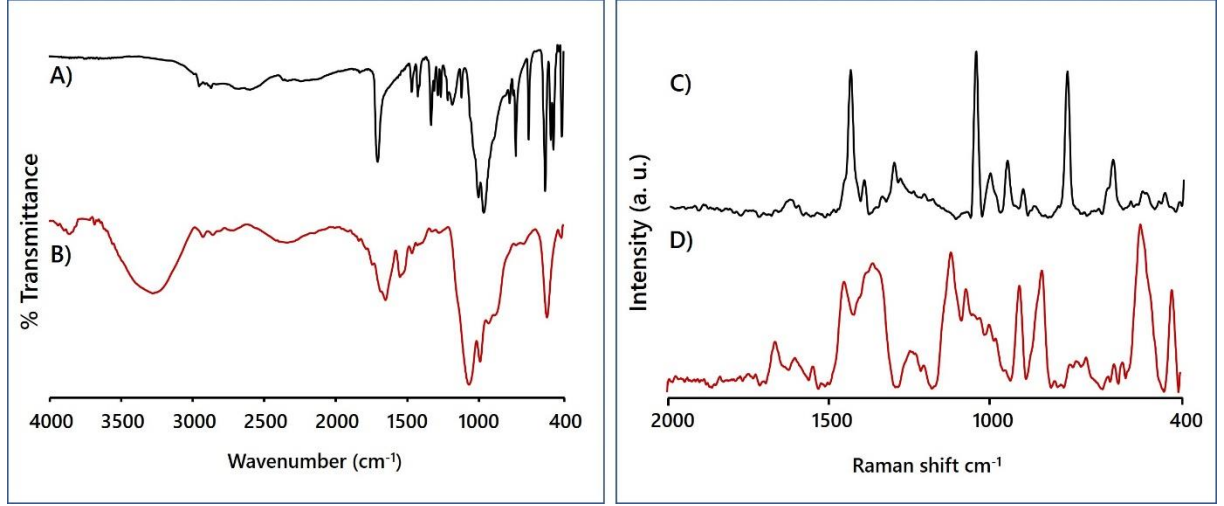


Şekil 4.8. Biyosensör 1'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).

Şekil 4.8A, ITO elektrodun her bir immobilizasyon basamağı sonrasında Nyquist eğrilerini göstermektedir. Şekil 4.8A incelendiğinde PHA tabakasının başarı ile ITO elektrot yüzeyine immobilizasyonu R_{ct} değerinde ciddi bir artışa neden olmuş ve bu artış yoğun bir yalıtkan tabakanın oluştuğunu göstermektedir. Bu durum PHA tabakasının elektron transferini engellediğini göstermektedir. Ek olarak, ITO elektrot üzerinde PHA tabakası oluşumundan sonra elektrot yüzeyindeki negatif yüklü karboksil grubu ile redoks probunun negatif yükünden dolayı güçlü elektrostatik itme oluşur. Bu yüzden bir loop gözlenmiştir. Bu loop PHA'nın engelleyici tabaka oluşumu ve direncin artmasından kaynaklanır. EDC/NHS kimyasalları ile karboksil gruplarının aktivasyonundan sonra, R_{ct} değeri azalmıştır. Bu azalmanın sebebi elektrot yüzeyindeki negatif yüklerin kısmi dengelenmesidir. Anti-IL 1 β antikorun immobilizasyonu sonucunda R_{ct} değeri artmıştır, bu durum antikorların elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğunu ve protein yapısından dolayı elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu engellediğini gösterir. Elektrotların BSA içeren fosfat tamponunda inkübasyonundan sonra R_{ct} değeri artmıştır, bu durum açıkta kalan karboksil gruplarının bloklandığını göstermektedir. Bu aşamalardan sonra elektrotlar IL 1 β tayinine hazır hale gelmiştir. IL 1 β antijenin immobilizasyonundan sonra, antikor-antijen etkileşimlerinden dolayı bir kompleks oluşumu ve beklenildiği gibi R_{ct} değeri artmıştır. Bu etkileşimler yüzeydeki iletken olmayan tabakanın artmasına ve elektron transferinin dahada zorlaşmasına neden olur.

Ek olarak, immunosensörün fabrikasyon prosesi CV ölçümleri kullanılarak da incelenmiştir. Şekil 4.8B'de görüldüğü gibi PHA tabakasının oluşumundan sonra, SAM tabakasının iletken olmayan yapısından dolayı redoks probu yüzeye penetre olmadığından pik akımı azalmıştır. Karboksil gruplarının EDC/NHS kullanarak aktivasyonundan sonra pik akımları artmıştır. Elektrot yüzeyine anti-IL 1 β antikor immobilizasyonu pik akımında azalmaya sebep olmuştur, bu antikorların elektrottan elektrolit ara yüzeyine elektron transferine engel olan bir bariyer oluşturduğunu gösterir. BSA kullanarak bloklama işleminden sonra boşta kalan bağlanma bölgelerinin bloklanması ile pik akımları azalmıştır. IL 1 β antijenlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra antikor ve antijen arasındaki spesifik etkileşimlerden dolayı azalma gözlenmiştir. Elde edilen bulgular ve sonuçlar birbirini destekler niteliktedir.

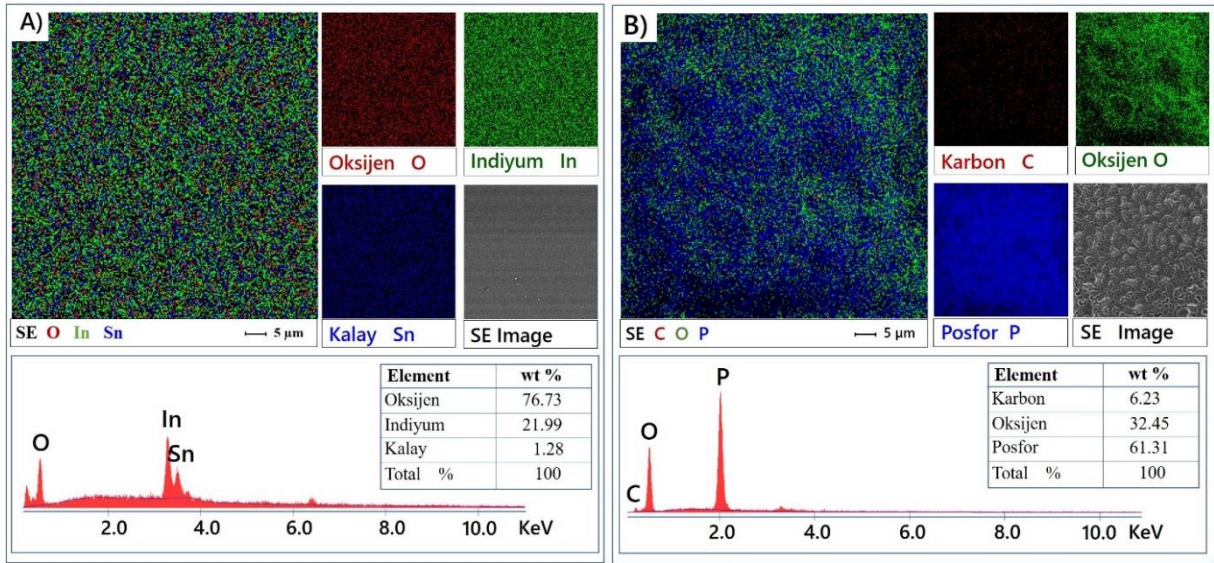
Yüzeyde PHA kendiliğinden oluşan tabakaların varlığı ve antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonun gerçekleştiğini izlemek ve elektrokimyasal ölçüm sonuçlarını desteklemek için ayrıca SEM-EDX, FTIR ve Raman ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 4.9A-D'de Bio-1 biyosensörüne ait FTIR, Raman Spektrumları ve şekil 4.10A-B'de ise SEM-EDX görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 4.9. PHA modifiye edilmiş elektrotların antikör immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR (A ve B), Raman (C ve D) spektrumları.

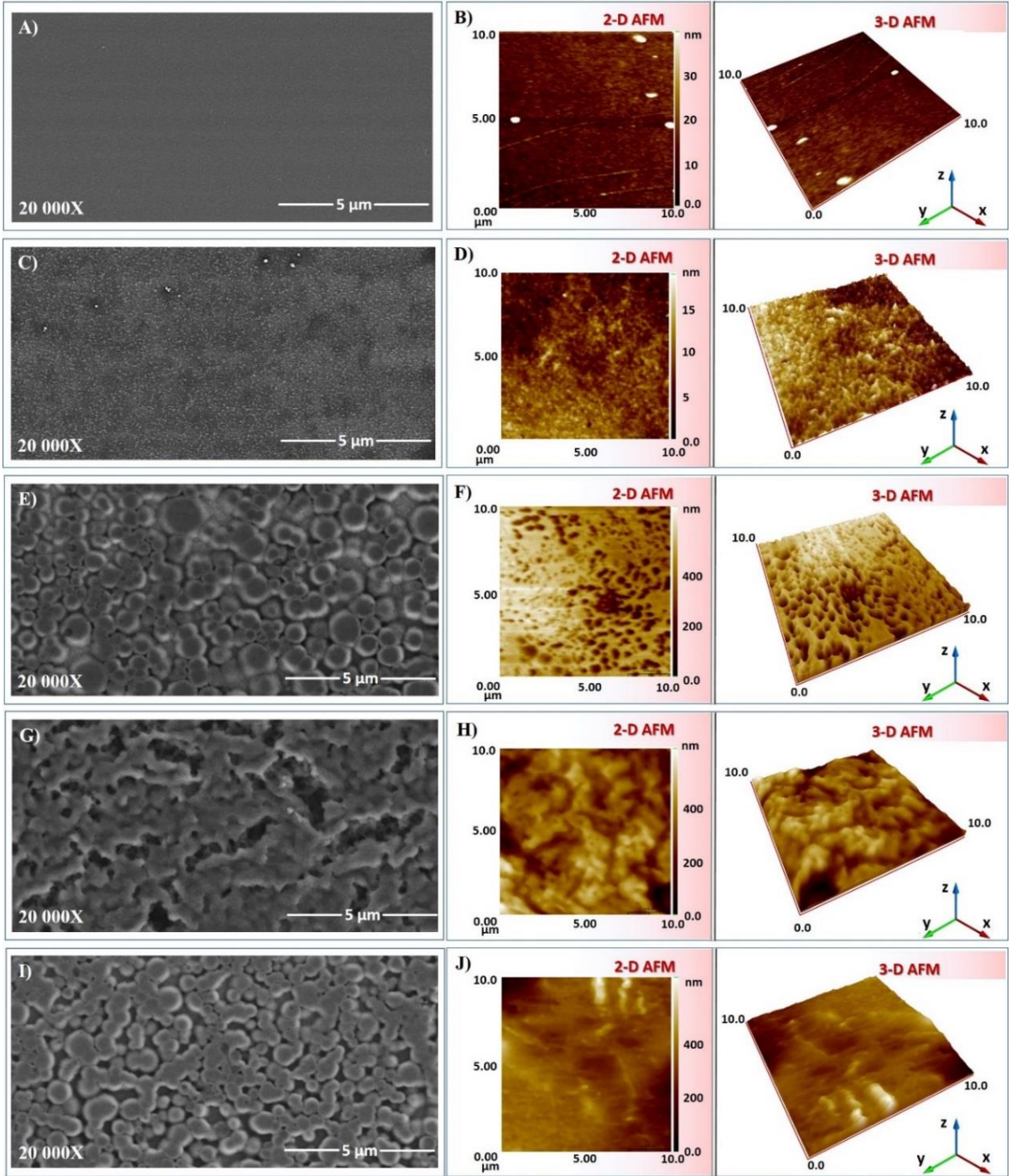
PHA modifiye edilmiş ITO elektrodu ile anti- IL 1 β antikoru ile immobilize edilmiş elektrodun FTIR spektrumları 4.9A ve 4.9B’de gösterilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde fosfonik asit ile ITO yüzeyinde yer alan hidroksil gruplarının oluşturduğu P-O-H bağının yayvan piki 2550-2700 cm^{-1} ’de civarlarında gözlenmiştir ve bu durum karakteristik fosfonat bağını yani ara yüzey materyallerinin kimyasal olarak yüzeye bağlandığını göstermektedir (Daasch ve Smith 1951; Lushtinetz ve ark. 2007). Yine şekil 4.9A’da 1695 cm^{-1} ’de gözlenen C=O piki yüzeyde bulunan karboksil gruplarının yani PHA’ nın yüzeye bağlandığını göstermektedir (Aydın ve Sezgintürk 2018). Kullanılan elektrotlar her immobilizasyon başmakları sonrasında yıkanıp kurutulduğu için yüzeyde serbest halde PHA nın olamayacağı düşüncesi spektrumdaki sonuçların doğruluğunu desteklemektedir. PHA ile modifiye edilmiş elektrotların antikör immobilizasyonu sonrasındaki FTIR spektrumu şekil 4.9B de verilmiştir. Spektrum incelendiğinde 1651 cm^{-1} and 1548 cm^{-1} de gözlemlenen pikler yüzeye bağlanan antikörlerdeki amid bağlarına atıf edilmektedir (Şekil 4.9B) (Kong ve Yu 2007). Elektrot yüzeyindeki ara yüzey materyali ile anti-IL 1 β arasındaki kimyasal etkileşimler ayrıca Raman spektroskopisi ile de incelenmiştir. Protein, nükleik asit ve bunun gibi yüksek molekül ağırlıklı materyaller yapılarında çoklu bağlar ve yüksek sayıda elektronca zengin bağlar bulundurduğundan çok daha net Raman bantları oluştururlar ki bu yüzden proteinlerin karakterizasyonunda Raman spektroskopinin FTIR ile karşılaştırıldığında çok daha güvenilir ve doğru bir teknik olduğu bilinmektedir (Kurouski ve ark.2015). Ayrıca protein gibi büyük molekül ağırlıklı yapıların IR spektrumları çoklu bağlar nedeniyle oldukça karmaşıktır ve çoğu zaman pikler üst üste binerek çakışmalar gözlemlenmektedir (Thomas Jr 1999). ITO-PET

elektrotların anti-IL β ile immobilizasyon öncesi (siyah) ve sonrası (kırmızı) sırasıyla şekil 4.9 C ve D’ de verilmiştir. Şekil 4.9C’de FTIR spektrumuna benzer pikler gözlemlenirken, Raman spektroskopisi antikorların PHA modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra, 1665 cm^{-1} ve 1548 cm^{-1} ’de pikler gözlenmiştir, bu pikler proteindeki amid bağı gösterir (Şekil 4.9B). Raman spektrumunda amid I, II ve III bölgeleri sıklıkla 1650-1680 cm^{-1} , 1480-1570 cm^{-1} , 1235-1300 cm^{-1} ’de gözlenmektedir (Aydın ve ark. 2018b). Şekil 4.9D’de gözlemlendiği gibi amid I, II ve III bağları sırasıyla 1665, 1548 ve 1246 cm^{-1} ’de görülmüştür (Aydın ve ark. 2018a).



Şekil 4.10. Hidroksillenmiş ITO elektrotların PHA ile modifikasyon öncesi ve sonrası yüzeyin elementel mapping ve spektrumları.

SEM-EDX analizi ITO elektrot yüzeyinde PHA modifikasyonundan sonra fosfonat gruplarının oluştuğunu yani PHA’ nın elektrot yüzeyindeki varlığını göstermek için yapılmıştır. Şekil 4.10A hidroksillenmiş ITO elektrotun yüzeyinin elementel haritalama görüntüleri ve elementel spektrumu göstermektedir. Şekil 4.10A’de açık bir şekilde görüldüğü gibi hidroksillenmiş ITO’ların yüzeyinde beklenildiği gibi sadece İndiyum, Kalay ve Oksijen atomları gözlemlenmiştir. Şekil 4.10B’ de ise yüzeyinde PHA tabakaları içeren elektrotların elementel haritalama resimlerini ve elementel dağılım spektrumunu göstermektedir. Elementel dağılım spektrumunda hidroksillenmiş ITO’nun aksine Karbon, Oksijen ve Fosfor atomunun baskın bir şekilde bulunduğu görülmektedir. Bu durum ITO elektrot yüzeyinde PHA tabakalarının varlığının en büyük kanıtlarındandır. Ayrıca şekil 4.10B’ de elementel haritalama resmine bakıldığında fosfor atomlarının (mavi) yüzeyin hemen hemen her yerinde olduğu gözlemlenmekte bu durumda PHA’ nın yüzeyin her yerinde olduğunu yani homojen bir kaplanma olduğunu göstermektedir.

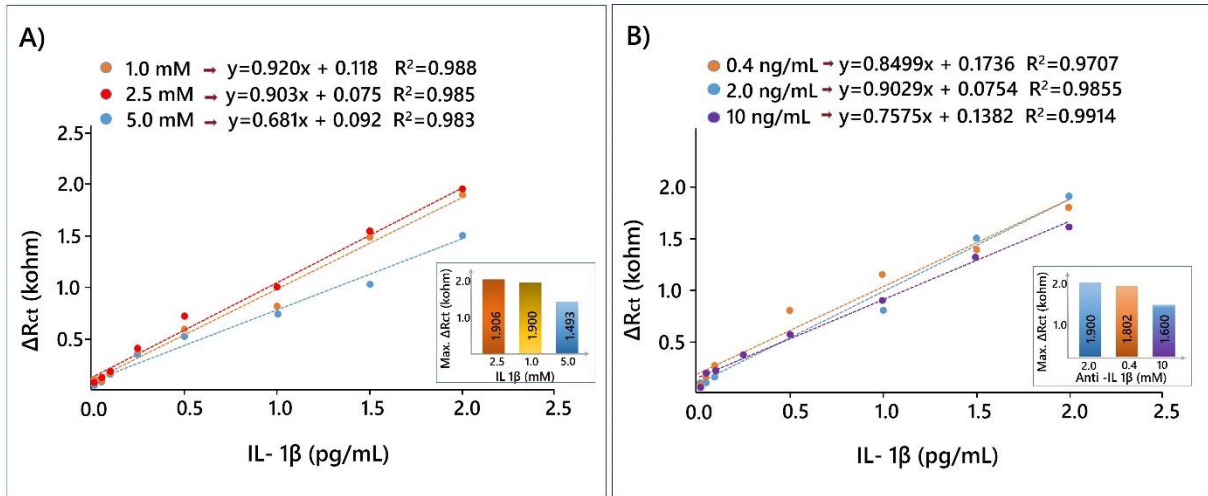


Şekil 4.11. Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; hidroksillenmiş ITO (A ve B); ara yüzey modifikasyonu sonrası (C ve D); antikor immobilizasyonu sonrası (E ve F); BSA ile bloklama sonrası (G ve H); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü. (I ve J).

Şekil 4.11’de elektrotların her bir immobilizasyon basamağı sonrasında yüzeylerinde meydana gelen morfolojik değişimler SEM ve AFM ile incelenmiştir. Şekil 4.11A ve 4.11B’de hidroksillenmiş ITO elektrotun SEM ve AFM görüntüleri bulunmaktadır ve görüldüğü gibi başlangıç basamağı olduğu için oldukça düzgün bir yüzey morfolojisine sahiptir. Elektrot

yüzeylerinde PHA modifikasyonundan sonra meydana gelen değişim şekil 4.11C ve 4.11D’de verilmiştir. Hem SEM hem AFM resimlerinden de görüldüğü üzere PHA elektrot yüzeyine homojen bir şekilde bağlanmıştır. Hidroksillenmiş ITO elektrotun ve PHA modifiye edilmiş elektrotun ortalama pürüzlülük değerleri (Ra) sırasıyla 2.31 nm ve 3.45 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, PHA’nın elektrot yüzeyinde yoğun, iyi-düzenlenmiş bir tabaka oluşturduğunu göstermektedir ki bu durum elementel haritalama sonuçlarını desteklemektedir (şekil 4.10B). Anti-IL 1 β antikorunun PHA modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisi oldukça değişmiş (Şekil 4.11E ve 4.11F) ve Ra değeri 94 nm olarak ölçülmüştür. Yüzeyin RMS değerindeki bu yüksek artış amid bağı oluşumunu yani proteinlerin yüzeye bağlandığını onaylamaktadır. Antikorlar bağlanıp aktif karboksil uçlarının BSA ile bloklanmasından sonra (Şekil 4.11G ve 4.11H), Ra değeri 68 nm olarak ölçülmüştür. Antikor-antijen etkileşiminden sonra, Şekil 4.11I ve 4.11J’de globuler yapılar gözlenmiştir. Bu basamaktaki Ra değeri 52.7’dir ve Ra değerindeki artış spesifik etkileşimi göstermektedir.

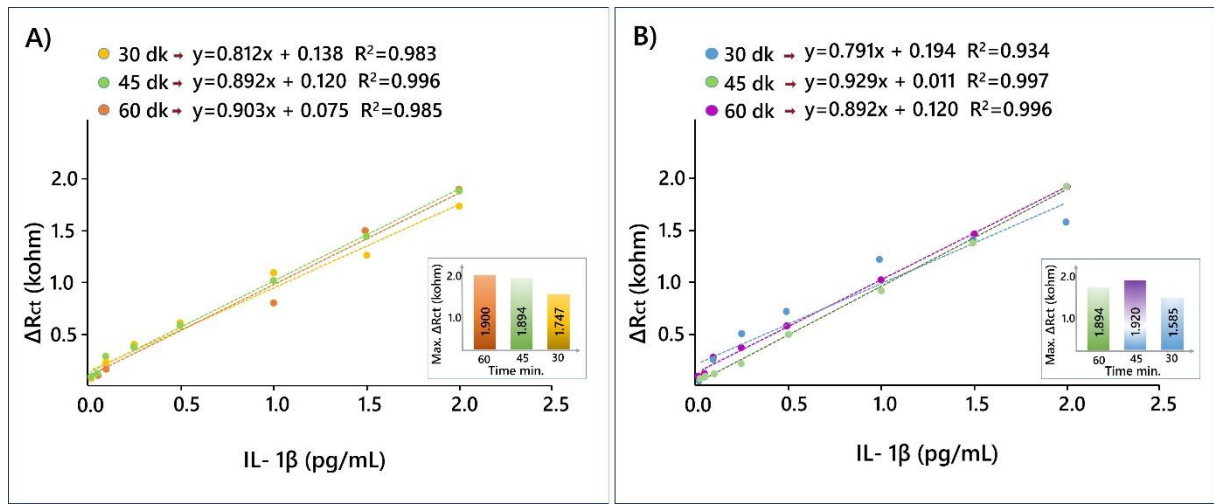
4.2.1. Biyosensör 1’in Optimizasyon Basamakları



Şekil 4.12. Biyosensör 1’in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PHA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).

Elektrot yüzeyinde biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu için gerekli olan ara yüzey tabakalarının düzgün bir şekilde oluşabilmesi ve bu oluşan tabakanın her çalışmada tekrarlanabilmesi, biyosensörün iyi bir performans sağlaması için oldukça önemlidir. Bu sebeple, SAMs oluşumu için 3 farklı konsantrasyonda (1 mM, 2.5 mM ve 5 mM) PHA hazırlanmış ve hidroksillenmiş elektrotlar bu solüsyonlara daldırılarak ve eşit sürelerde bekletilmiştir. 1 mM ve 2.5 mM konsantrasyonu kullanarak hazırlanan biyosensörler benzer

sinyallere sahiptir ve 5 mM konsantrasyon kullanarak hazırlanandan fazladır (Şekil 4.12A). Bu yüzden 1 mM PHA konsantrasyonu optimum olarak seçilmiştir. Biyosensör fabrikasyonunda kullanılan biyotanıma elementi miktarı başarılı bir biyosensör geliştirmekte önemli bir parametredir çünkü bu parametre biyosensörün tespit etme kapasitesini etkiler. Maksimum sinyal elde etmek için, 3 farklı konsantrasyonda anti-IL 1 β (0.4 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL) kullanılmıştır. Şekil 4.12B’de görüldüğü gibi 2 ng/mL antikor kullanıldığında maksimum sinyal elde edilmiştir. Diğer önemli parametre ise antikor inkübasyon süresinin optimizasyonudur. Bu parametre antikorların bağlanma etkisini etkilediğinden oldukça önemlidir.

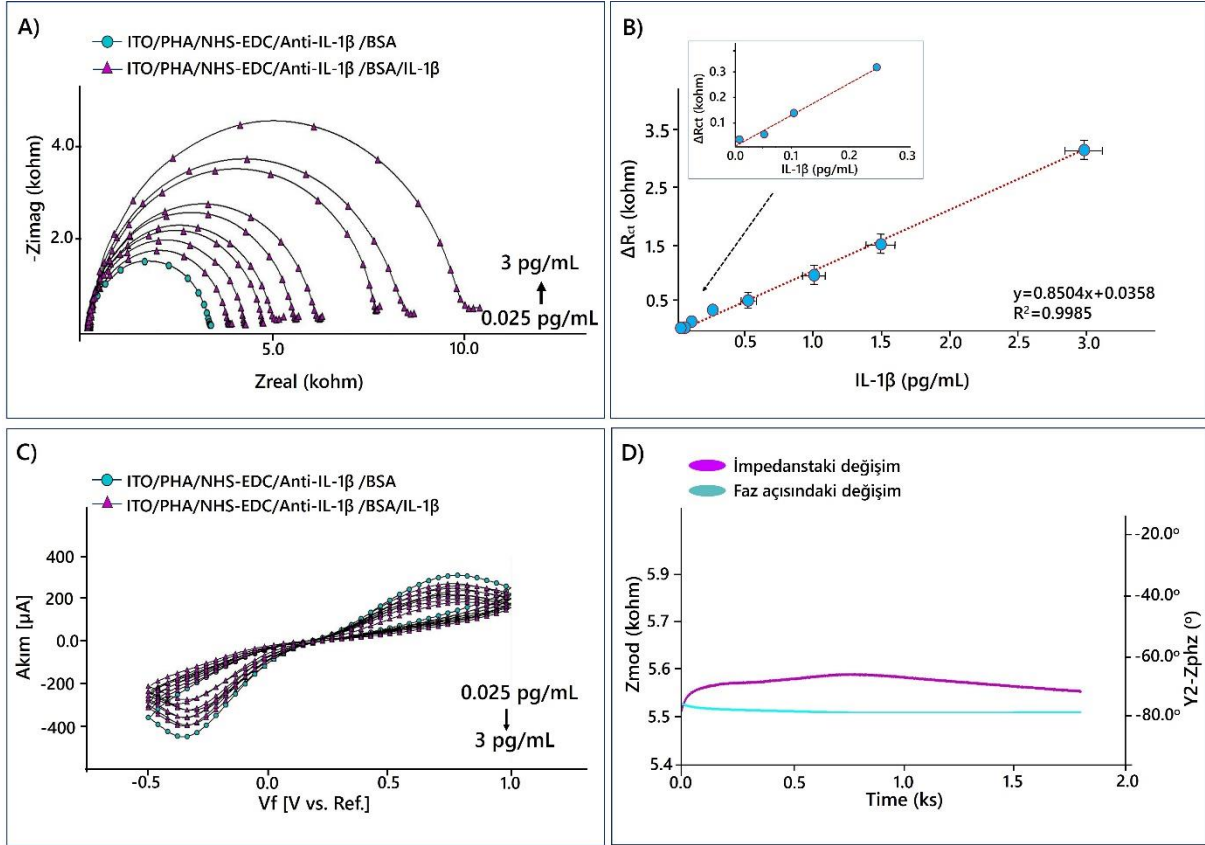


Şekil 4.13. Biyosensör 1’in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A) ve antijen inkübasyon süresi (B).

Bu yüzden PHA modifiye elektrotlar, anti-IL 1 β içeren fosfat tamponunda 3 farklı süre (30 dk, 45 dk, 60 dk) bekletilmiştir. Şekil 4.13A incelendiğinde 30 dk inkübasyon süresi elektrot yüzeyine arzulanan miktarda antikorların bağlanması için yeterli değildir. Fakat 45 dk ve 60 dk inkübasyon sonunda elde edilen sinyaller yaklaşık olarak aynıdır (Şekil 4.13A). Bu yüzden 45 dk optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Son optimizasyon parametresi ise IL 1 β antijen inkübasyon süresidir. Bu yüzden hazırlanan elektrotlar, IL 1 β içeren fosfat tamponunda yine 3 farklı sürede (30 dk, 45 dk, 60 dk) bekletilmiştir. Şekil 4.13B incelendiğinde 30 dk inkübasyon süresinin elektrot yüzeyine yeterli miktarda antikorların bağlanması için yeterli olmadığı fakat 45 dk ve 60 dk inkübasyon sürelerinin sonunda benzer sinyallerin elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.13B). Bu yüzden 45 dk optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir.

- **Linear Tayin Aralığının Optimizasyonu**

İmmunosensörün analitik performansını incelemek için, optimum deneysel koşullar altında farklı konsantrasyonunda IL 1 β standart çözeltileri ölçülmüştür. Böylece biyosensörün lineer aralığı tespit edilmiştir. Lineer aralık, geliştirilen bir biyosensörün ölçebildiği konsantrasyon aralığını göstermektedir (Şekil 4.14B).

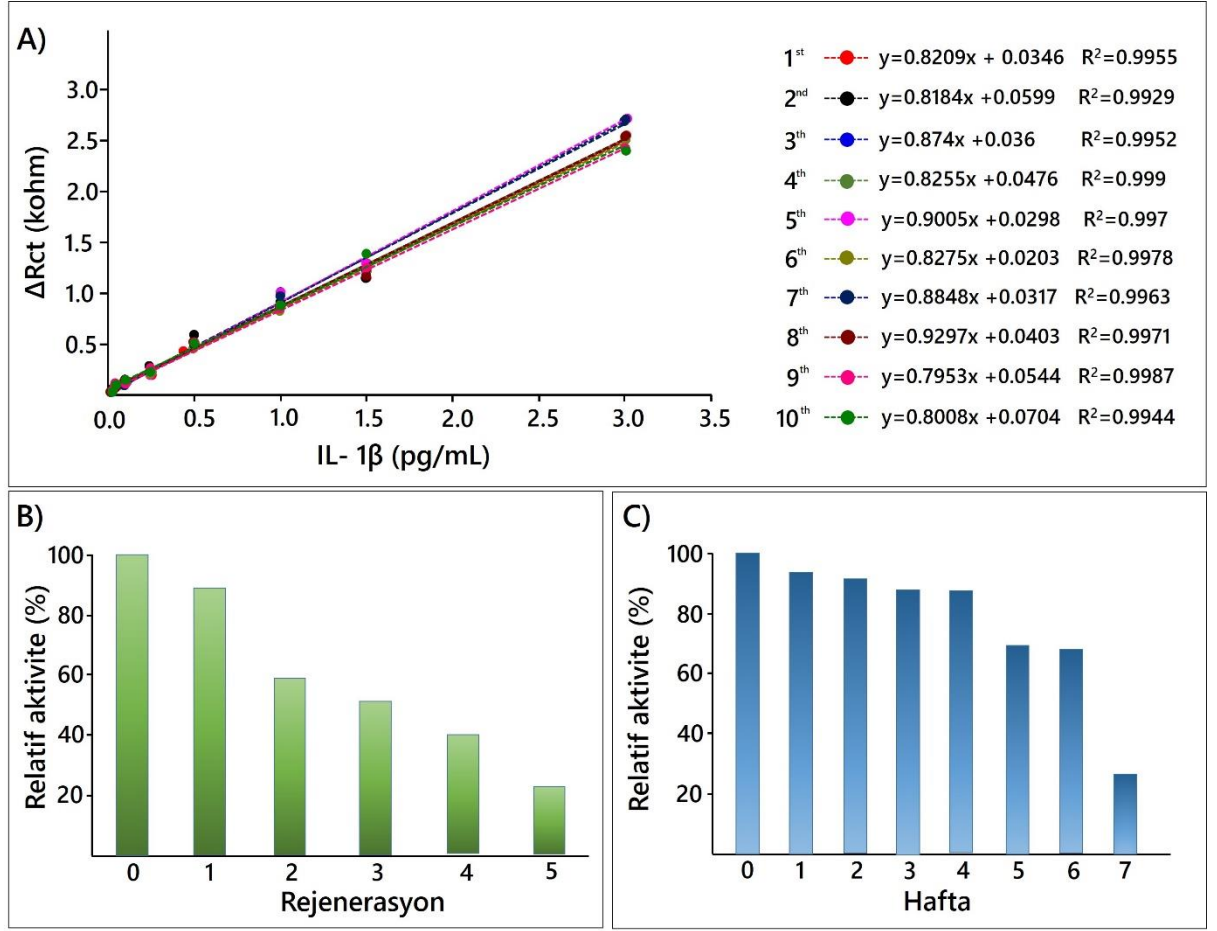


Şekil 4.14. Farklı IL 1 β konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.

Şekil 4.14A ve 4.14C, artan IL-1 β konsantrasyonu kullanarak hazırlanan biyosensörlerin impedans spektrumlarını ve dönüşümlü voltammogramlarını göstermektedir. Artan IL-1 β konsantrasyonları R_{ct} değerinde artmaya ve pik akımlarında azalmaya neden olmaktadır. Bu artma ve azalmanın nedeni proteinlerin elektrot yüzeyine bağlanmasıyla elektrot yüzeyindeki tabakanın artmasıdır. Böylece anti-IL 1 β antikor – IL 1 β antijen kompleksinin miktarı artmıştır ve bu durum elektrot ara yüzeyinde gerçekleşen redoks probunun elektron transfer reaksiyonunun baskılanmasına neden olmuştur. İmmunosensör cevabı ile artan IL 1 β konsantrasyonu arasında 0.025 pg/mL – 3 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.14B). Bu biyosensörün tespit limiti (LOD) 7.5 fg/mL ve ölçüm limiti 25 fg/mL olarak belirlenmiştir.

- **Sabit frekans İmpedans (SFI)**

Anti-IL 1 β ve IL 1 β antijen arasındaki spesifik bağlanma sabit bir frekansta izlenebilir. Bu işlem zamana karşı toplam impedansın belli bir frekansta izlenmesi ile gerçekleştirilir. SFI'de kullanılacak sabit frekans Bode eğrisinden seçilmiştir. Bio-1'e ait sabit frekans ölçümü şekil 4.14D'de gösterilmiştir. Şekil 4.14D incelendiğinde impedansta artış (pembe) gözlenmiştir ve bu artış anti-IL 1 β ve IL 1 β antijen arasındaki spesifik bağlanmayı kanıtlamaktadır.



Şekil 4.15. Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.

- **Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, raf ömrü çalışması**

Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterlerinden biridir. Bu doğrultuda lineer aralığımızın orta noktasındaki IL-8 konsantrasyonu (0.5 pg/mL) kullanarak ve yaptığımız tüm optimizasyon çalışmalarını göz önünde bulundurarak, 20 farklı elektroda ait sinyalleri ölçtük. Relatif standart hata %4.56 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç kabul edilebilir tekrarlanabilirliği göstermektedir.

Tekrar üretilebilirlik geliştirecek bir biyosensörün diğer bir başarı kriteridir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmayı 10 kez tekrar ederek biyosensörümüzün tekrar üretilebilir olup olmadığını araştırdık. Şekil 4.15A'da biyosensöre ait tekrar üretilebilirlik kalibrasyon grafiği bulunmaktadır. Şekil 4.15A'dan görüldüğü gibi tüm biyosensörler benzer lineeriteye sahiptir ve relatif standart hata %5.42 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen relatif standart hata kabul edilebilir tekrar üretilebilirliği göstermektedir.

Biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği, klinik açıdan çok önemlidir. Böylece biyosensör hazırlamak için harcanan zaman azalır ve ölçüm maliyetleri düşer. Bu yüzden biyosensörün rejenerasyonu incelenmiştir. Bu test ayrıca biyosensörün sağlığını göstermektedir. Bu yüzden elektrotlar asidik koşullara maruz bırakılır ve biyosensörün cevabı ölçülür. Şekil 4.15B'den görüldüğü gibi biyosensör 6 döngü boyunca iyi sinyal gösterirken, 6 döngü sonunda elektrot yüzeyi bozulmuştur.

Geliştirilen biyosensörün uzun ömürlü olması biyosensörün başarısını gösteren bir kriterdir. Bu yüzden hazırlanan biyosensörler buzdolabında 10 hafta boyunca bekletildi. 7 hafta bekleme sonucunda ölçülen %26.45'e düşmüştür ve bu durum iyi stabiliteyi göstermektedir (Şekil 4.15C).

- **Biyosensör ile Gerçek Tükürükte IL 1 β Analizi**

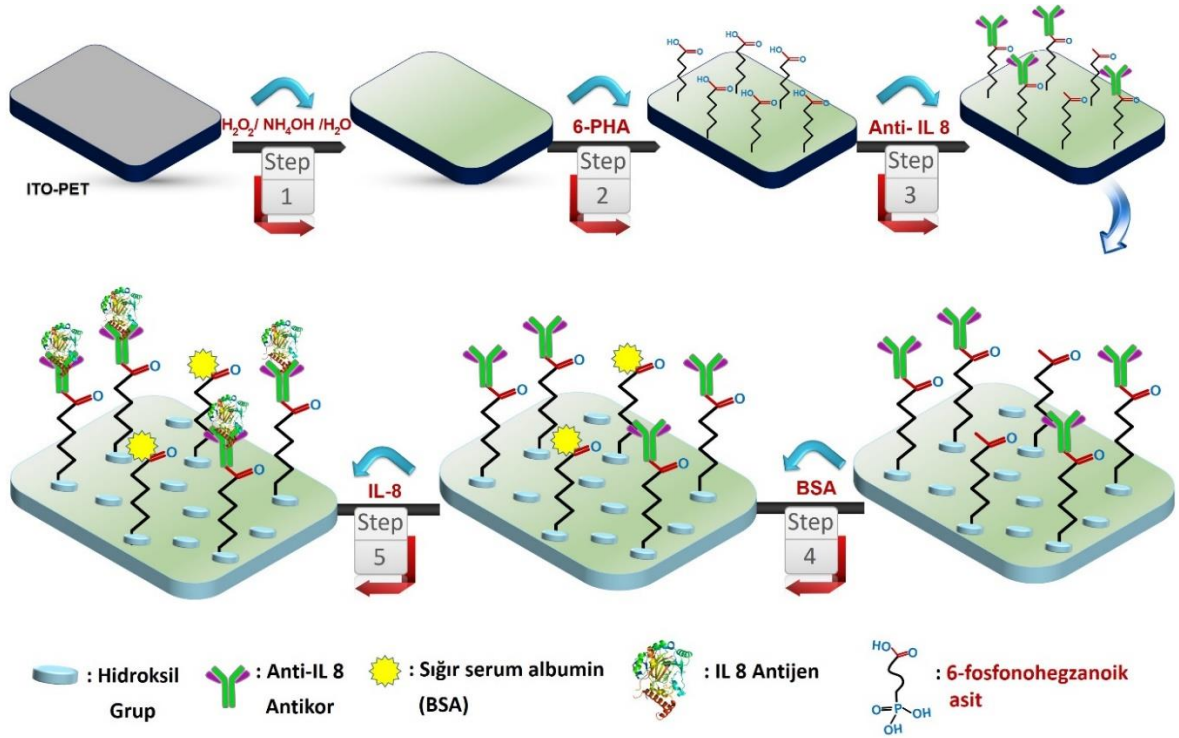
Geliştirdiğimiz biyosensörü denemek amacıyla gerçek serum ve tükürük örneğine belli miktarlarda IL 1 β antijeni ilave ederek ölçümler yapılmıştır. Gerçek serum örnekleri ve tükürük örnekleri sırasıyla 20 kat ve 400 kat seyreltilmiş ve üzerine belli miktarda IL 1 β antijeni eklenmiştir. Eklenen konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar çizelge 1'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul edilebilir düzeydedir; geri kazanım %96.66-%105.39 arasındadır. Bu sonuçlar sistemin başarılı bir şekilde çalıştığının göstergesidir.

Çizelge 4.1. Gerçek serum ve tükürük IL 1 β analiz sonuçları

Örnek	Biyosensor sonuçları (pg/mL)	Eklenen IL-1β (pg/mL)	Biyosensor ile bulunan toplam	% Geri Kazanım	% Relatif Farklılık
Tükürük 1	0,48	0.25	0,73	99,90	-0,10
Tükürük 2	0,63	0.25	0,88	100,32	+0,32
Tükürük 3	0,51	0.25	0,76	99,60	-0,40
Tükürük 4	0,49	0.25	0,74	100,86	+0,86
Tükürük 5	0,55	0.25	0,80	96,66	-3,34
Serum 1	0,41	0.25	0,66	105,39	+5,39
Serum 2	0,45	0.25	0,70	99,39	-0,61
Serum 3	0,33	0.25	0,58	100,89	+0,89
Serum 4	0,39	0.25	0,64	99,70	-0,30
Serum 5	0,33	0.25	0,58	97,23	-2,77

4.3. BİYOSENSÖR 2 (Bio-2)

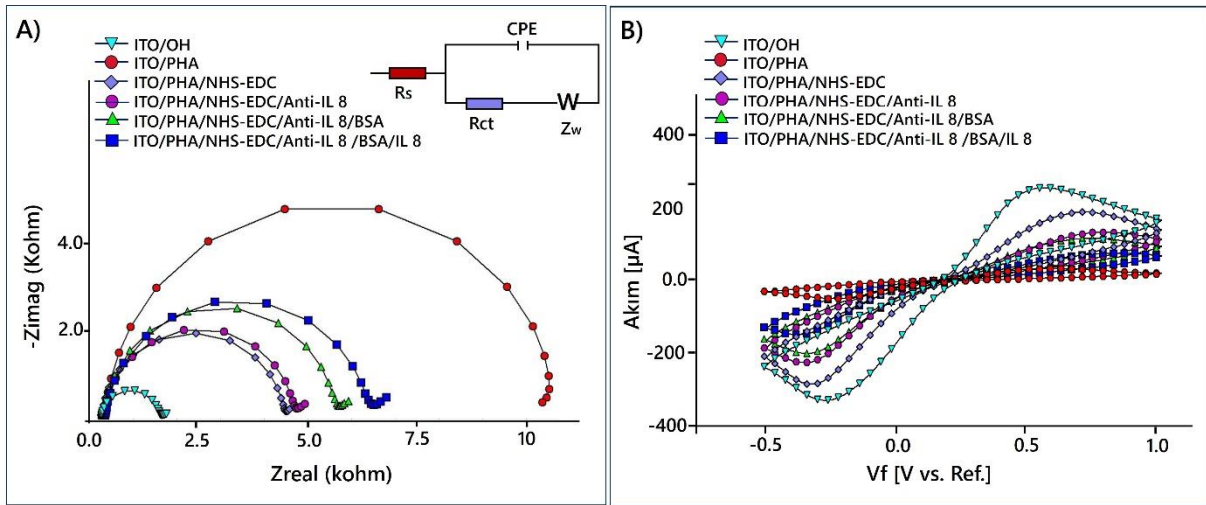
Bu bölümdeki biyosensör üretiminde bir önceki ara yüzey materyali 6-fosfonohekzanoik asit (PHA) ile farklı bir antijen IL 8'in tespit ve tayini için biyosensör geliştirilmiştir. Bir önceki biyosensör ile karşılaştırıldığında kullanılan protein dışında uygulanan yöntem ve immobilizasyon basamakları benzerlik göstermektedir. Şekil 4.16'de biyosensör 2'e ait immobilizasyon şeması ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Biyosensör 2'ye ait immobilizasyon şeması.

Biyosensör 2' de üretim için kullanılan basamaklar biyosensör 1'e oldukça benzerdir. Bu yüzden yapılan işlemler ve immobilizasyon basamakları özet bir şekilde anlatılacaktır. Bu sistemde ara yüzey materyali olarak 6-fosfonohekzanoik asit (PHA) kullanılırken biyo belirteç olarak ise interleukin 8 (IL 8) kullanılmıştır. Bu çalışmada da ilk olarak tek kullanımlık biyosensör olarak kullanacak ITO elektrotlar yüzeylerinde bulunma ihtimali olan organik kirleticilerden 10'ar dakika süre ile sırasıyla aseton-sabun çözeltisi ve saf su ile ultrasonic banyoda yıkanarak temizlendi. Temizlik sonrasında elektrot yüzeylerinde aktif hidroksil uç grupları oluşturmak için elektrotlar $NH_4OH/H_2O_2/H_2O$ (1:1:5) çözeltisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonraki baswamakta yüzeydeki aktif hidroksil gruplarına PHA' nın bağlanması ara yüzeyta bakasının olmuşması için DMSO-saf su (1:1)

karışımında çözülerek hazırlanan 6-fosfonohekzanoik asit (PHA) çözeltisine daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. Elektrotlar her basamak sonrasında yüzeylerinde bağlanmayan türlerin serbest halde kalmaması için nazikçe yıkanıp kurutuldu. Buna ilave olarak her bir basamakta işlem sonrasında elektrotların CV ölçümleri alınarak yüzeydeki değişimler takip edilmektedir. Yüzeyde PHA'nın bağlanması sonrasında oluşan SAMs (self-assembled monolayer) tabakası ile hazırlanan bu elektrotlar, antikorların kovalent immobilizasyonuna hazır hale getirilmiştir. Bir sonraki basamakta elektrotlar anti-IL 8 antikor içeren fosfat tamponuna daldırılıp inkübasyona bırakıldı. Zayıf bağlanmış antikorları uzaklaştırmak için elektrotlar tekrar yıkanıp saf argon altında nazikçe kurutuldu ve CV-EIS ölçümleri alındı. Yüzeyde antikorların bağlanmadığı açık asit uçları bloklama ajanı olarak ise elektrotlara %0.5 BSA'da inkübasyon işlemi uygulandı ve yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. Tüm immobilizasyon aşamalarından sonra hazır hale gelen elektrotlar, artan 8 farklı konsantrasyonda IL 8 içeren fosfat tamponu çözeltilerine inkübasyona bırakılmıştır. Her elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınarak, böylece IL 8 tayini için biyosensör sistemi üretilmiştir. Biyosensörün fabrikasyon sırasında immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltamogramlarını ve impedans eğrileri şekil 4.17'te gösterilmektedir.



Şekil 4.17. Biyosensör 2'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).

Şekil 4.17A'da görüldüğü gibi hidroksillenmiş ITO elektrot küçük R_{ct} değerine sahiptir ve R_{ct} değeri PHA'nın hidroksillenmiş elektrot yüzeyine kendiliğinden tabaka oluşturması ile artar. PHA tabakasının oluşumu ile elektrot yüzeyi negatif yüklenir. Negatif yüklü redoks probun elektrot yüzeyine difüze olmadığından R_{ct} artmıştır. Bu artış elektrot yüzeyinde yoğun, iyi düzenlenmiş SAMs tabakalarının oluştuğunu gösterir. PHA'nın uç kısımlarında bulunan

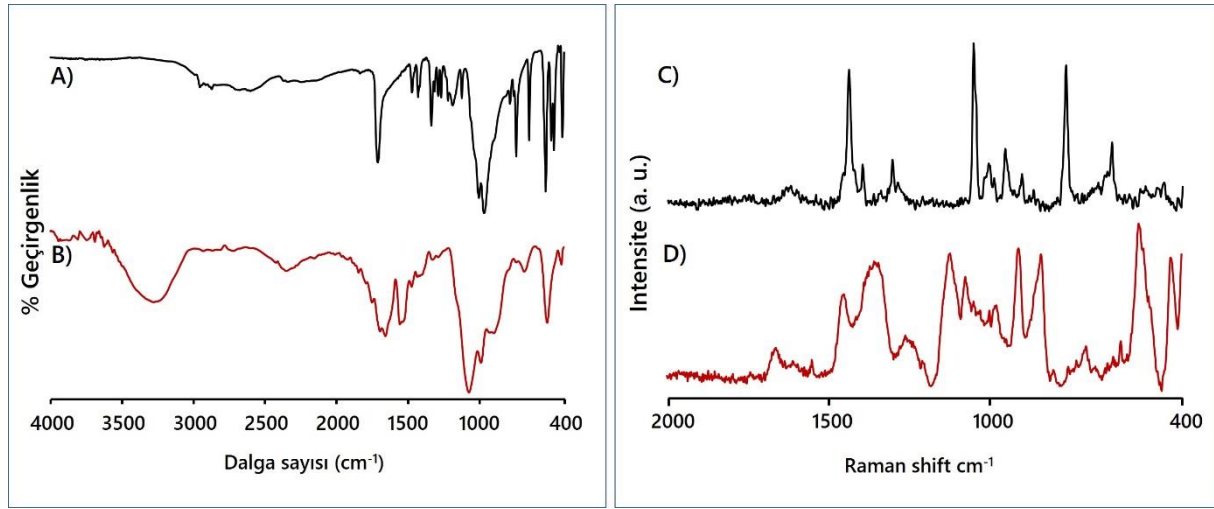
karboksil gruplarının NHS/EDC ile antikorun daha rahat bağlanabilmesi için aktive edilmesinden sonra R_{ct} değerinde azalma gözlenmiştir. Bu birçok çalışmada gözlemlenen bir durumdur. Ayrıca asit uç gruplarının aktiflenmesi ve anti-IL 8 ile bağlanarak amid bağı oluşturma mekanizması şekil 4.17’ de gösterilmiştir. Anti-IL8 antikorların PHA’nın karboksil ucuna amid bağı vasıtasıyla bağlanması ITO elektrot yüzeyinde yalıtkan bir bariyer tabaka oluşturur ve bu durum yarı daire çapı yani R_{ct} değeri arttırmaktadır (Şekil 4.17A). Anti-IL 8 immobilizasyonu sonrasında ITO yüzeyinde bulunan aktif karboksil gruplarının elektrot yüzeyinde oluşabilecek nonspesifik etkileşimleri ortadan kaldırmak için BSA ile asit uçların bloklanması söz konusudur ki bu işlem sonrasında da yüzey üzerinde akım geçişi azaldığından R_{ct} değerinde artış gözlenmiştir. Son basamakta anti-IL 8 antikor ile IL 8 antijen arasındaki etkileşimden sonra elektrot yüzeyine yeni bir protein tabakası (IL 8 antijen) bağlandığından R_{ct} değeri artmıştır. Tüm bu basamaklarda yapılan işlemler sonrasında yüzeyde meydana gelen morfolojik değişiklikler sonuçları desteklemektedir ve birbiri ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

EIS ölçümlerine ek olarak basamak basamak modifikasyon işlemi CV ölçümleri ile de izlenmiştir. Şekil 4.17B’de görüldüğü gibi hidroksillenmiş ITO elektrot üzerinde PHA kendiliğinden oluşan tabakalar oluştuğundan sonra pik akımlarında önemli bir düşüş gözlenmiştir. PHA modifikasyonundan sonra elektrot uçlarında yer alan karboksil gruplarının aktivasyonundan sonra, pik akımları artmıştır. Fakat sırasıyla anti-IL8 antikorun, BSA’nın ve IL 8 antijenin immobilizasyonundan sonra yüzeyde oluşan yalıtkan tabakanın artmasıyla elektron transferi engellendiğinden pik akımları azalmıştır. CV ölçümleri sonuçları EIS ölçümleri sonuçları ile uyumluluk içindedir.

Yüzeyde PHA kendiliğinden oluşan tabakaların oluştuğunu ve antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonun gerçekleştiğini izlemek için ayrıca SEM-EDX, FTIR ve Raman ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 4.18’de Bio-2 biyosensörüne ait FTIR, Raman Spektrumları ve şekil 4.19’da SEM-EDX görüntüleri gösterilmektedir.

PHA modifiye edilmiş ITO elektrodun antikor ile immobilizasyon öncesi (siyah) ve sonrası (kırmızı) FTIR spektrumları 4.18A ve 4.18B’de gösterilmiştir. Şekil 4.16A’ da verilen spektrum incelendiğinde fosfonat bağının varlığını yani ara yüzey materyali PHA’nın yüzeye bağlandığını gösteren fosfant pikleri yayvan bir şekilde $2550-2700\text{ cm}^{-1}$ ’de civarlarında gözlenmiştir. (Daasch ve Smith 1951; Lushtinetz ve ark. 2007). Ayrıca spektrum üzerinde 1695 cm^{-1} ’de gözlenen karbonil pikleride yüzeyde bulunan karboksil gruplarının yani PHA’nın varlığının kimyasal olarak kanıtıdır. (Aydın ve Sezgentürk 2018). PHA ile SAMs tabakaları oluşturulmuş elektrotların anti- IL 8 immobilizasyonu sonrasındaki FTIR spektrumu şekil 4.18B de verilmiştir. Spektrumda 1648 cm^{-1} and 1546 cm^{-1} de gözlemlenen pikler yüzeye

bağlanan antikorlar ile PHA arasında oluşan amid bağlarını göstermektedir. (Şekil 4.18B) (Aydın ve ark. 2017; Kong ve Yu 2007).

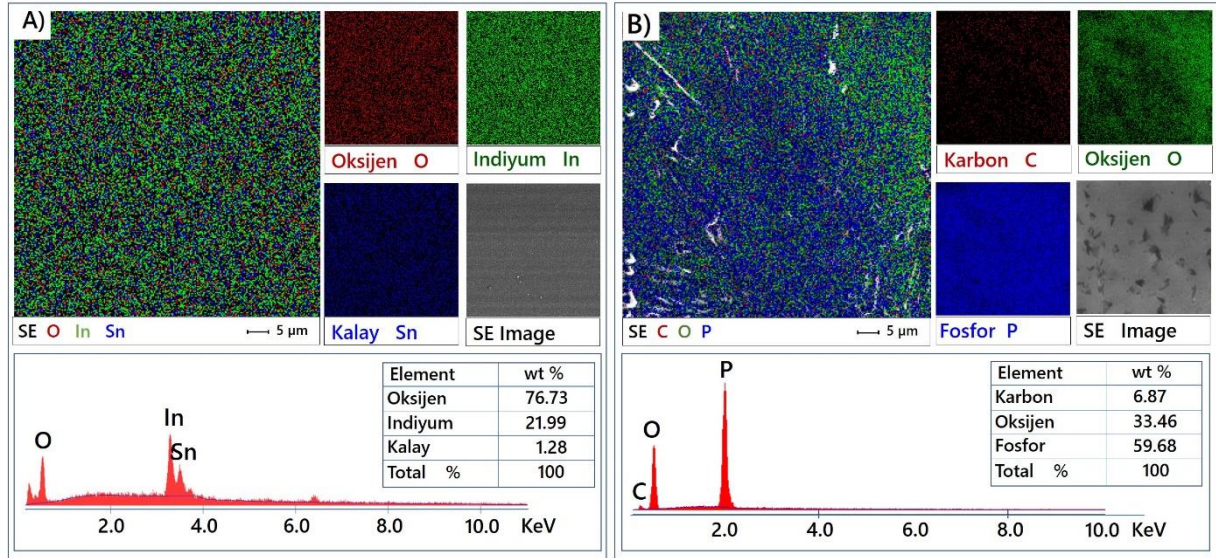


Şekil 4.18. Antikor immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR (A ve B), Raman (C ve D) spektrumları ve PHA modifikasyonu öncesi (E) ve sonrası (F) EDX analiz sonuçları.

Elektrot yüzeyindeki oluşan ara yüzey materyali ile anti-IL 8 arasındaki kimyasal etkileşimler ayrıca Raman spektroskopisi ile de incelenmiştir ki Raman analizleri yüksek molekül ağırlıklı materyaller (Protein vb.) için çoklu bağ yapılarından dolayı daha net bandlar oluşturduklarında daha güvenilir olarak tanımlanırlar (Kurouski ve ark. 2015). ITO-PET elektrotların anti-IL 8 ile immobilizasyon öncesi (siyah) ve sonrası (kırmızı) sırasıyla şekil 4.16 C ve D’ de verilmiştir. Antikor ile immobilizasyon sonrasında yüzeye bağlanan amid I, II ve III pikleri, FTIR spektrumunda (4.18B) üst üste pik çakışmalarından dolayı net gözlemlenemez iken raman spektrumunda daha net keskin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.16D) (Thomas Jr 1999). Şekil 4.9C’de FTIR spektrumuna benzer pikler gözlemlenirken, Raman spektroskopisi antikorların PHA modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra, 1648 cm⁻¹ ve 1546 cm⁻¹’de pikler gözlenmiştir, bu pikler proteindeki amid bağı gösterir (Şekil 4.18B). Raman spektrumunda amid I, II ve III bölgeleri sıklıkla 1650-1680 cm⁻¹, 1480-1570 cm⁻¹, 1235-1300 cm⁻¹’de gözlenmektedir (Aydın ve ark. 2018b). Şekil 4.18D’de gözlemlendiği gibi amid I, II ve III bağları sırasıyla 1662, 1449 ve 1259 cm⁻¹’de görülmüştür (Aydın ve ark. 2018a).

Ayrıca şekil 4.19A-B’ de bulunan SEM-EDX analizleri çalışması ITO elektrot yüzeyinde PHA modifikasyonundan sonra fosfonat gruplarının oluştuğunu göstermek için yapılmıştır. Şekil 4.19A-B’ de ITO elektrodun PHA modifikasyon öncesi ve sonrası yüzeyindeki elementel dağılım yüzdelerini ve değişimi göstermektedir. Buradaki elementel haritalar ve elementel spektrumlar incelendiğinde fosfor piklerinin ITO elektrot yüzeyinde kendiliğinden

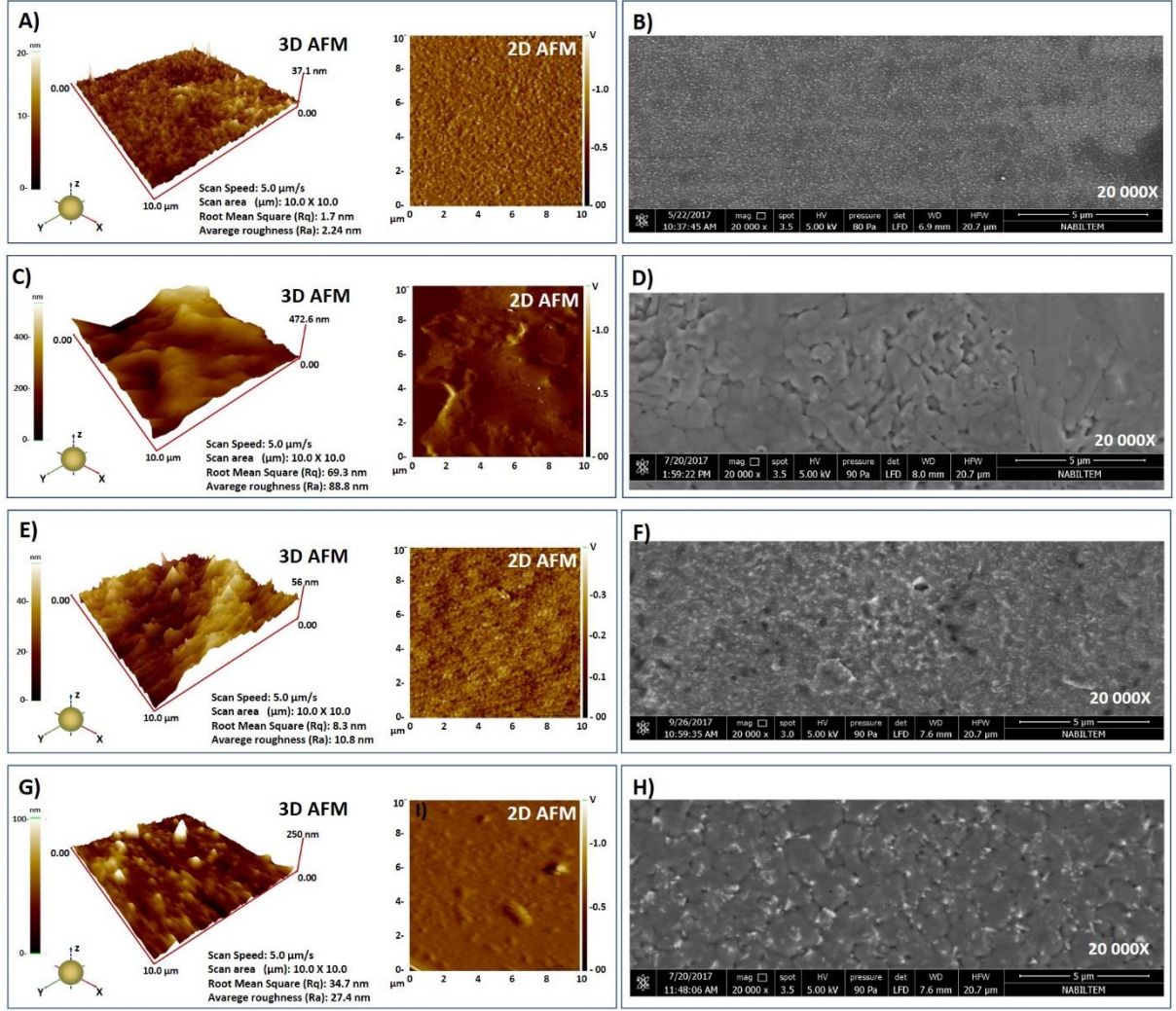
oluşan PHA tabakasından geldiğini söylemek mümkündür. Ayrıca şekil 4.19A'deki elementel harita incelendiğinde fosfor (mavi) elementinin hemen hemen her yerde olduğu bu durumda PHA ara yüzeyden oluşan SAM tabakasının varlığının bir kanıtı olabileceğini düşündürmektedir (Aydın ve Sezgintürk 2018).



Şekil 4.19. Antikor immobilizasyonu öncesi ve sonrası FTIR (A ve B), Raman (C ve D) spektrumları ve PHA modifikasyonu öncesi (E) ve sonrası (F) EDX analiz sonuçları.

Şekil 4.20'de elektrotun her immobilizasyon basamağı sonrasındaki SEM ve AFM görüntüleri yer almaktadır. ITO elektrotların hidroksillenmiş hallerinin SEM ve AFM görüntüleri şekil 4.11A-B de verildiğinden tekrar bu bölümde verilmemiştir. Şekil 4.20A ve 4.20B'de görüldüğü gibi PHA modifiye edilmiş ITO elektrot düzgün ve tekdüze bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir. Bu PHA modifiye edilmiş elektrotun ortalama pürüzlülük değeri (R_a) 2.80 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, PHA'nın elektrot yüzeyinde homojen, iyi-düzenlenmiş bir tabaka halinde bulunduğunu göstermektedir.

Anti- IL 8 antikorunun PHA modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisi tamamen değişmiş ve bu değişiklik hem SEM hemde AFM şekillerinde net bir şekilde göze çarpmaktadır (Şekil 4.20C ve 4.20D). Bu elektrotun R_a değeri 69.3 nm olarak ölçülmüştür. R_a değerindeki artış antikorun ara yüzeye bağlandığı ve amid bağı oluştuğu fikrini desteklemektedir. Aktif karboksil uçlarının BSA ile kaplanmasından sonra (Şekil 4.20E ve 4.20F), yüzeyin çok daha smooth bir hale büründüğü ve R_a değerinin (40.3 nm) bu görüntüyü destekler nitelikte olduğu söylenebilir. Antikor-antijen etkileşiminden sonra, Şekil 4.20G ve 4.20H'de globuler yapılar gözlenmiştir. Bu basamaktaki R_a değeri 27.4 nm olarak ölçülmüştür.

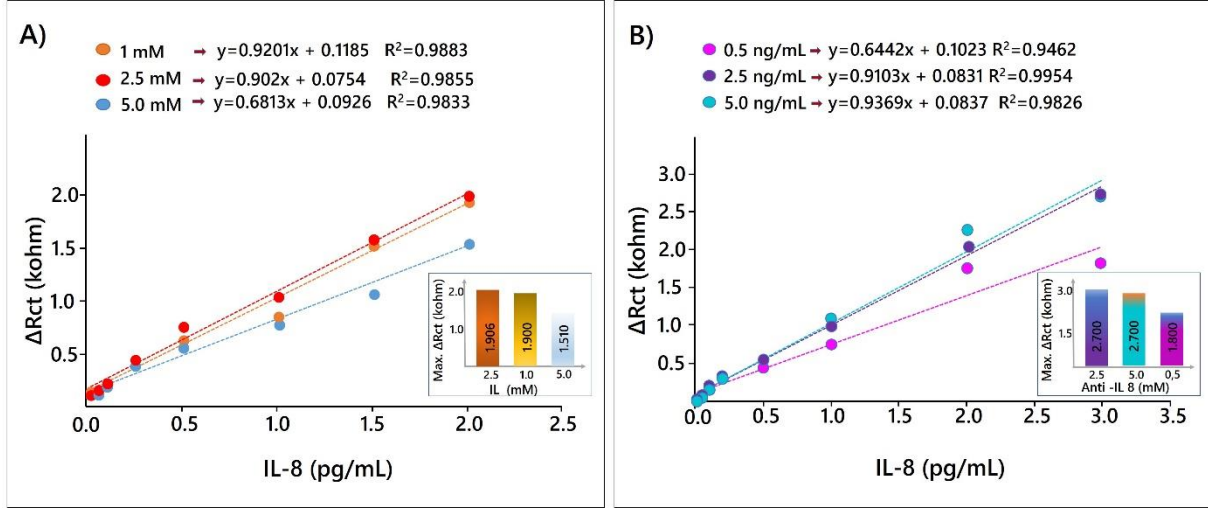


Şekil 4.20. Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; ara yüzey modifikasyonu sonrası (A ve B); antikor immobilizasyonu sonrası (C ve D); BSA ile bloklama sonrası (E ve F); Antikor-antije etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü (G ve H).

4.3.1. Biyosensör 2'nin Optimizasyon Basamakları

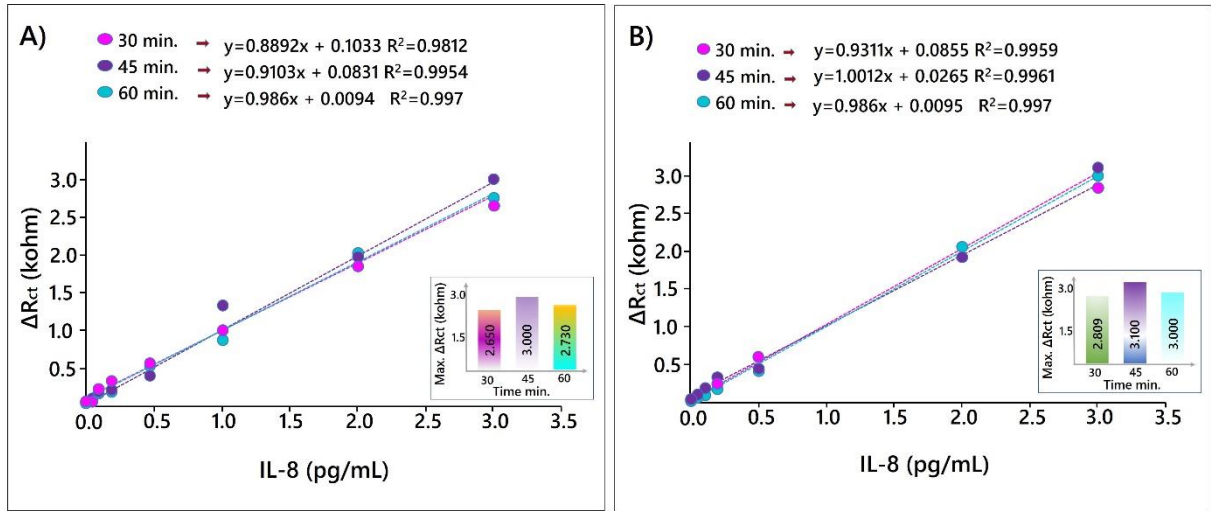
Elektrot yüzeyinde biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu için düzgün bir kendiliğinden oluşan tek tabakaların oluşabilmesi ve oluşan bu tabakanın her çalışmada tekrarlanabilmesi, biyosensörün iyi bir performans sağlaması için oldukça önemlidir. Ayrıca SAM oluşumu biyotanıma elementinin immobilizasyonu için oldukça önemlidir. Bu sebeplerden dolayı, SAMs oluşumu için 3 farklı konsantrasyonda PHA kullanılmıştır. Şekil 4.21A'da görüldüğü gibi 1mM ve 2.5 mM PHA kullanılarak elde edilen sinyal benzerdir ve 5 mM kullanılarak elde edilenden daha yüksektir. Bu yüzden maliyeti düşürmek için deneyler sırasında 1 mM PHA kullanılmıştır. Biyosensörün hassasiyeti büyük ölçüde kullanılan anti-IL 8 antikor konsantrasyonuna bağlıdır. Bu sebeple 3 farklı konsantrasyonda antikor

kullanılmıştır. Şekil 4.21B’de görüldüğü gibi 10 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 8 antikor kullanıldığında elde edilen sinyal düşüktür; 2.5 ng/mL ve 5 ng/mL anti-IL 8 antikor kullanıldığında elde edilen sinyal benzerdir ve maksimum sinyal 2.5 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 8 antikor kullanıldığında elde edilmiştir.



Şekil 4.21. Biyosensör 2’in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PHA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).

Diğer optimizasyon parametresi ise biyotanıma elementi inkübasyon süresidir. Bu parametre antikorun elektrot yüzeyine bağlanma etkisini etkilediğinden oldukça önemlidir. Bu yüzden PHA modifiye ITO elektrot anti-IL 8 antikor içeren fosfat tamponunda 3 farklı sürede (30, 45, 60 dk) inkübe edilmiştir. Şekil 4.22A’de görüldüğü gibi 30 dk antikorların bağlanması için yeterli değildir. En yüksek sinyal 45 dakikada elde edildiğinden dolayı 45 dakika optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Son optimizasyon parametresi IL 8 antijen inkübasyon süresidir. Bu yüzden üretilen elektrotlar 30, 45 ve 60 dk IL 8 antijen içeren fosfat tamponuna daldırılmış ve elektrotların verdikleri cevap ölçülmüştür. Kısa inkübasyon süresi IL 8 antijenin bağlanması için yeterli değildir. Fakat 45 ve 60 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen sinyaller benzerdir ve bu yüzden 45 dk optimum olarak seçilmiştir (Şekil 4.22B).

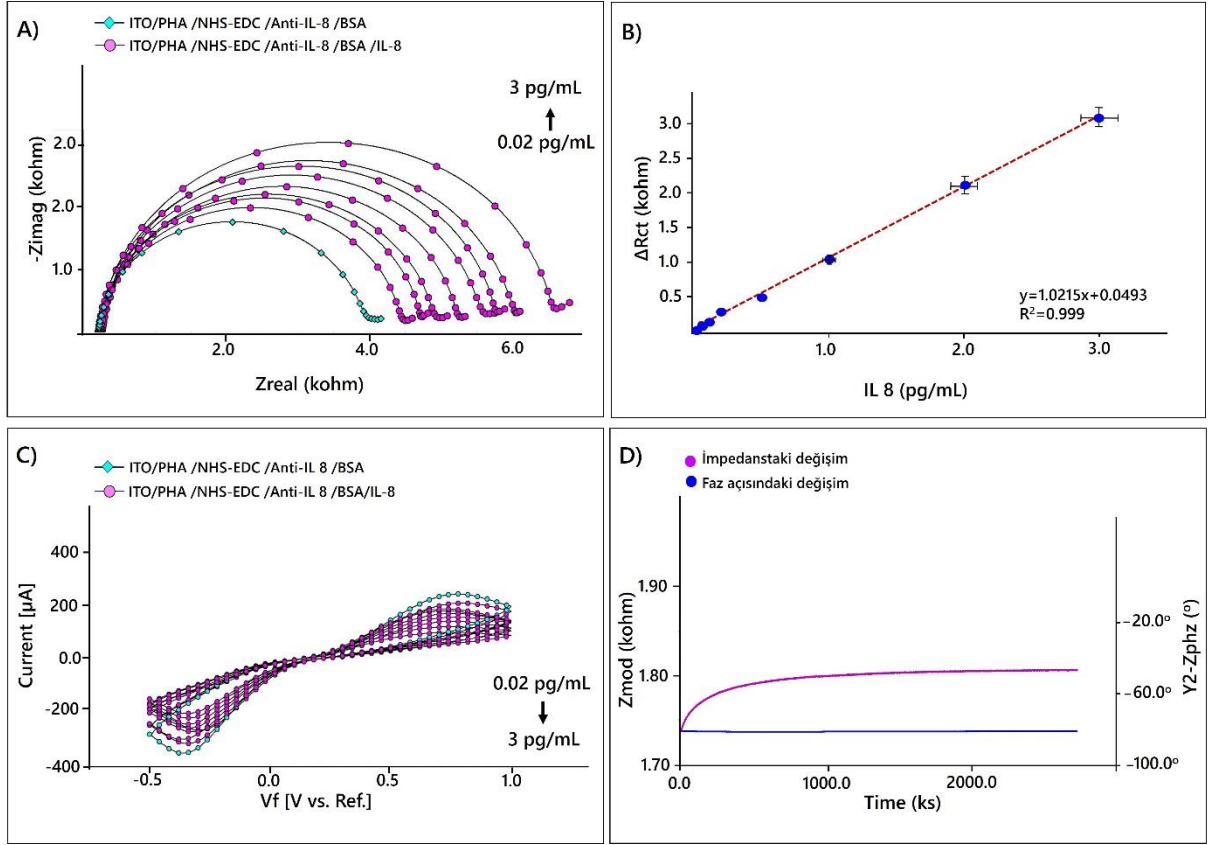


Şekil 4.22. Biyosensör 2'in optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A) ve antijen inkübasyon süresi (B).

- **Lineer Tayin Aralığının Optimizasyonu**

Lineer aralık geliştirilen bir biyosensörün ölçebildiği konsantrasyon aralığını gösterir. Optimum koşullar altında EIS ölçümleri tespit limiti, ölçüm limiti ve lineer tespit aralığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Lineer tespit aralığının tespiti için hazırlanan ITO elektrotlar 8 farklı IL 8 konsantrasyonundaki PBS tamponunda inkübe edilmiş ve EIS-CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrileri ve dönüşümlü voltammetri sonuçları şekil 4.23'de gösterilmiştir.

Şekil 4.23'den de görüldüğü gibi R_{ct} değerleri ile IL 8 konsantrasyonları arasında bir bağıllık vardır. IL 8 antijen konsantrasyonları arttıkça, R_{ct} değerleri artmıştır (Şekil 4.23A) fakat pik akımları azalmıştır (Şekil 4.23C). Bunun sebebi, spesifik tanıma olaylarının artması elektrolit solüsyondan elektrot yüzeyine redoks prob transferini engellemesidir. İmmunosensör cevabı ile artan IL 8 konsantrasyonu arasında 0.02 pg/mL – 3 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.23B). Bu biyosensörün tespit limiti (LOD) 6 fg/mL ve ölçüm limiti 19 fg/mL'dir.



Şekil 4.23. Farklı IL 8 konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralığı (B); İmpedans (A); döngüsel voltametri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.

- **Sabit frekans İmpedans (SFI)**

Anti-IL 8 ve IL 8 antijen arasındaki spesifik bağlanma sabit bir frekansta izlenebilir. Bu işlem zamana karşı toplam impedansın belli bir frekansta izlenmesi ile gerçekleştirilir. SFI’de kullanılacak sabit frekans Bode eğrisinden seçilmiştir. Bio-2’e ait sabit frekans ölçümü şekil 4.23D’de gösterilmiştir. Şekil 4.23D incelendiğinde impedansta artış (pembe) gözlenmiştir ve bu artış anti-IL 8 ve IL 8 antijen arasındaki spesifik bağlanmayı kanıtlamaktadır.

- **Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, raf ömrü çalışması**

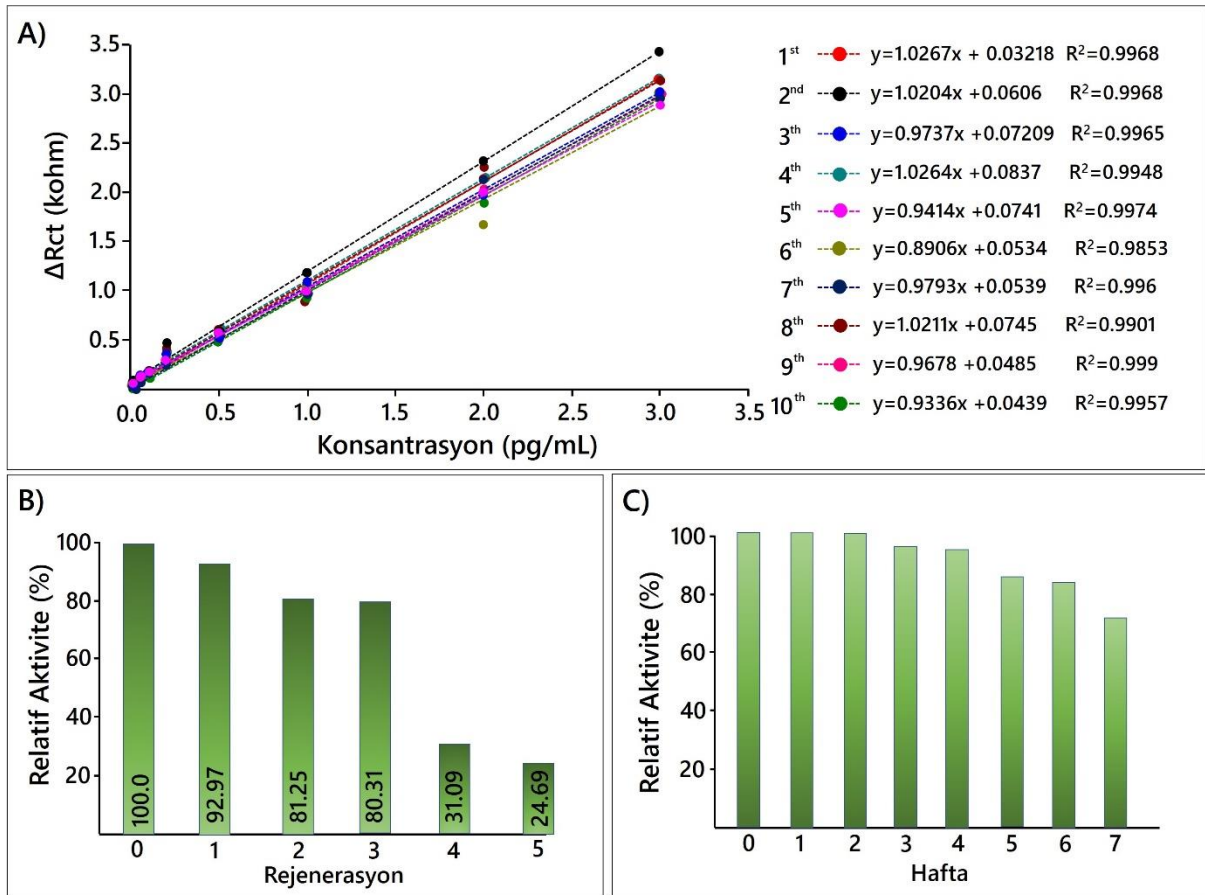
Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterlerinden biridir. Bu doğrultuda lineer aralığımızın orta noktasındaki IL-8 konsantrasyonu (0.5 pg/mL) kullanarak ve yaptığımız tüm optimizasyon çalışmalarını göz önünde bulundurarak, 20 farklı elektroda ait sinyalleri ölçtük. Relatif standart hata %4.49 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç kabul edilebilir tekrarlanabilirliği göstermektedir.

Tekrar üretilebilirlik biyosensörün diğer bir başarı kriteridir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmayı 10 kez tekrar ederek biyosensörümüzün tekrar üretilebilir olup olmadığını araştırdık. Şekil 4.24A’da biyosensöre ait tekrar üretilebilirlik kalibrasyon grafiği bulunmaktadır. Şekil

4.24A'dan görüldüğü gibi tüm biyosensörler benzer lineeriteye sahiptir ve relatif standart hata %5.20 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen relatif standart hata kabul edilebilir tekrar üretilebilirliği göstermektedir.

Biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği, klinik açıdan çok önemlidir. Böylece biyosensör hazırlamak için harcanan zaman azalır ve ölçüm maliyetleri düşer. Bu yüzden biyosensörün rejenerasyonu incelenmiştir. Bu test ayrıca biyosensörün sağlamlığını göstermektedir. Bu yüzden elektrotlar asidik koşullara maruz bırakılır ve biyosensörün cevabı ölçülür. Şekil 4.24B'den görüldüğü gibi biyosensör 5 döngü boyunca iyi sinyal gösterirken, 5 döngü sonunda elektrot yüzeyi bozulmuştur.

Geliştirilen biyosensörün uzun ömürlü olması biyosensörün başarısını gösteren bir kriterdir. Bu yüzden hazırlanan biyosensörler buzdolabında 10 hafta boyunca bekletildi. 7 hafta bekleme sonucunda ölçülen %70.9'a düşmüştür ve bu durum iyi stabilizeyi göstermektedir (Şekil 4.24C).



Şekil 4.24. Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.

- **Biyosensör ile Gerçek Serum ve Tükürükte IL-8 Analizi**

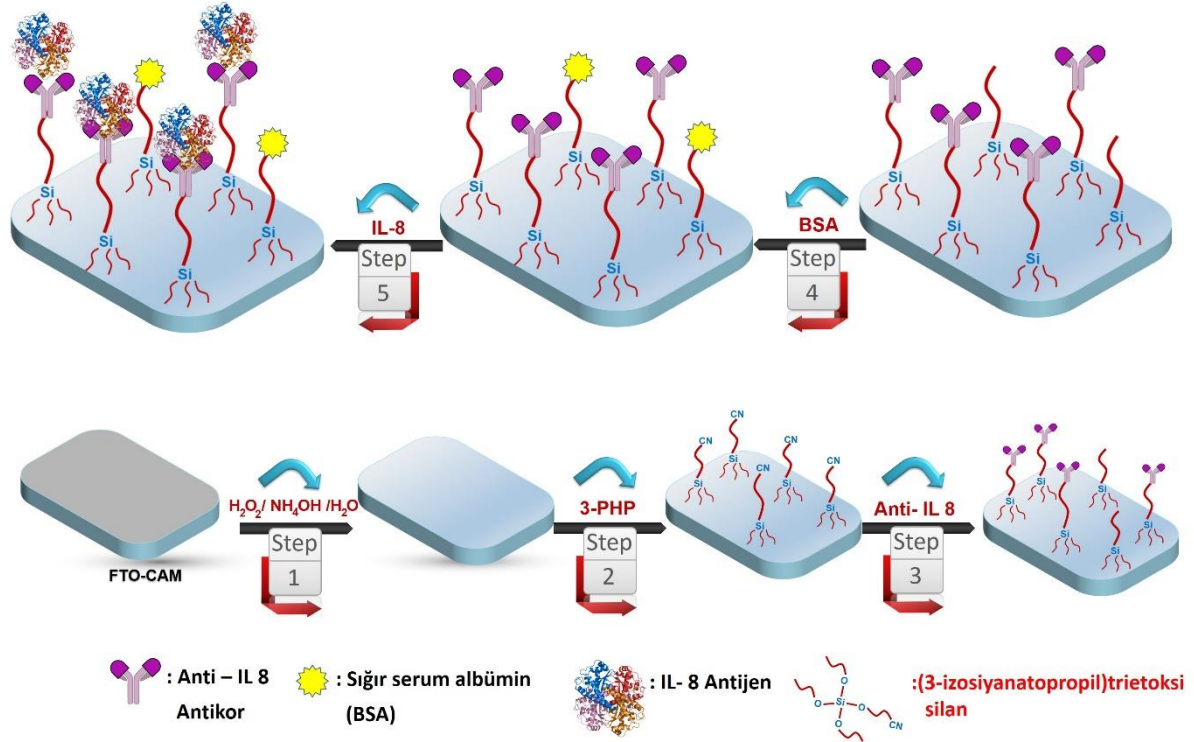
Geliştirdiğimiz biyosensörü denemek amacıyla gerçek serum ve tükürükte IL-8 antijeni tayin edilmiştir. Tükürük ve serum numunelerinde biyosensör ile IL 8 tayin etmek için 200 ve 50 kat seyreltilmiştir. Biyosensör ile elde edilen sonuçlar, ELISA kit sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çizelge 2’de iki metot kullanılarak bulunan sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2. Gerçek serum ve tükürük IL 8 analiz sonuçları.

Örnek	ELISA kit tespit edilen (pg/mL)	Biyosensör ile tespit edilen (pg/mL)	% Fark	% Relatif fark
Tükürük 1	247,73	252,77	102,03	2,03
Tükürük 2	216,77	211,45	97,55	-2,45
Tükürük 3	392,38	387,96	98,87	-1,13
Tükürük 4	481,15	472,54	98,21	-1,79
Tükürük 5	537,32	549,78	102,32	2,32
Serum 1	59,62	59,57	99,91	-0,09
Serum 2	26,33	25,99	98,71	-1,29
Serum 3	85,1	86,98	102,21	2,21
Serum 4	101,12	105,09	103,93	3,93
Serum 5	67,7	69,70	102,96	2,96

4.4 Biyosensör 3 (Bio-3)

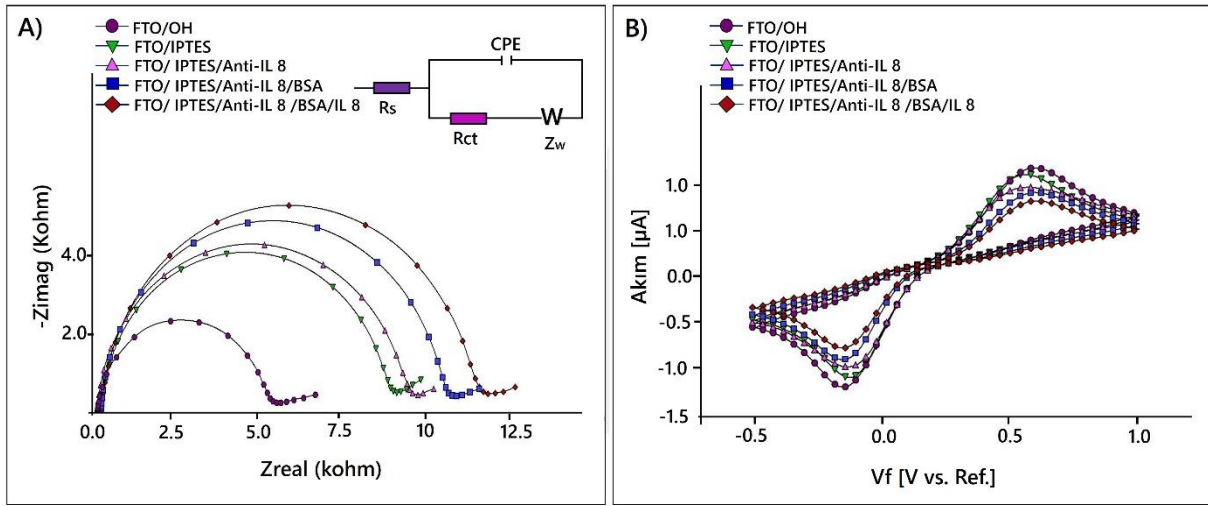
Bu bölümde elektrot materyali olarak ITO-PET yerine FTO-Cam'lar kullanılmıştır. Bu çalışmada ara yüzey materyali olarak 3-(trietoksisilil)propil isosiyanat (IPTES) kullanılarak hedef analit olarak interleukin 8'in tayin ve tespiti için geliştirilmiştir. Şekil 4.25'de biyosensör 3'e ait immobilizasyon şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.25. Biyosensör 3'e ait immobilizasyon şeması.

Interleukin 8 tayini ve tespitinde kullanılacak tek kullanımlık FTO elektrotlar, öncelikle yüzeylerinde organik kontaminasyon olasılığına karşı ITO elektrotlarda olduğu gibi ultrasonik banyoda 10'ar dakika süre ile aseton-sabun çözeltisi ve saf su kullanılarak temizlendi. FTO elektrotların iletkenliğini arttırmak ve yüzeyde aktif hidroksil uç grupları oluşturmak suretiyle bir sonraki adımda immobilizasyonların başarıyla gerçekleştirilmesi için temiz ITO elektrotlar 1:1:5 oranında sırasıyla $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ içeren çözeltinin içerisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Bir sonraki basamakta anti-IL 8'in elektrot yüzeyine bağlanarak elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan ara yüzey tabakalar meydana getirmek için, elektrotlar toluende çözülerek hazırlanan 3-(trietoksisilil)propil isosiyanat (IPTES) çözeltisine daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra yıkanıp nazikçe kurutulmuş elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. SAMs tabakaları oluşturulmuş bu elektrotlar antikorların kovalent immobilizasyonuna hazır hale geldi. Elektrotlar anti-IL 8 antikor içeren

fosfat tamponuna daldırılıp inkübasyona bırakıldı. Zayıf bağlanmış antikorları uzaklaştırmak için elektrotlar yıkanıp saf argon altında nazikçe kurutuldu ve CV-EIS ölçümleri alındı. Açık uçları bloklama ajanı olarak ise elektrotlara %0.5 BSA'da 1 saatlik inkübasyon işlemi uygulandı ve yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. Immobilizasyon aşamalarından sonra hazır hale gelen elektrotlar, 8 farklı ve artan konsantrasyonda IL 8 içeren fosfat tamponu çözeltilerine inkübasyona bırakılmıştır. Her elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınarak ve böylece IL 8 tayini için biyosensör üretilmiş oldu. Biyosensörün fabrikasyon sırasında immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltamogramlarını ve impedans eğrileri şekil 4.26'de gösterilmektedir. Ayrıca yüzeyde oluşan bu değişimleri izlemek için SEM ve AFM cihazı kullanılarak morfolojik karakterizasyon yapılmıştır (Şekil 4.28).



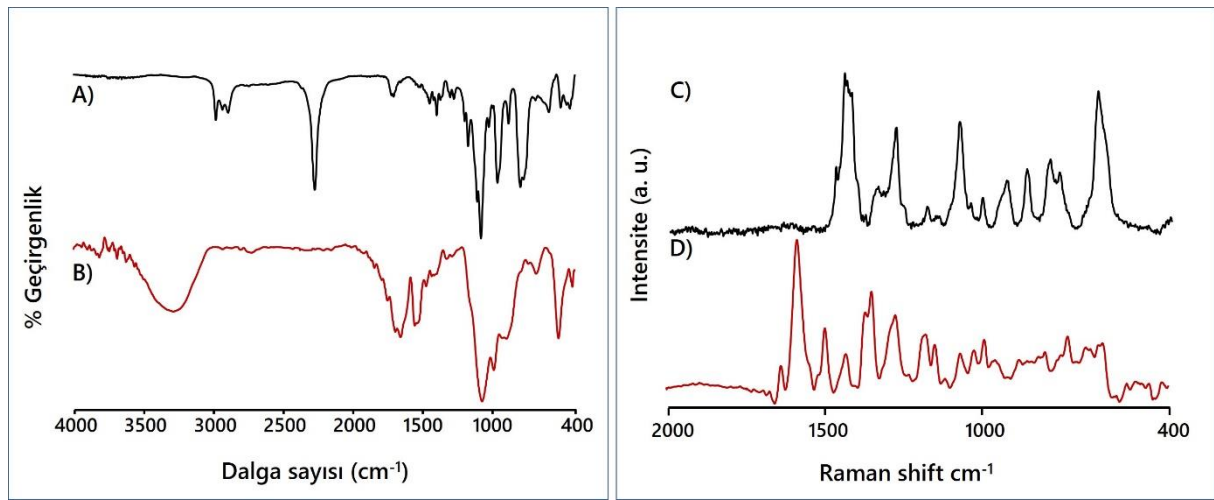
Şekil 4.26. Biyosensör 3'ün immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).

Şekil 4.26A, ITO elektrotun farklı yüzey koşullarındaki Nyquist eğrilerini göstermektedir. IPTES tabakasının başarı ile ITO elektrot yüzeyine immobilizasyonu, elektrot yüzeyinde iletkenliği azalttığından R_{ct} değerinde artışa neden olmuştur. Modifiye yüzeyler üzerinde yük transfer direnci beklendiği gibi temiz elektrottan daha fazladır, bu tabakanın bloklayıcı etkisini gösterir. Anti-IL 8 antikorun immobilizasyonu sonucunda R_{ct} değeri artmıştır, bu durum antikorların elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğunu ve protein yapısından dolayı elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu engellediğini gösterir. Elektrotların BSA içeren fosfat tamponunda inkübasyonundan sonra R_{ct} değeri artmıştır, bu durum açıkta kalan isosiyano grupların bloklandığını göstermektedir. Bu aşamalardan sonra elektrot IL 8 tayinine hazır hale gelmiştir. IL 8 antijenin immobilizasyonundan sonra, antikor-antijen etkileşimlerinden dolayı R_{ct} değeri artmıştır. Bu etkileşimler yüzeydeki iletken olmayan

tabakanın artmasına ve elektron transferinin zorlaşmasına neden olur. Ek olarak, protein immobilizasyonundan sonra R_{ct} değerinde artış gözlenmesinin bir sebebi antikorun makromoleküler yapısından dolayı engellemesidir. EIS verileri incelendiğinde anti-IL 8 antikor, BSA ve IL 8 antijenin immobilizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

EIS ölçümleri dışında, immunosensörün fabrikasyon prosesi CV ölçümleri kullanılarak da incelenmiştir. Şekil 4.26B’de görüldüğü gibi IPTES tabakasının oluşumundan sonra, SAMs tabakasının iletken olmayan yapısından dolayı pik akımı azalmıştır. Elektrot yüzeyine anti-IL 8 antikor immobilizasyonu pik akımında azalmaya gözlenmiştir, bu antikorların elektrottan elektrolit ara yüzeyine elektron transferine engel olan bir bariyer oluşturduğunu gösterir. BSA kullanarak bloklama işleminden sonra boşta kalan bağlanma bölgelerinin bloklanması ile pik akımları azalmıştır. IL 8 antijenlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra antikor ve antijen arasındaki spesifik etkileşimlerden dolayı azalma gözlenmiştir.

Elektrot yüzeyinde IPTES kendiliğinden oluşan tabakaların oluştuğunu ve antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonun gerçekleştiğini izlemek için ayrıca FTIR ve Raman ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 4.27’de Bio-3 biyosensörüne ait FTIR ve Raman Spektrumları gösterilmektedir.

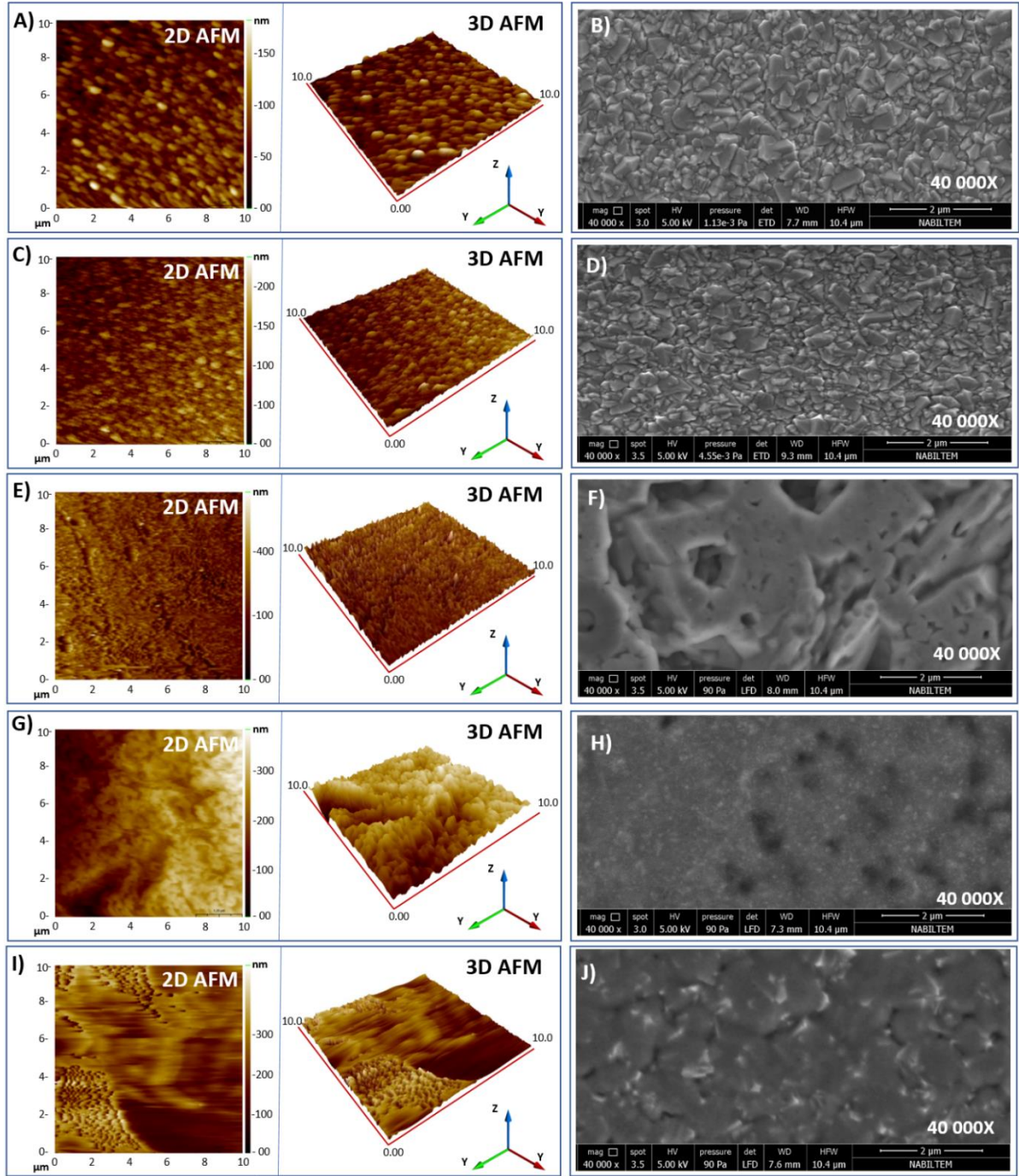


Şekil 4.27. FTO elektrotların anti-IL 8 immobilizasyon öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları.

IPTES ile modifiye edilmiş üzerinde izosiyonat aktif grupları taşıyan FTO elektrodun anti-IL 8 ile immobilizasyon öncesi (siyah) ve sonrası (kırmızı) FTIR spektrumları 4.27A ve 4.27’de verilmiştir. Şekil 4.27A’da verilen spektrum incelendiğinde en bariz şekilde 2265 cm^{-1} ’deki karakteristik izosiyonat piki göze çarpmaktadır. Ayrıca spektrumda 960 cm^{-1} ve 1070 cm^{-1} civarlarında gözlemlenen pikler Si-O bağlarına ve 1090 cm^{-1} civarındaki piklerde Si-CH₂

bağlarına atıf edilmektedir. Ayrıca spektrum üzerinde 1700 cm^{-1} 'de karbonil pikleride gözlemlenmektedir. Şekil 4.27A' da bulunan spektrumda bulunan bu pikler elektrot yüzeyinde oluşan tek tabakalı IPTES' in varlığının kimyasal olarak kanıtıdır (Ozmen ve ark. 2009). IPTES ile SAM tabakaları oluşturulmuş elektrotların anti- IL 8 immobilizasyonu sonrasındaki FTIR spektrumu şekil 4.27B de verilmiştir. Bir önceki spektrum ile karşılaştırıldığında siyano piklerinin ortadan kaybolması ve amid bağlarının gözlemlenmesi IPTES ile kaplanmış elektrot yüzeyin anti- IL 8' in bağlandığının en büyük kanıtıdır. Elektrot yüzeyindeki oluşan ara yüzey materyali ile anti-IL 8 arasındaki kimyasal etkileşimler ayrıca Raman spektroskopisi yardımı ile de incelenmiştir. FTO elektrotların anti-IL 8 ile immobilizasyon öncesi (siyah) ve sonrası (kırmızı) spektrumları sırasıyla şekil 4.27 C ve D' de verilmiştir. Şekil 4.27C'de FTIR spektrumuna benzer pikler gözlemlenirken, antikorumların IPTES modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra, 1635 cm^{-1} ve 1584 cm^{-1} 'de pikler gözlenmiş ve bu pikler proteindeki amid bağlarına atıf edilmektedir (Şekil 4.27D).

Şekil 4.28'te FTO elektrotların her immobilizasyon basamağından sonra SEM ve AFM görüntüleri bulunmaktadır. Şekil 4.28A ve 4.28B'de görüldüğü gibi hidroksillenmiş FTO elektrot yüzeyi önceki çalışmalarda kullanılan hidroksillenmiş ITO-PET'ler ile karşılaştırıldığında daha pürüzlü bir yapıda görülmekte ortalama roughness (Ra) değeri oldukça düşük seviyelerde (19.4 nm) ölçülmüştür. IPTES yüzey modifikasyonundan sonra, FTO elektrot yüzeyinin görüntüsünde köklü bir değişiklik olmaz iken bu durum oluşan IPTES monolayer tabakanın homojen olduğunun bir göstergesidir ve ortalama pürüzlülük değeri (Ra) 25.4 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.28C ve 4.28D). Anti-IL 8 antikorumunun IPTES modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisi büyük ölçüde değişmiştir ve bu değişim hem SEM hemde AFM görüntülerinde gözlenmektedir (Şekil 4.28E ve 4.28F). Bu basamaktaki elektrotun ortalama pürüzlülük değeri 52.9 nm olarak ölçülmüştür ve Ra değerindeki artış antikorumların yüzeye bağlandığının bir kanıtıdır. BSA ile bloklama işleminden sonra, elektrotun hem SEM görüntüsü hemde AFM görüntüsü önceki çalışmalardakine benzer şekilde yüzeyin daha smooth bir hal aldığı ortaya koymaktadır (Şekil 4.28G ve 4.28H). Bu basamaktaki pürüzlülük değeri 36.1 nm olarak ölçülmüştür.

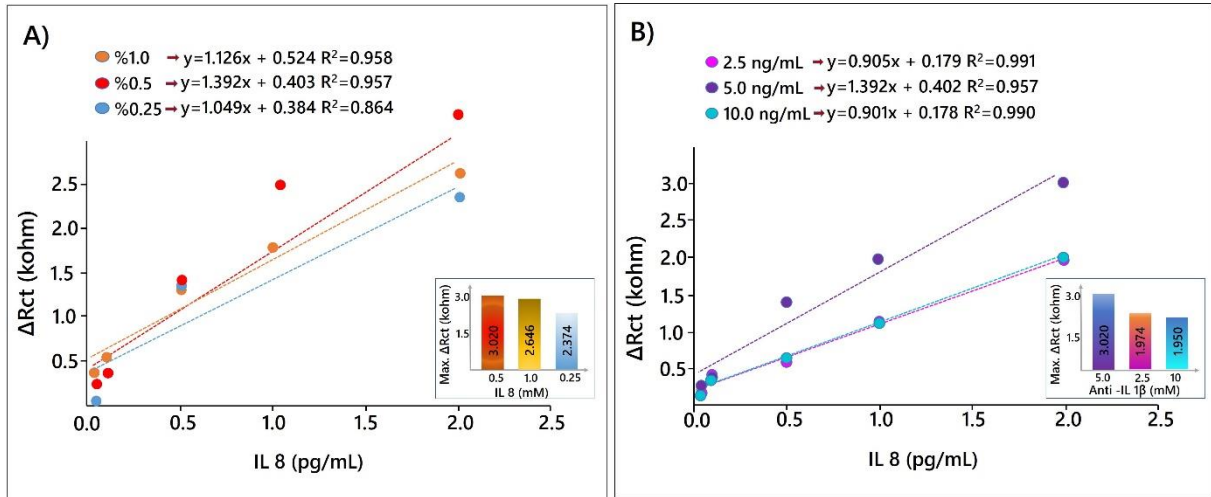


Şekil 4.28. Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; hidroksillenmiş FTO elektrotu (A ve B); ara yüzey modifikasyonu sonrası (C ve D); antikor immobilizasyonu sonrası (E ve F); BSA ile bloklama sonrası (G ve H); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü (I ve J).

Antikor-antijen etkileşiminden sonra, Şekil 4.28I ve 4.28J'de globuler yapılar gözlemlenirken yüzey morfolojisindeki bir miktar değişim ortalama pürüzlülük değerindeki az miktardaki artış (56.1 nm) ile AFM görüntüleri ve ölçümleri ile bu sonucu desteklemektedir.

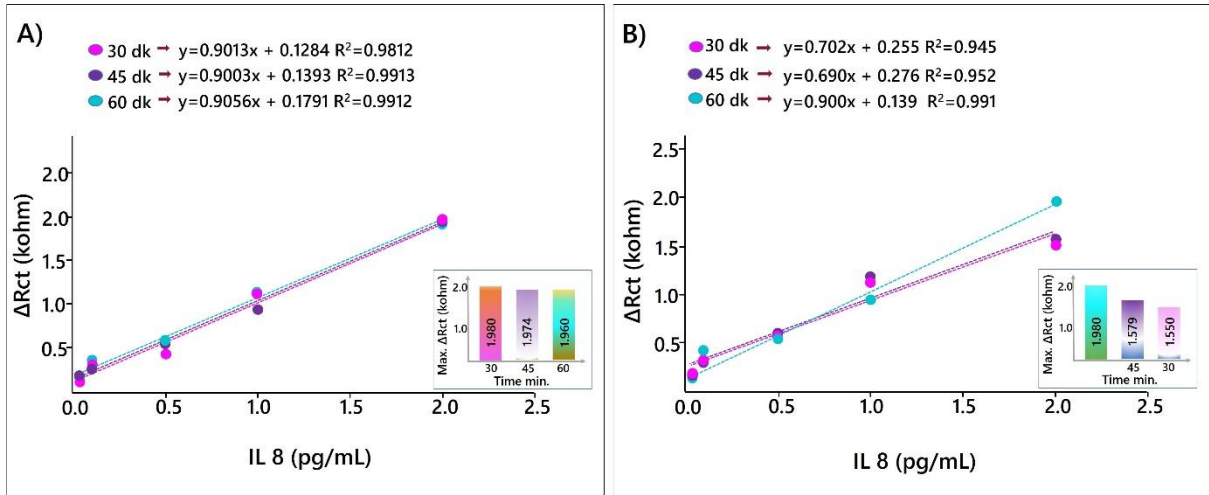
4.4.1. Biyosensör 3'ün Optimizasyon Basamakları

Elektrot yüzeyinde biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu için düzgün bir kendiliğinden oluşan tek tabakaların oluşabilmesi ve oluşan bu tabakanın her çalışmada tekrarlanabilmesi, biyosensörün iyi bir performans sağlaması için oldukça önemlidir. Bu sebeple, SAMs oluşumu için 3 farklı konsantrasyonda (0.25%, 0.5% ve 1%) IPTES kullanılarak biyosensör üretilmiştir.



Şekil 4.29. Biyosensör 3'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) IPTES konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B); antikor inkübasyon süresi (C); antijen inkübasyon süresi (D).

Şekil 4.29A'da görüldüğü gibi %0.25 konsantrasyonunda IPTES kullanıldığında düzgün sinyaller alınmamıştır. %0.5 ve %1.0 konsantrasyonlarda IPTES kullanılarak hazırlanan biyosensörlere ait sinyaller karşılaştırıldığında, %0.5 IPTES konsantrasyonunda maksimum sinyale ulaşılmıştır. Biyosensörün hassasiyeti büyük ölçüde kullanılan anti-IL 8 antikor konsantrasyonuna bağlıdır. Bu sebeple 3 farklı konsantrasyonda (2.5 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL) antikor kullanılmıştır. Şekil 4.29B'de görüldüğü gibi 10 ng/mL ve 2.5 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 8 antikor kullanıldığında elde edilen sinyal benzerdir ve maksimum sinyal 5 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 8 antikor kullanıldığında elde edilmiştir.

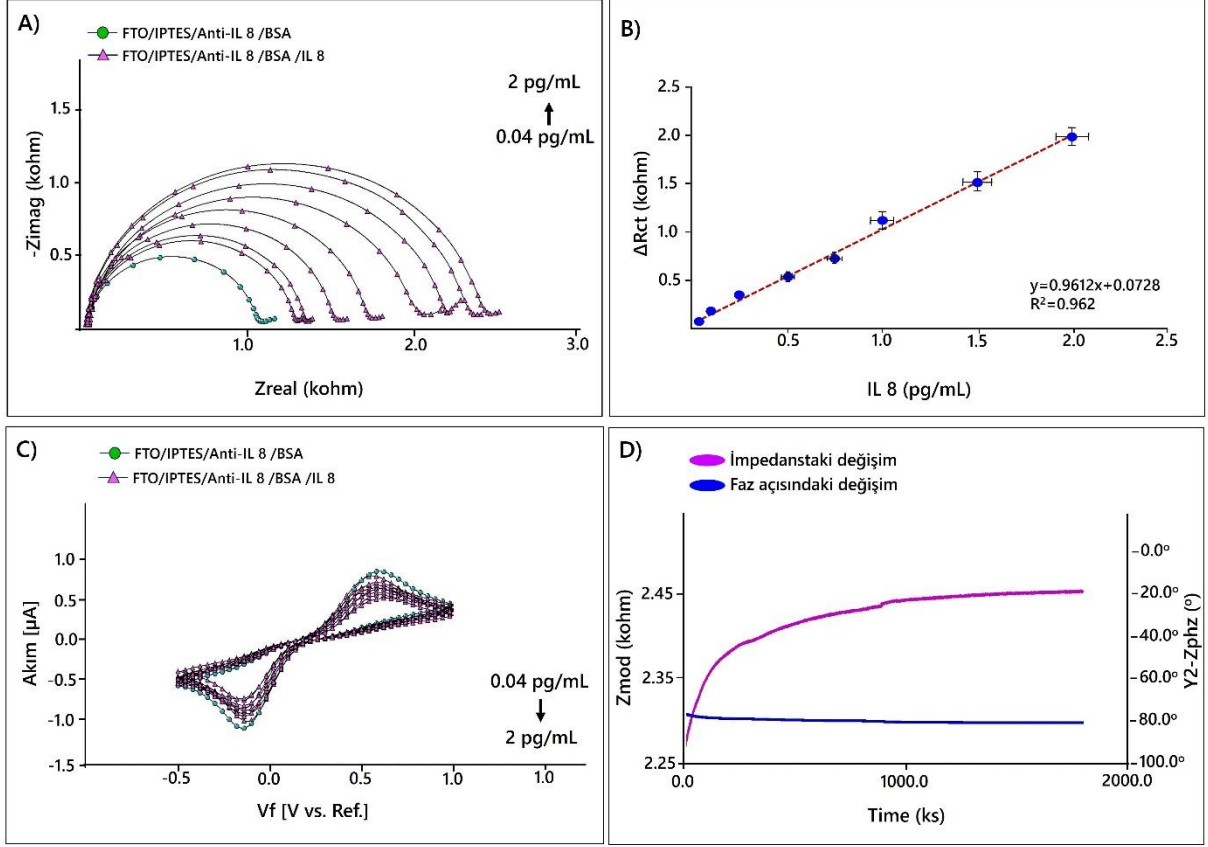


Şekil 4.30. Biyosensör 3'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B).

Diğer optimizasyon parametresi ise biyotanıma elementi inkübasyon süresidir. Bu parametre antikorun elektrot yüzeyine bağlanma etkisini etkilediğinden oldukça önemlidir. Bu yüzden IPTES modifiye FTO elektrot anti-IL 8 antikor içeren fosfat tamponunda 3 farklı sürede (30, 45, 60 dk) inkübe edilmiştir. Şekil 4.25C'de görüldüğü gibi tüm inkübasyon sürelerinde benzer sinyaller alınmıştır. Bu yüzden R^2 değeri göz önünde bulundurulduğunda 45 dk optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Son optimizasyon parametresi IL 8 antijen inkübasyon süresidir. Bu yüzden üretilen elektrotlar 30, 45 ve 60 dk IL 8 antijen içeren fosfat tamponuna daldırılmış ve elektrotların verdikleri cevap ölçülmüştür. Kısa inkübasyon süreleri IL 8 antijenin bağlanması için yeterli değildir. Bu yüzden 60 dk optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir (Şekil 4.30B).

- **Lineer Tayin Aralığının Optimizasyonu**

İmmunosensörün analitik performansını incelemek için, optimum deneysel koşullar altında farklı konsantrasyonunda IL 8 standart çözeltileri ölçülmüştür. Böylece biyosensörün lineer aralığı tespit edilmiştir. Lineer aralık geliştirilen bir biyosensörün ölçebildiği konsantrasyon aralığını gösterir.



Şekil 4.31. Farklı IL 8 konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltametri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.

Şekil 4.31A ve 4.31C, artan IL 8 konsantrasyonu kullanarak hazırlanan biyosensörlerin impedans spektralarını ve dönüşümlü voltammogramlarını göstermektedir. Artan IL 8 konsantrasyonları R_{ct} değerinde artmaya ve pik akımlarında azalmaya neden olmaktadır. Bu artma ve azalmanın nedeni proteinlerin elektrot yüzeyine bağlanmasıyla elektrot yüzeyindeki tabakanın artmasıdır. Böylece anti-IL 8 antikor – IL 8 antijen kompleksinin miktarı artmıştır ve bu durum elektrot ara yüzeyinde gerçekleşen redoks probunun elektron transfer reaksiyonun baskılanmasına neden olmuştur. İmmunosensör cevabı ile artan IL 8 konsantrasyonu arasında 0.04 pg/mL – 2 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.31B). Bu biyosensörün tespit limiti (LOD) 10,6 fg/mL ve ölçüm limiti 35,3 fg/mL’dir.

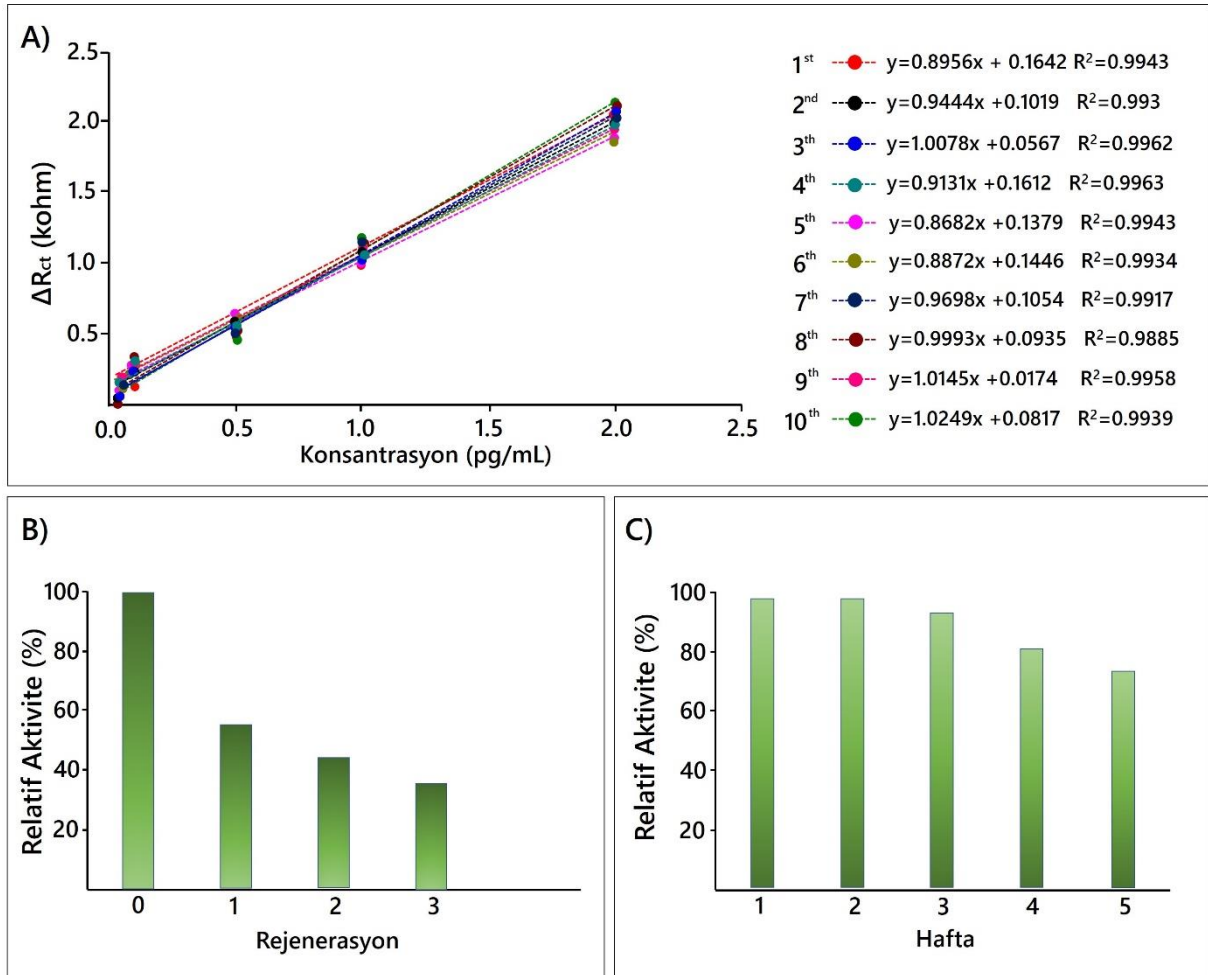
- **Sabit Frekans İmpedans (SFI)**

Anti-IL 8 ve IL 8 antijen arasındaki spesifik bağlanma sabit bir frekansta izlenebilir. Bu işlem zamana karşı toplam impedansın belli bir frekansta izlenmesi ile gerçekleştirilir. SFI’de kullanılacak sabit frekans Bode eğrisinden seçilmiştir. Bio-3’e ait sabit frekans ölçümü şekil 4.31D’de gösterilmiştir. Şekil 4.31D incelendiğinde impedansta artış (pembe) gözlenmiştir ve bu artış anti-IL 8 ve IL 8 antijen arasındaki spesifik bağlanmayı kanıtlamaktadır.

- **Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, raf ömrü çalışması**

Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterlerinden biridir. Bu doğrultuda 0.75 pg/mL konsantrasyonunda IL-8 kullanarak ve yaptığımız tüm optimizasyon çalışmalarını göz önünde bulundurarak, 20 farklı elektroda ait sinyaller ölçüldü. Relatif standart hata %5.57 olarak hesaplandı. Bu sonuç kabul edilebilir tekrarlanabilirliği göstermektedir.

Tekrar üretilebilirlik biyosensörün diğer bir başarı kriteridir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmayı 10 kez tekrar ederek biyosensörün tekrar üretilebilir olup olmadığını araştırıldı. Şekil 4.32A'da biyosensöre ait tekrar üretilebilirlik kalibrasyon grafiği bulunmaktadır. Şekil 4.32A'dan görüldüğü gibi tüm biyosensörler benzer lineeriteye sahiptir ve relatif standart hata %6.15 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen relatif standart hata kabul edilebilir tekrar üretilebilirliği göstermektedir.



Şekil 4.32. Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.

Biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği, klinik açıdan çok önemlidir. Böylece biyosensör hazırlamak için harcanan zaman azalır ve ölçüm maliyetleri düşer. Bu yüzden

biyosensörün rejenerasyonu incelenmiştir. Bu test ayrıca biyosensörün sağlamlığını göstermektedir. Bu yüzden elektrotlar asidik koşullara maruz bırakılır ve biyosensörün cevabı ölçülür. Şekil 4.32B’den görüldüğü gibi biyosensör 3 döngü boyunca iyi sinyal gösterirken, 3 döngü sonunda elektrot yüzeyi bozulmuştur.

Geliştirilen biyosensörün uzun ömürlü olması biyosensörün başarısını gösteren bir kriterdir. Bu yüzden hazırlanan biyosensörler buzdolabında 10 hafta boyunca bekletildi. 5 hafta bekleme sonucunda ölçülen %73.39’a düşmüştür ve bu durum iyi stabiliteyi göstermektedir (Şekil 4.32C).

- **Biyosensör ile Gerçek Tükürükte IL 8 Analizi**

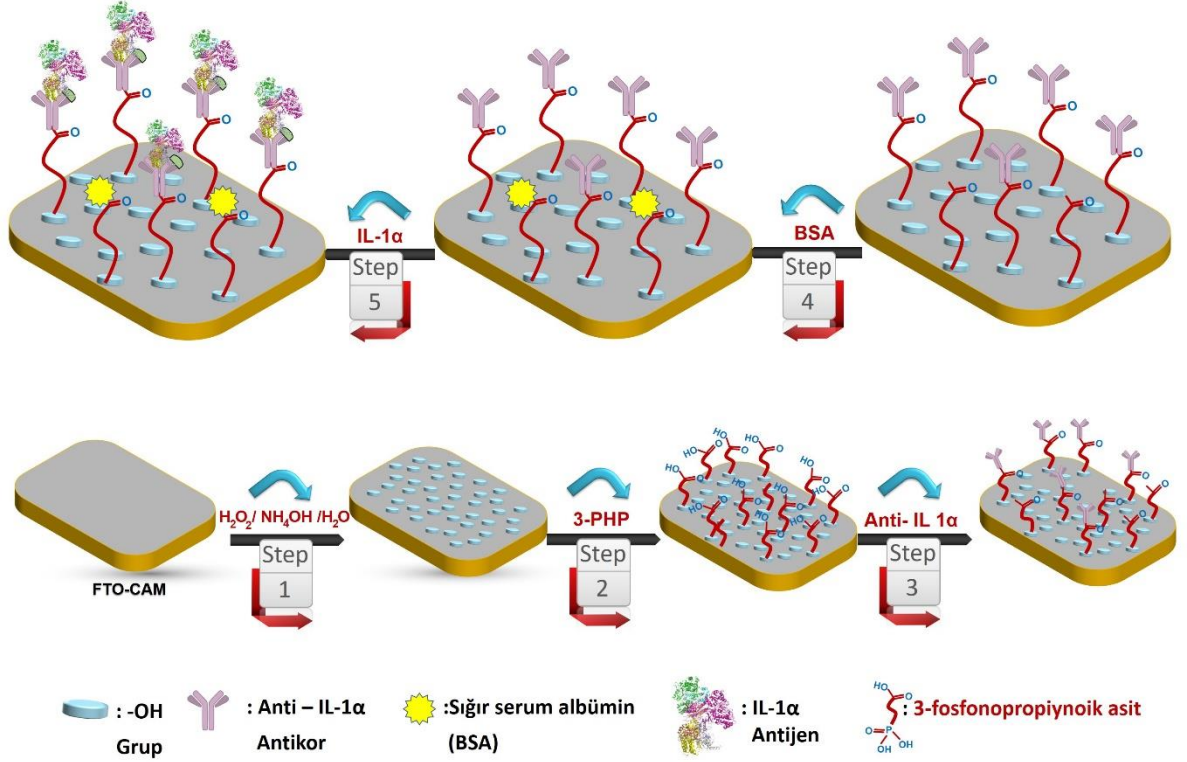
Geliştirdiğimiz biyosensörü denemek amacıyla gerçek tükürükte IL-8 antijeni tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ELISA kit ile karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.3’de de görüldüğü gibi sonuçlar birbiri ile uyumludur.

Çizelge 4.3. Gerçek tükürük IL 8 analiz sonuçları.

Örnek	Biyosensör sonuçları (pg/mL)	ELISA kit sonucu (pg/mL)	% Relatif Farklılık
Tükürük 1	1,22	1,24	-1,12
Tükürük 2	1,07	1,08	-1,40
Tükürük 3	1,30	1,31	-0,71
Tükürük 4	1,63	1,60	1,40
Tükürük 5	1,80	1,79	0,33

4.5. BİYOSENSÖR 4 (BİO-4)

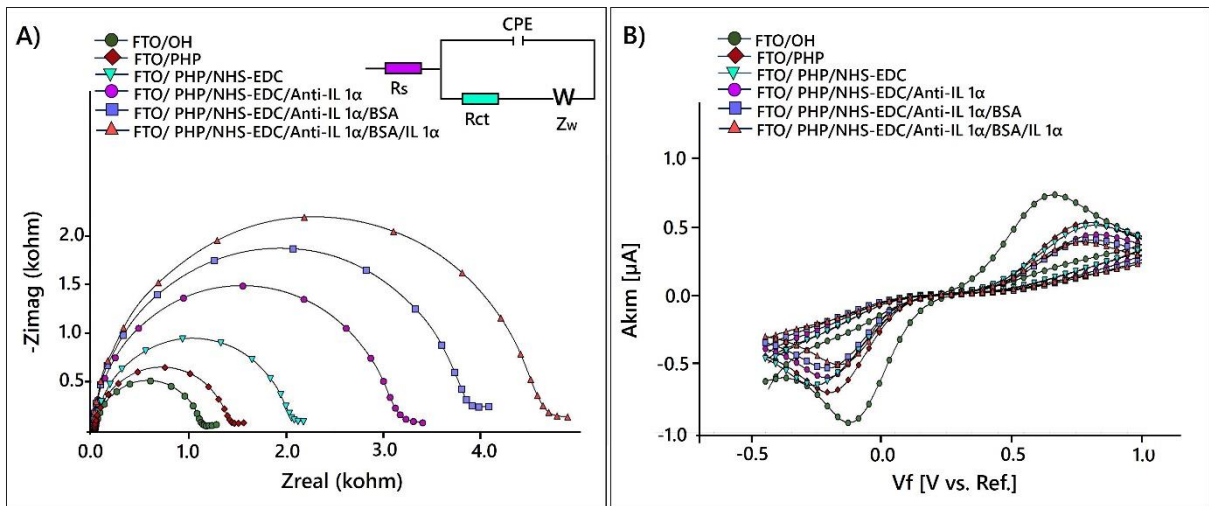
Bu bölümde biyosensör üretimi için FTO-CAM elektrot, ara yüzey materyali 3-fosfonopropiyonik asit (PHP) ve antikor-antijen çifti Anti-IL 1 α ve IL 1 α seçilmiştir. Şekil 4.33’de biyosensör 4 ün üretimine ait immobilizasyon şeması ayrıntılı bir şekilde gösterilmektedir.



Şekil 4.33. Biyosensör 4’e ait immobilizasyon şeması.

Biyosensör 4’ün immobilizasyon adımları şekil 4.33’den de görüldüğü gibi bir öncekilerine benzemektedir. Interleukin 1 α (IL 1 α) tayini ve tespitinde kullanılacak tek kullanımlık FTO elektrotlar, öncelikle yüzeylerinde organik kontaminasyon olasılığına karşı ultrasonik banyoda 10’ar dakika süre ile aseton-sabun çözeltisi ve saf su kullanılarak temizlendi. Elektrotların iletkenliğini arttırmak, yüzeyde aktif -OH uçları oluşturmak suretiyle bir sonraki adımda immobilizasyonların başarıyla gerçekleştirilmesi için temiz FTO elektrotlar 1:1:5 oranında sırasıyla NH₄OH/H₂O₂/H₂O içeren çözeltinin içerisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Yüzeyinde aktif -OH uç grupları bulunan elektrotlar SAMs tabakalarını meydana getirmek için DMSO-saf su (1:1) karışımında çözülerek hazırlanan 3-fosfonopropiyonik asit (PHP) çözeltisine daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. SAMs tabakaları

oluşturulmuş bu elektrotlar antikorların kovalent immobilizasyonuna hazır hale geldiği için bir sonraki basamakta anti-IL 1 α antikor içeren fosfat tamponuna daldırılarak inkübasyon için gerekli süre kadar bekletildi. Zayıf bağlanmış antikorları uzaklaştırmak için elektrotlar her basamak sonrasında olduğu gibi yıkanıp saf argon altında kurutuldu ve CV-EIS ölçümleri alındı. Elektrot yüzeylerindeki serbest asit uç grupları %0.5 BSA çözeltisinde inkübasyona bırakılarak bloklama işlemi gerçekleştirildi ve yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri yapıldı. Immobilizasyon aşamalarından sonra hazır hale getirilen elektrotlar, 8 farklı ve artan konsantrasyonda IL 1 α içeren fosfat tamponu çözeltilerine inkübasyona bırakılmıştır. Her elektrotun EIS ve CV ölçümleri alınmış ve böylece IL 1 α tayini için biyosensör üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün fabrikasyon sırasında immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltamogramlarını ve impedans eğrileri Şekil 4.34’de verilmiştir. Ayrıca yüzeyde oluşan bu değişimleri izlemek için SEM ve AFM cihazı kullanılarak morfolojik karakterizasyon yapılmıştır (Şekil 4.36).



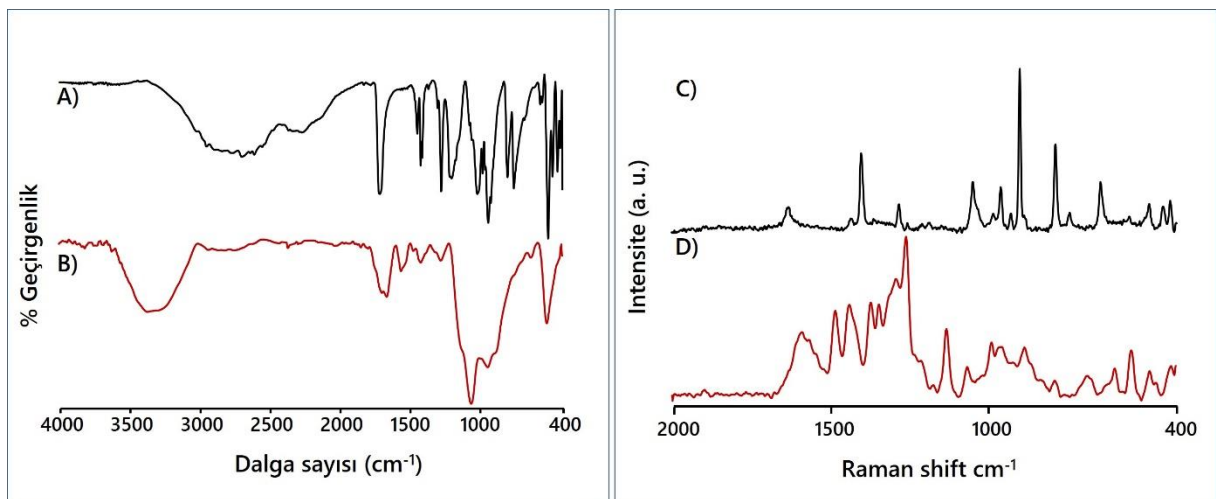
Şekil 4.34. Biyosensör 4’ün immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).

Şekil 4.34’da görüldüğü gibi görüldüğü gibi hidrosillenmiş ITO elektrot küçük R_{ct} değerine sahiptir ve R_{ct} değeri PHP’nin hidrosillenmiş elektrot yüzeyine kendiliğinden tabakalanması ile artar. Bu artış elektrot yüzeyinde yoğun, iyi düzenlenmiş SAM tabakalarının oluştuğunu gösterir. Bu artış tabakada bulunan negatif yüklü karboksil grupları ile negatif yüklü redoks probunun birbirini itmesinden kaynaklanır. PHP’nin uç kısımlarında bulunan karboksil gruplarının aktivasyonundan sonra R_{ct} değerinde artma gözlenmiştir. Bunun sebebi karboksil uçların NHS-EDC kimyası ile aktiflenmesi sonucunda elektrot yüzeyinde tabaka kalınlığının artması ve redoks probun yüzeye daha zor difüzyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca EC

kullanarak negatif yüklü grup aktivasyonu negatif grupların uzaklaşmasına neden olduğundan impedansta artış gözlenmiştir. Anti-IL 1 α antikorlar PHP'nin karboksil ucuna amid bağı vasıtasıyla bağlanır, negatif yüklü redoks probunu iter ve ITO elektrot yüzeyinde yalıtkan bir tabaka oluşur ve böylece yarı daire çapı yani R_{ct} değeri artar. ITO yüzeyinde bulunan aktif karboksil gruplarının elektrot yüzeyinde oluşabilecek nonspesifik etkileşimlere engel olmak üzere BSA ile bloklanmasından sonra, R_{ct} değerinde artış gözlenmiştir. Son basamakta anti-IL 1 α antikor ile IL 1 α antijen arasındaki etkileşimden sonra R_{ct} değeri artmıştır.

EIS ölçümlerine ek olarak basamak basamak modifikasyon işlemi CV ölçümleri ile de izlenmiştir. Şekil 4.34B'de görüldüğü gibi hidroksillenmiş ITO elektrot üzerinde PHP kendiliğinden oluşan tabakalar oluştuğundan sonra aktif olmayan karboksil uçların elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron transfer reaksiyonlarını zorlaştırdığından dolayı pik akımlarında bir düşüş gözlenmiştir. PHP modifikasyonundan sonra elektrot uçlarında yer alan karboksil gruplarının aktivasyonundan sonra, aktif karboksil grupları ile negatif yüklü redoks çiftinin arasında oluşan itici etkileşimlerden dolayı pik akımları azalmıştır. Fakat sırasıyla anti-IL 1 α antikorun, BSA'nın ve IL 1 α antijenin immobilizasyonundan sonra yüzeyde oluşan yalıtkan tabakanın artmasıyla elektron transferi engellendiğinden pik akımları azalmıştır. CV ölçümleri sonuçları EIS ölçümleri sonuçları ile uyumluluk içindedir.

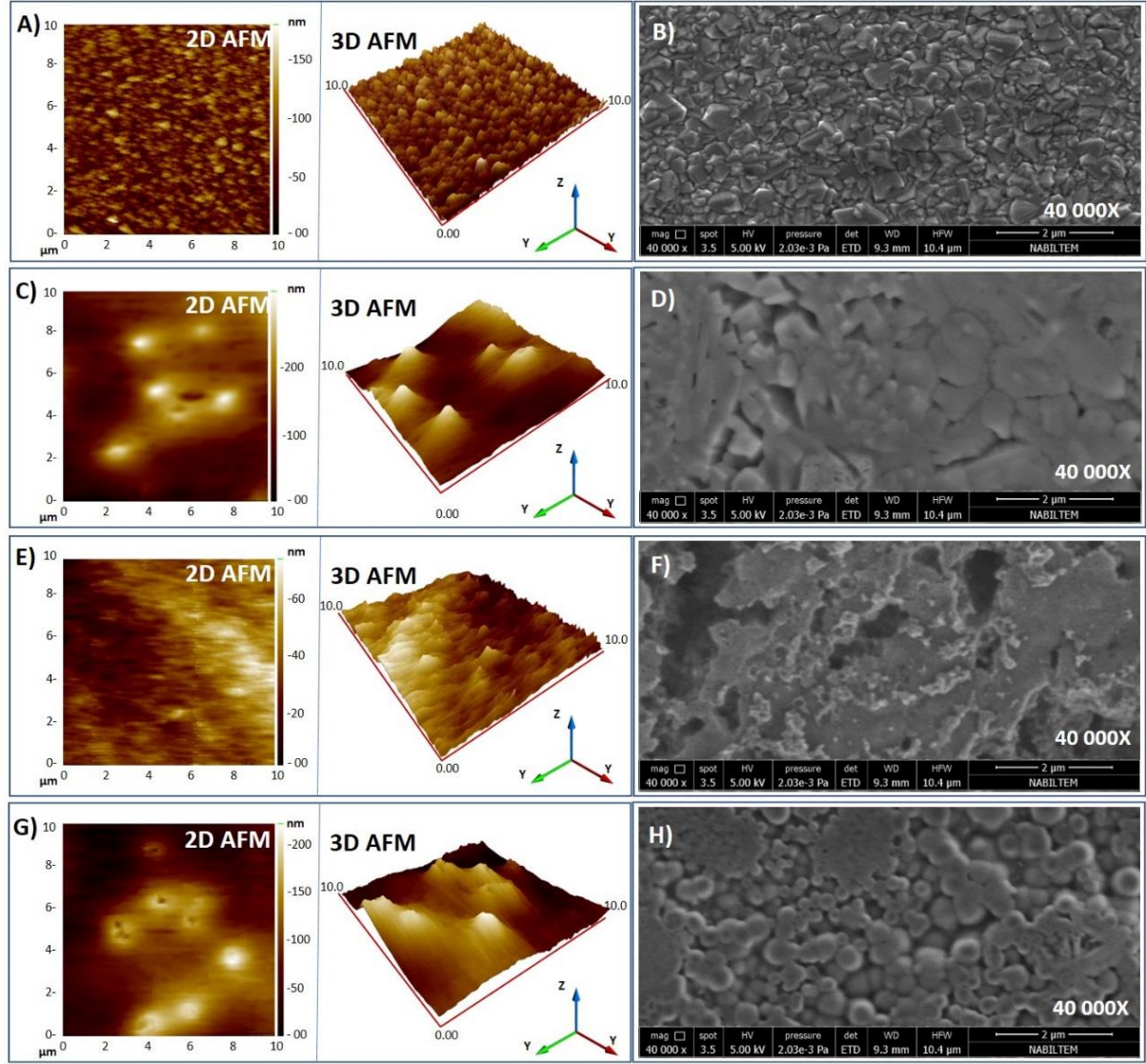
Yüzeyde PHP SAMs tabakaların oluştuğunu ve antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonun gerçekleştiğini izlemek için ayrıca FTIR ve Raman spektral ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 4.35'de Bio-4 biyosensörüne ait PHP ile modifiye edilmiş elektrotların anti-IL 1 α ile immobilizasyon öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.35. PHP ile modifiye edilmiş elektrotların anti- IL 1 α ile immobilizasyon öncesi ve sonrası FTIR ve Raman spektrumları.

PHP modifiye edilmiş FTO elektrotun anti-IL 1 α ile immobilizasyon öncesi ve sonrası FTIR spektrumları 4.35A ve 4.35B’de gösterilmiştir. Şekil 4.35A’ da elektrot yüzeyinde PHP SAMs tabakanın oluştuğunun kimyasal olarak en büyük kanıtı olan fosfanat pikleri yayvan bir şekilde 2550-2700 cm^{-1} ’de, karbonil C=O pikleri ise 1700 cm^{-1} civarında gözlemlenmiştir. (Aydın and Sezgintürk 2018; Daasch and Smith 1951; Lushtinetz et al. 2007). Antikor immobilizasyonu sonrasındaki spektrumda (4.35B) gözlemlenen 1650 cm^{-1} and 1548 cm^{-1} deki pikler yüzeye bağlanan antikorlar ile PHP arasında oluşan amid bağlarını atıf edilmektedir (Aydın ve ark. 2017; Kong ve Yu 2007). İmmobilizasyonlar sırasında gerçekleşen kimyasal etkileşimleri göstermek için Raman analizleri yapılmıştır. FTO elektrotların anti-IL 1 α ile immobilizasyon öncesi (siyah) ve sonrası (kırmızı) sırasıyla şekil 4.35 C ve D’ de verilmiştir. Şekil 4.35C’de FTIR spektrumuna benzer pikler gözlemlenirken, immobilizasyon sonrasında ara yüzey ile antikor arasında oluşan amid bağına ait pikler 1600 cm^{-1} ve 1565 cm^{-1} civarında gözlemlenmiştir (Şekil 4.35D).

Şekil 4.36’de elektrotun her immobilizasyon basamağından sonra SEM ve AFM görüntüleri verilmiştir. Bu çalışmada bir önceki çalışmaya benzer şekilde immobilizasyon basamaklarına sahip olduğundan hidroksillenemiş FTO’lara ait görüntüler verilmemiştir. Şekil 4.36A ve 4.36B’de PHP ile yüzey modifikasyonu sonrasındaki elektrotların yüzey görüntüleri bulunmaktadır. Görüntülerde yüzeyde ince bir SAMs tabakasının oluşumu beklendiğinden oldukça düzgün ve homojen bir görünüm söz konusudur ve elektrot yüzeyinin Ra değeri bir önceki biyosensör çalışmasına (Bio-3) benzer düşük, bir değerinde 18.4 nm ölçülmüştür. Anti-IL 1 α antikorunun PHP modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzeyde net bir değişim görülmektedir (Şekil 4.36C ve 4.36D) ve bu durumu yüzeyin ortalama pürüzlülük değerindeki artış desteklemektedir (46.5 nm). Bu aynı zamanda yüzeye antikorların bağlandığının bir göstergesidir. BSA ile bloklama işlemi sonrasında yüzey diğer çalışmalardaki gibi daha düzgün bir görünüme sahiptir (Şekil 4.36E ve 4.36F) ve Ra değeri 18.5 nm olarak ölçülmüştür. Antikor-antijen etkileşiminden sonra, Şekil 4.36G ve 4.36H’de globuler yapılar gözlemlenmiştir. Bu basamaktaki Ra değeri 39.1 nm’dir. Elektrot yüzeyinde oluşan farklılıklar, elektrot modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

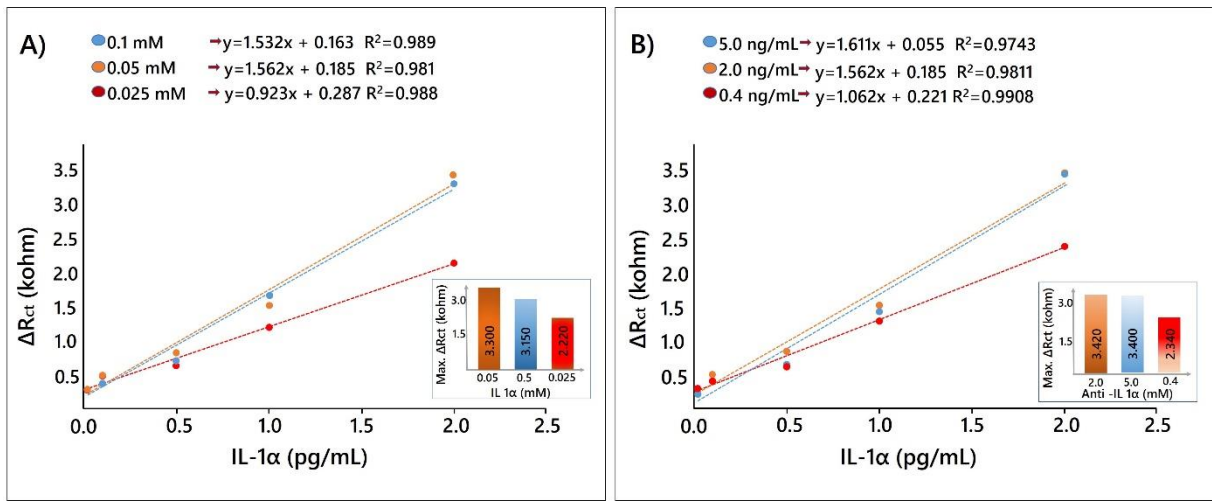


Şekil 4.36. Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; ara yüzey modifikasyonu sonrası (A ve B); antikor immobilizasyonu sonrası (C ve D); BSA ile bloklama sonrası (E ve F); Antikor-antije etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü (G ve H).

4.5.1. Biyosensör 4'ün Optimizasyon Basamakları

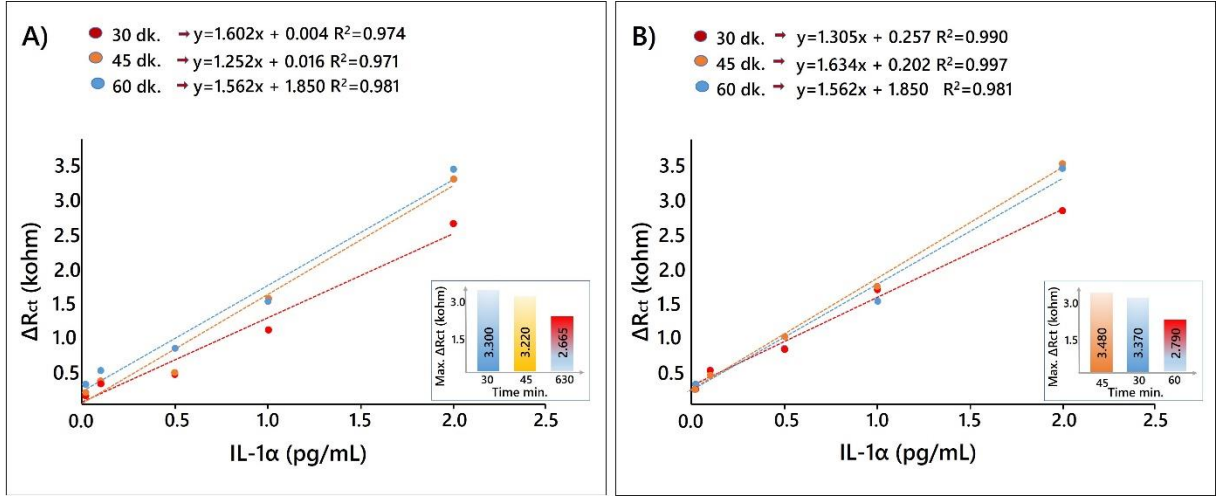
Elektrot yüzeyinde biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu için düzgün bir kendiliğinden oluşan tek tabakaların oluşabilmesi ve oluşan bu tabakanın her çalışmada tekrarlanabilmesi, biyosensörün iyi bir performans sağlaması için oldukça önemlidir. Ayrıca SAMs oluşumu biyotanıma elementinin immobilizasyonu için oldukça önemlidir. Bu sebeplerden dolayı, SAMs oluşumu için 3 farklı konsantrasyonda PHP kullanılmıştır. Şekil 4.37A'da görüldüğü gibi 0.1 mM ve 0.05 mM PHP kullanılarak elde edilen sinyal benzerdir ve 0.025 mM kullanılarak elde edilenden daha yüksektir. Bu yüzden maliyeti düşürmek için deneyler sırasında 0.05 mM PHA kullanılmıştır. Biyosensörün hassasiyeti büyük ölçüde

kullanılan anti-IL 1 α antikor konsantrasyonuna bağlıdır. Bu sebeple 3 farklı konsantrasyonda antikor kullanılmıştır. Şekil 4.37B’de görüldüğü gibi 0.4 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilen sinyal düşüktür; 2 ng/mL ve 5 ng/mL anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilen sinyal benzerdir ve maksimum sinyal 2 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilmiştir. Diğer optimizasyon parametresi ise biyotanıma elementi inkübasyon süresidir. Bu parametre antikorun elektrot yüzeyine bağlanma etkisini etkilediğinden oldukça önemlidir. Bu yüzden PHP modifiye ITO elektrot anti-IL 1 α antikor içeren fosfat tamponunda 3 farklı sürede (30, 45, 60 dk) inkübe edilmiştir. Şekil 4.38A’de görüldüğü gibi 30 dk ve 45 dk antikorların bağlanması için yeterli değildir.



Şekil 4.37. Biyosensör 4’ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PHA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B); antikor inkübasyon süresi (C); antijen inkübasyon süresi (D).

En yüksek sinyal 60 dakikada elde edildiğinden dolayı 60 dakika optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Son optimizasyon parametresi IL 1 α antijen inkübasyon süresidir. Bu yüzden üretilen elektrotlar 30, 45 ve 60 dk IL 1 α antijen içeren fosfat tamponuna daldırılmış ve elektrotların verdikleri cevap ölçülmüştür. Kısa inkübasyon süresi IL 1 α antijenin bağlanması için yeterli değildir. Fakat 45 ve 60 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen sinyaller benzerdir ve bu yüzden 45 dk optimum olarak seçilmiştir (Şekil 4.38B).

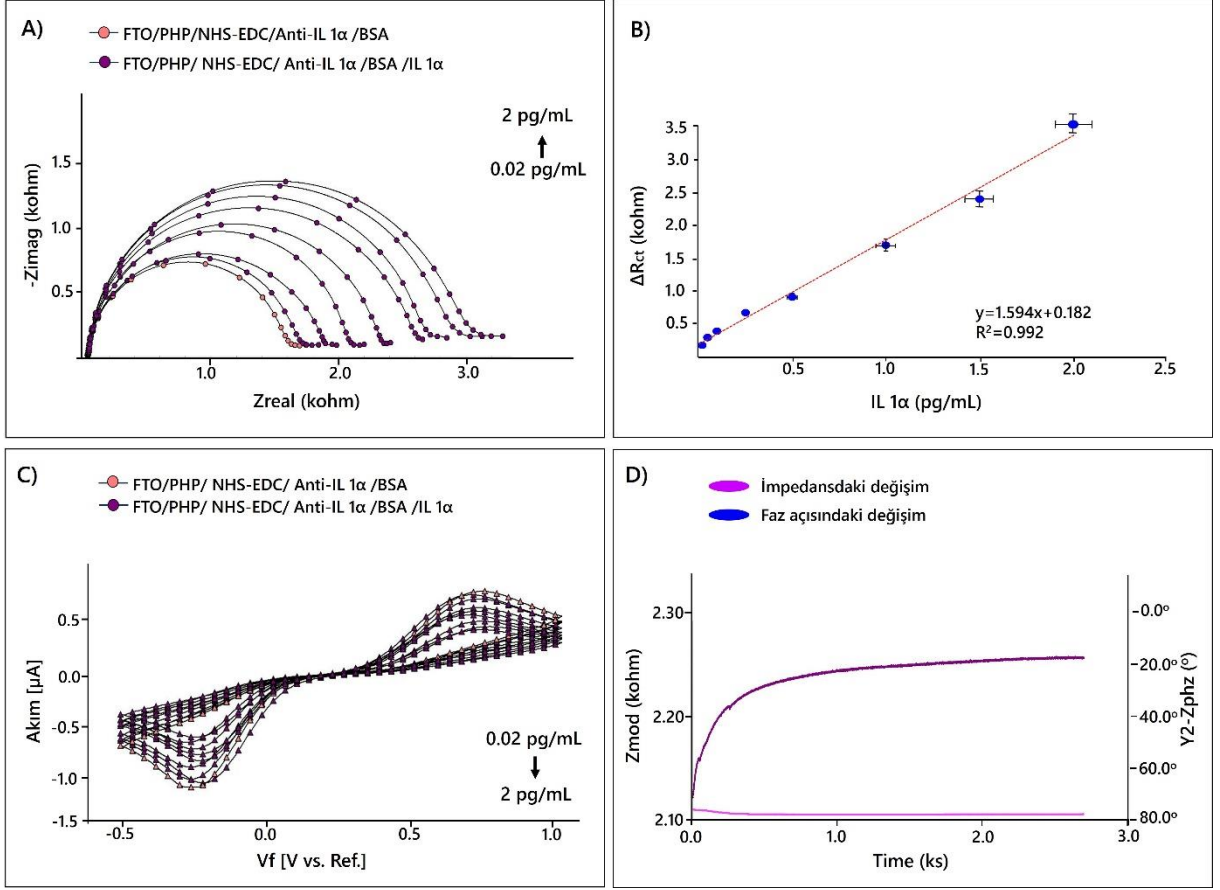


Şekil 4.38. Biyosensör 4'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B).

- **Lineer Tayin Aralığının Optimizasyonu**

Lineer aralık geliştirilen bir biyosensörün ölçebildiği konsantrasyon aralığını gösterir. Optimum koşullar altında EIS ölçümleri tespit limiti, ölçüm limiti ve lineer tespit aralığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Lineer tespit aralığının tespiti için hazırlanan ITO elektrotlar 8 farklı IL 1 α konsantrasyonundaki PBS tamponunda inkübe edilmiş ve EIS-CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrileri ve dönüşümlü voltammetri sonuçları şekil 4.39'te gösterilmiştir.

Şekil 4.39A'dan de görüldüğü gibi R_{ct} değerleri ile IL 1 α konsantrasyonları arasında bir bağıllık vardır. IL 1 α antijen konsantrasyonları arttıkça, R_{ct} değerleri artmıştır fakat pik akımları azalmıştır (Şekil 4.39C). Bunun sebebi, spesifik tanıma olaylarının artması elektrolit solüsyondan elektrot yüzeyine redoks prob transferini engellemesidir. İmmunosensör cevabı ile artan IL 1 α konsantrasyonu arasında 0.02 pg/mL – 2 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.39B). Bu biyosensörün tespit limiti (LOD) 6 fg/mL ve ölçüm limiti 19 fg/mL'dir.



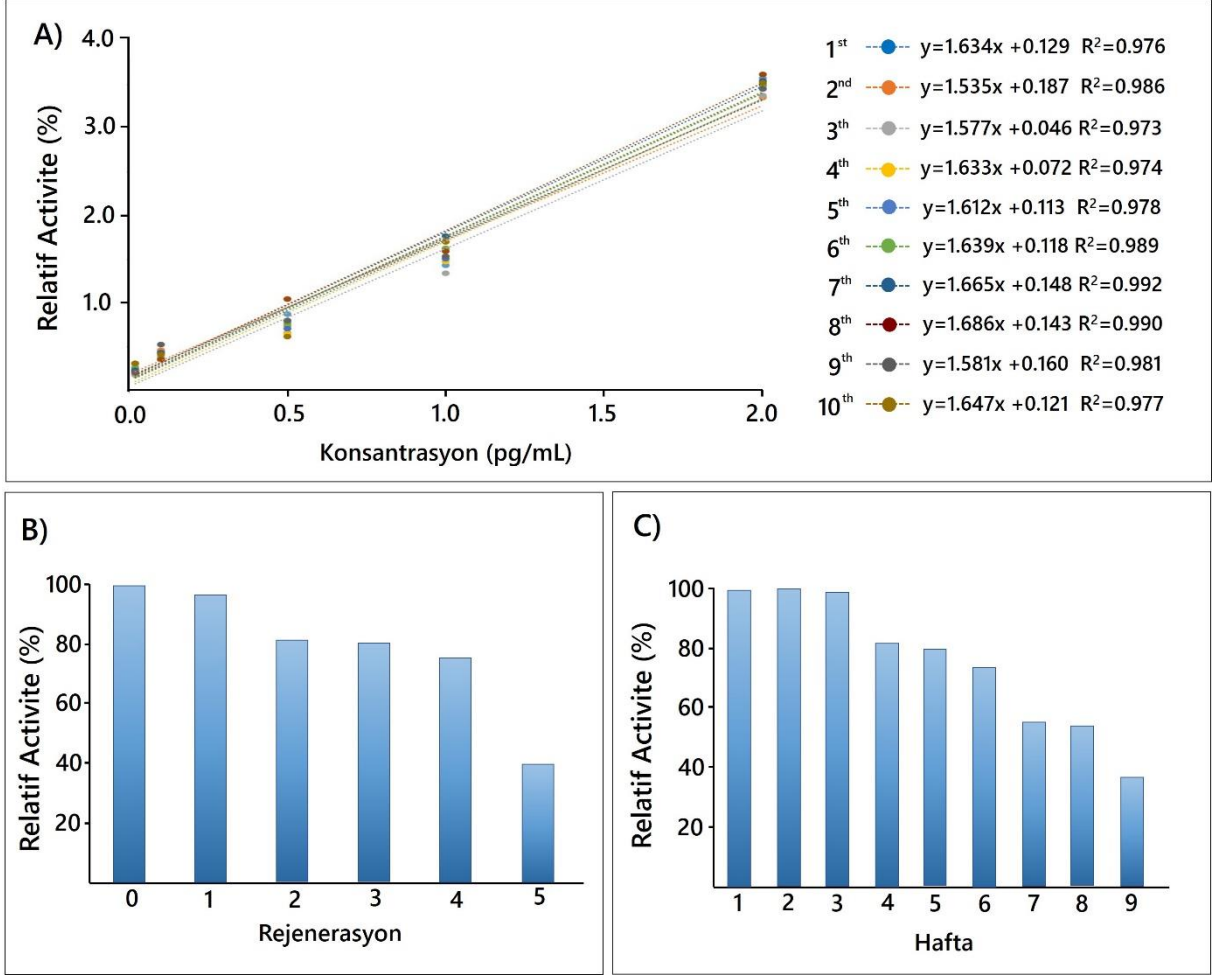
Şekil 4.39. Farklı IL 1 α konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.

- **Sabit frekans İmpedans (SFI)**

Anti-IL 1 α ve IL 1 α antijen arasındaki spesifik bağlanma sabit bir frekansta izlenebilir. Bu işlem zamana karşı toplam impedansın belli bir frekansta izlenmesi ile gerçekleştirilir. SFI’de kullanılacak sabit frekans Bode eğrisinden seçilmiştir. Bio-4’e ait sabit frekans ölçümü şekil 4.39D’de gösterilmiştir. Şekil 4.39D incelendiğinde impedansta artış (pembe) gözlenmiştir ve bu artış anti-IL 1 α ve IL 1 α antijen arasındaki spesifik bağlanmayı kanıtlamaktadır.

- **Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, raf ömrü çalışması**

Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterlerinden biridir. Bu doğrultuda lineer aralığımızın orta noktasındaki IL-1 α konsantrasyonu (0.25 pg/mL) kullanarak ve yaptığımız tüm optimizasyon çalışmalarını göz önünde bulundurarak, 20 farklı elektroda ait sinyalleri ölçtük. Relatif standart hata %4.85 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç kabul edilebilir tekrarlanabilirliği göstermektedir.



Şekil 4.40. Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.

Tekrar üretilebilirlik biyosensörün diğer bir başarı kriteridir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmayı 10 kez tekrar ederek biyosensörümüzün tekrar üretilebilir olup olmadığını araştırdık. Şekil 4.40A'da biyosensöre ait tekrar üretilebilirlik kalibrasyon grafiği bulunmaktadır. Şekil 4.40A'dan görüldüğü gibi tüm biyosensörler benzer lineeriteye sahiptir ve relatif standart hata %2.65 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen relatif standart hata kabul edilebilir tekrar üretilebilirliği göstermektedir.

Biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği, klinik açıdan çok önemlidir. Böylece biyosensör hazırlamak için harcanan zaman azalır ve ölçüm maliyetleri düşer. Bu yüzden biyosensörün rejenerasyonu incelenmiştir. Bu test ayrıca biyosensörün sağlığını göstermektedir. Bu yüzden elektrotlar asidik koşullara maruz bırakılır ve biyosensörün cevabı ölçülür. Şekil 4.40B'den görüldüğü gibi biyosensör 5 döngü boyunca iyi sinyal gösterirken, 5 döngü sonunda elektrot yüzeyi bozulmuştur.

Geliştirilen biyosensörün uzun ömürlü olması biyosensörün başarısını gösteren bir kriterdir. Bu yüzden hazırlanan biyosensörler buzdolabında 10 hafta boyunca bekletildi. 9 hafta bekleme sonucunda ölçülen %37'a düşmüştür ve bu durum iyi stabilizeyi göstermektedir (Şekil 4.40C).

- **Biyosensör ile Gerçek Tükürükte IL-1 α Analizi**

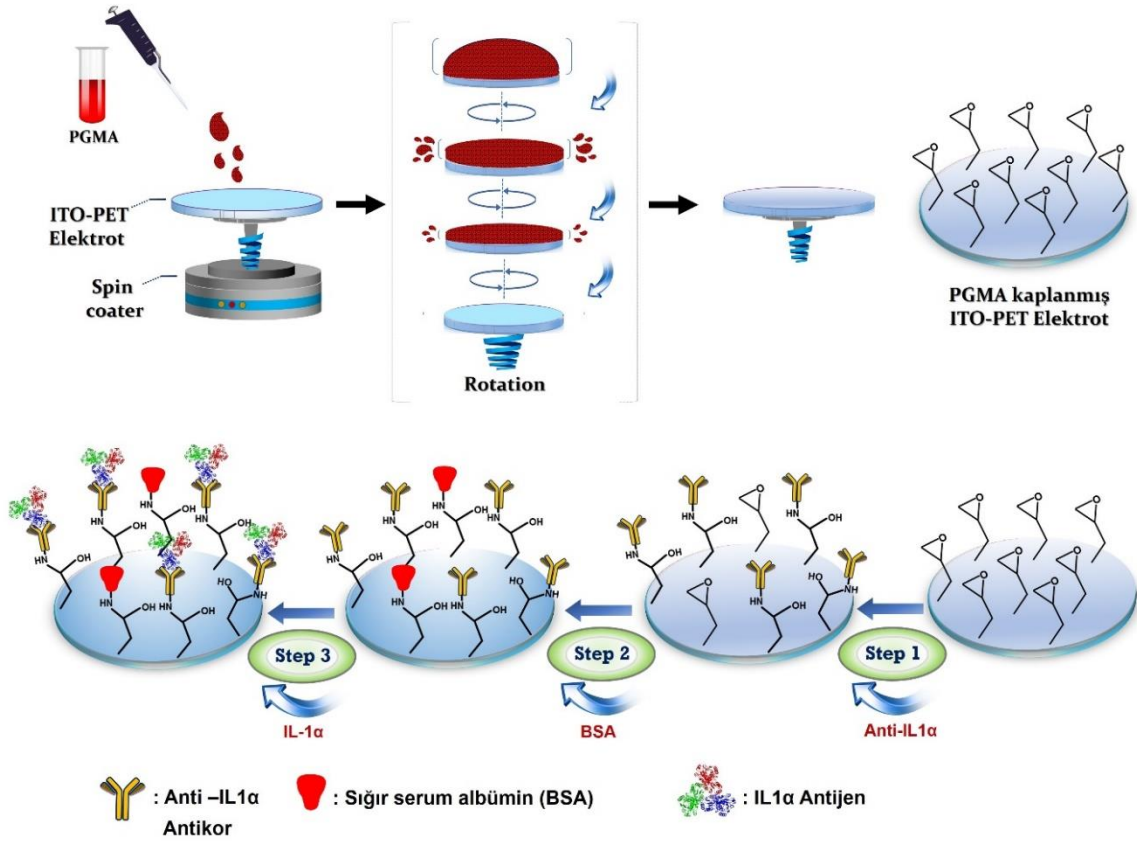
Geliştirdiğimiz biyosensörü denemek amacıyla gerçek serum ve tükürükte IL-1 α antijeni tayin edilmiştir. Tükürük numunelerinde biyosensör ile IL 1 α tayin etmek için 200 seyreltilmiştir ve üzerine belli miktarda IL-1 α antijeni eklenmiştir. Eklenen konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar çizelge 4'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul edilebilir düzeydedir; geri kazanım %96.66-%105.39 arasındadır.

Çizelge 4.4. Tükürük IL 1 α analiz sonuçları

Örnek	Biyosensör sonuçları (pg/mL)	Eklenen IL-1 α (pg/mL)	Biyosensör ile bulunan toplam	% Geri Kazanım	% Relatif Farklılık
Tükürük 1	1,10	0.20	1,33	102,03	+2,03
Tükürük 2	0,67	0.20	0,89	102,67	+2,67
Tükürük 3	1,00	0.20	1,2	100,16	+0,16
Tükürük 4	0,67	0.20	0,87	100,58	+0,58
Tükürük 5	0,32	0.20	0,52	101,47	+1,47

4.6. BİYOSENSÖR 5 (BİO-5)

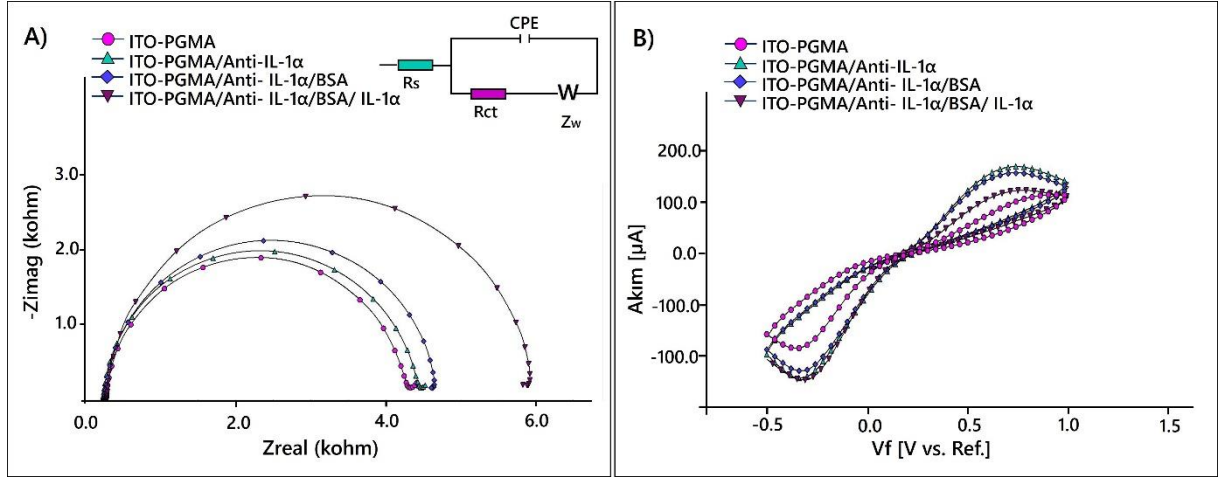
Bu bölümdeki çalışmada protein gibi yapıların çok rahat ve etkili bir şekilde bağlanabildiği poli(glisidil metakrilat) (PGMA) polimerinin ara yüzey materyali olarak kullanıldığı ve antijen IL- 1 α nın tayin ve tespitinde kullanılacak biyosensör üretimi için çeşitli elektrot modifikasyonları yapılmıştır. Şekil 4.41’te biyosensör 5’e ait elektrotların hazırlanması ve biyosensörün immobilizasyon şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.41. Biyosensör 5’e ait immobilizasyon şeması.

İmmobilizasyon şeması incelendiğinde ve önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında (Bio1-4) çok daha az sayıda immobilizasyon basamağı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada hem immobilizasyon basamak sayısının minimum sayıda kalması hemde çok kısa sürelerde pratik bir şekilde polimer kaplı elektrotların hazırlanması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda ticari olarak satılan molekül ağırlığı nispeten düşük ve konvansiyonel çözücülerde rahat bir şekilde çözünürek uygulama kolaylığı sunan lineer poli(glisidil metakrilat) (PGMA) polimeri tercih edilmiştir. Tek kullanımlık elektrotların hızlı bir şekilde ara yüzey materyali ile kaplanması için daldırmak yerine spin coating yöntemi tercih edilmiştir. Spin coating yöntemi elektrot fabrikasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Tek

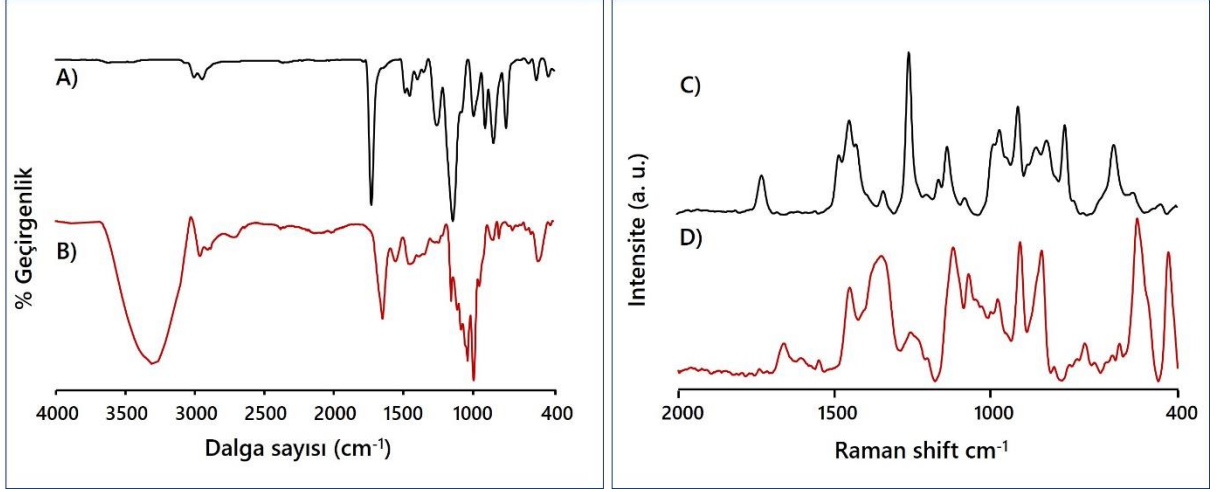
kullanımlık biyosensör olarak kullanacak ITO elektrotlar hazırlanırken, öncelikle elektrotların yüzeyinde bulunan organik kontaminasyonları uzaklaştırmak için ultrasonik banyoda temizleme işlemi yapılmıştır. Temizlenen elektrot yüzeylerine kaplanacak polimer çözeltisinin konsantrasyonu farklı denemeler sonrasında optimize (PGMA polimer/Aseton; 0.5 mg/1 mL) edilmiştir. Hazırlanan polimer çözeltisi spin coating cihazı yardımıyla 10 µl 'lik damlalar şeklinde damlatılarak oda sıcaklığında ITO-PET elektrotlara kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kaplama yapılırken uygulanan kaplama hızı 1000 rpm ve toplamda her bir elektrot için 60 saniye döndürülerek kaplama işlemi yapılmıştır. Aseton hızlı bir şekilde buharlaşabilen bir çözücü olduğundan hazırlanan elektrotların ekstra kurutulmasına ihtiyaç duyulmamıştır ve özellikle bu yüzden tercih edilmiştir. İmmobilizasyon basamaklarına gelindiğinde minimum sayıda yani üç basamakta biyosensör üretimi gerçekleştirilebilmektedir. İlk basamakta diğer çalışmalardan farklı olarak yüzeyler epoksi halkaları taşıyan polimer film tabakaları kaplı olduğu için antikörlerin kovalent immobilizasyonuna hazır durumdadır ve bu yüzden ilk basamakta elektrotlar anti-IL 1 α antikör içeren fosfat tamponuna daldırılıp inkübasyona bırakılmıştır. Zayıf bağlanmış antikörleri uzaklaştırmak için her çalışmada olduğu gibi burada da elektrotlar yıkanıp saf argon altında kurutulmuştur. İkinci basamakta yüzeyde açık halde bulunan epoksi uçları bloklamak için elektrotlar fosfat tamponunda hazırlanmış %0.5 BSA içeren çözeltilerde bekletilerek 1 saatlik inkübasyon işlemine tabi tutulmuş ve yıkanıp argon gazı altında kurutulmuştur. Son olarak immobilizasyon aşamalarından sonra antijen IL 1 α 'nın tayini ve tespiti için hazır hale gelen elektrotlar, 8 farklı ve artan konsantrasyonlarda IL 1 α içeren fosfat tamponu çözeltilerine inkübasyona bırakılmıştır. Her elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınarak, IL 1 α antijenin tayininde kullanılacak biyosensör sistemleri üretilmiştir. Ayrıca elektrotların hepsinin her bir immobilizasyon basamağı sonrasında EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Biyosensörün fabrikasyon sırasında immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltamogramlarını ve impedans eğrileri şekil 4.42'de gösterilmektedir. Ayrıca yüzeyde oluşan bu değişimleri izlemek için SEM ve AFM cihazı kullanılarak yüzeylerin morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 4.44).



Şekil 4.42. Biyosensör 5'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).

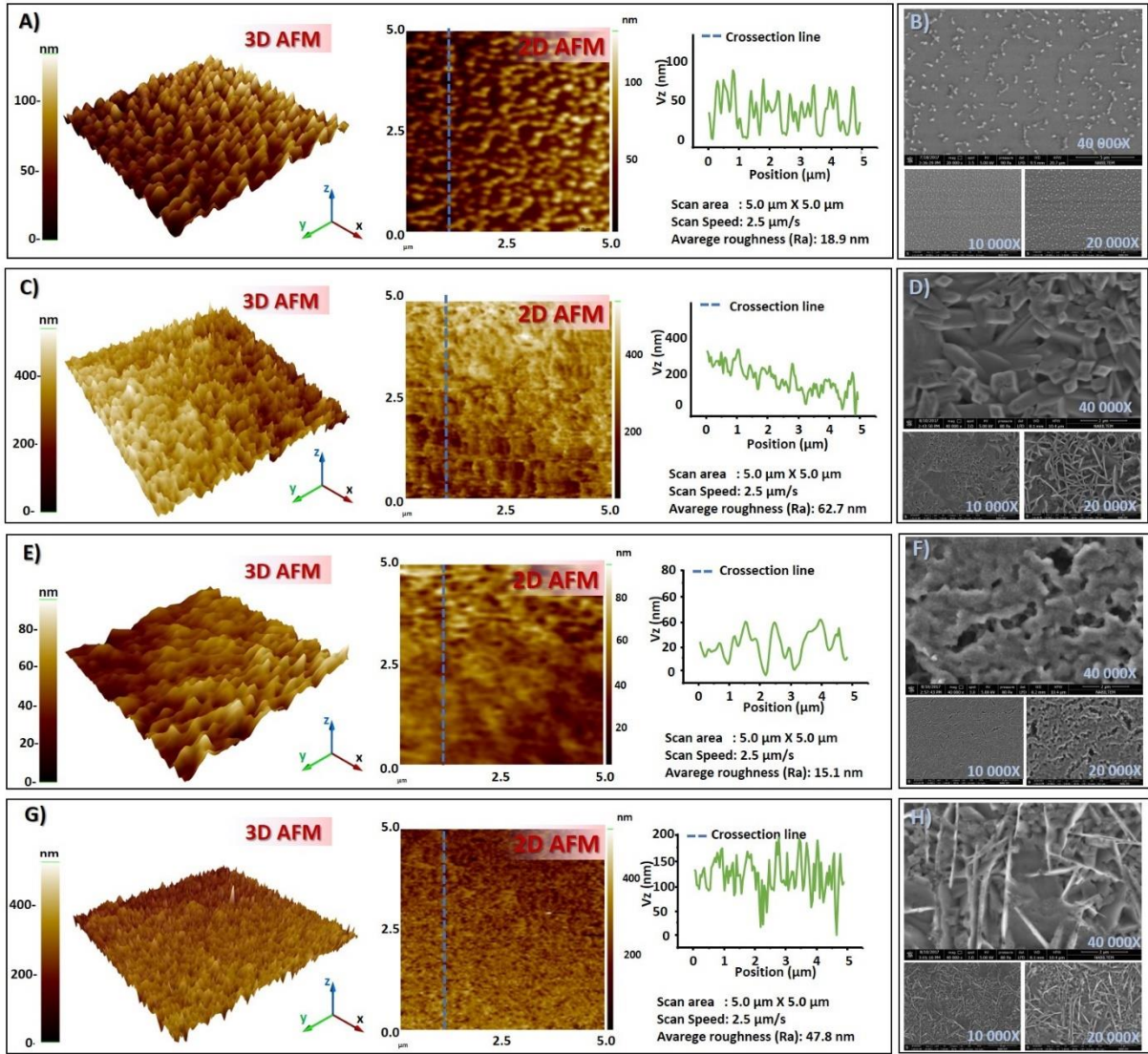
Şekil 4.42'da ITO/PGMA impedans eğrisi incelendiğinde polimer PGMA film ile kaplanmış ITO elektrodun impedansı oldukça yüksektir. Poli(glisidil metakrilat) yalıtkan bir özelliğe sahip olduğundan dolayı impedanstaki bu yüksek değer beklenen bir durumdur. Ayrıca epoksi grubundaki oksijenin üzerindeki ortaklanmamış 2 çift elektron negatif yüklü redoks probunu elektrostatik olarak iter. Bu durum yüzeyin daha yalıtkan özellik göstermesine neden olmuştur. Antikor immobilizasyonu ile bu itme ortadan kalkmış ve impedansta düşüş meydana gelmiştir. Yalıtkan bir polimer olması elektrot yüzeyinden elektrolite elektron akışını yavaşlattığı için impedans değeri veya başka bir deyişle yarı daire çapı oldukça büyük ölçülmüştür. Dönüşümlü voltammogramlar incelendiğinde, anodik ve katodik pik akımları oldukça küçük olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi yüzeyde oluşan yoğun polimer tabakasının elektron transferini engellemesidir. Anti-IL 1 α antibodilerin amino grupları epoksi gruplarına kovalent olarak bağlanır. Anti-IL 1 α antikorların kovalent immobilizasyonu ile impedansta bir düşme ve akımda belli miktarda artış gözlenmiştir. Polimer kaynaklı aktif epoksi gruplarının bloke edilmesi için BSA kullanılmıştır. BSA'nın yüzeye bağlanması elektrodun yalıtkanlığını artırmıştır. Bundan dolayı impedansta bir miktar artma ve akımda bir miktar azalma izlenmiştir. Bu adımlardan sonra ITO temelli oldukça paratik ve hızlı bir şekilde elde edilen biyosensör kullanıma hazır haldedir. Yukarıda bahsedilen adımlar sonucunda oluşan impedans ve akımdaki değişiklikler elektrot yüzeyinde oluşan değişikliklerin kanıtıdır.

Yüzeyde polimer filmin oluştuğunu ve antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonun gerçekleştiğini izlemek için ayrıca FTIR ve Raman ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 4.43'de Bio-5 biyosensörüne ait FTIR, Raman Spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.43. Polimer ara yüzey ile modifiye edilmiş elektrotun antikor öncesi (A/C) ve sonrası (B/D) FTIR ve Raman spektrumları.

Anti-IL 1 α antikorların PGMA modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyon öncesine ve sonrası ait FTIR spektrumları Şekil 4.43A ve 4.43B’de gösterilmiştir. Poli(glisidilmetakrilat) polimerine ait FT-IR spektrumu (Şekil 4.43A) incelendiğinde; 2996 ve 2940 cm^{-1} ’de gözlenen pikler alifatik C-H gerilme frekansına karşılık gelmektedir. PGMA ’ın yinelenen birimlerindeki gergin epoksi halkasının C-H gerilmeleri 3000 cm^{-1} civarında gözlemlenmektedir. Ayrıca, spektrumda 1723 cm^{-1} ’de görülen keskin pik tekrar eden monomer ünitelerindeki ester karbonil (C=O) gerilme frekansına karşılık gelmektedir (Aydın ve ark. 2018b; Edmondson ve Huck 2004) Şekil 4.43A’daki spektrumda 1251 cm^{-1} , 904 cm^{-1} ve 843 cm^{-1} de gözlemlenen karakteristik simetrik, asimetrik ve deformasyon titreşimleri polimerin yinelenen birimlerindeki epoksi grubunun varlığını doğrulamaktadır. Anti- IL 1 α ’nin immobilizasyonundan sonra amid I’ e ait geniş band $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ ’te ve amid II’ye ait keskin band $\sim 1523 \text{ cm}^{-1}$ ’te gözlenmiştir. Bu durum, anti- IL 1 α antikorunun polimer modifiye elektrot yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonu Raman Spektrometresi ile de izlenmiştir. Polimer üzerindeki epoksi halkasının gerilme titreşimleri 1258 cm^{-1} and 909 cm^{-1} ’de gözlenmiştir (Şekil 4.43 C). Şekil 4.43D’de de görüldüğü gibi amid I, II ve III pikleri sırasıyla 1664, 1550 and 1350 cm^{-1} ’de gözlenmiştir.



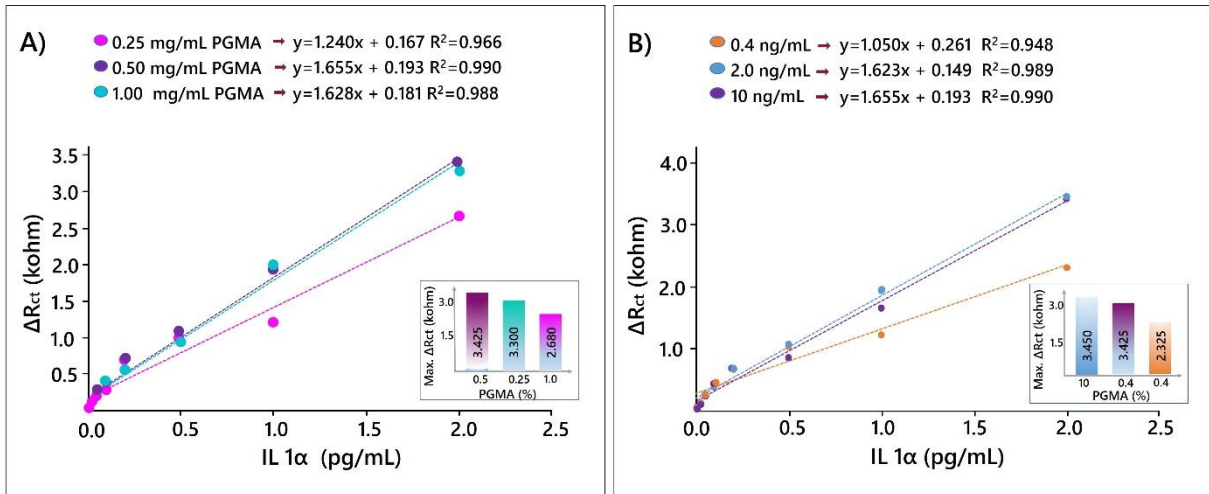
Şekil 4.44. Her bir immobilizasyon basamağındaki elektrot yüzeylerinin SEM ve AFM görüntüleri; ara yüzey modifikasyonu sonrası (A ve B); antikor immobilizasyonu sonrası (C ve D); BSA ile bloklama sonrası (E ve F); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü (G ve H).

Şekil 4.44’de elektrodun her immobilizasyon basamağından sonra SEM ve AFM görüntüsü gözlenmektedir. Döndürerek kaplama yöntemi ile yüzeyi kaplanmış polimer film tabakası elektrot yüzeyinde net bir şekilde gözlemlenmektedir (Şekil 4.44A ve 4.44B). Bu basamakta elektrot yüzeyi pürüzlülük değeri 18.9 nm’dir. Elektrot yüzeyindeki polimer film üzerindeki aktif gruplara kovalent olarak bağlanmış anti-IL 1 α antikorları net bir şekilde görülmektedir ve bu durum anti- IL 1 α antikorunun başarılı bir şekilde immobilizasyonun olduğunu görsel kanıtı olarak düşünülebilir (Şekil 4.44D). Bu basamaktaki ortalama pürüzlülük değerinde (62.7 nm) bağlanmadan dolayı artış gözlenmiştir (Şekil 4.44C). BSA’nın elektrot yüzeyine bağlanması ile yüzeyde değişimler izlenmiştir (Şekil 4.44F) ve yüzeyde

pürüzlülük mevcuttur (ortalama pürüzlülük değeri 15.1 nm) (Şekil 4.44E). Anti- IL 1 α antikor ile IL 1 α antijen etkileşiminden sonra yüzeyde değişimler gözlenmiştir (Şekil 4.44G) ve ortalama pürüzlülük değeri 47.8 nm' dir (Şekil 4.44H).

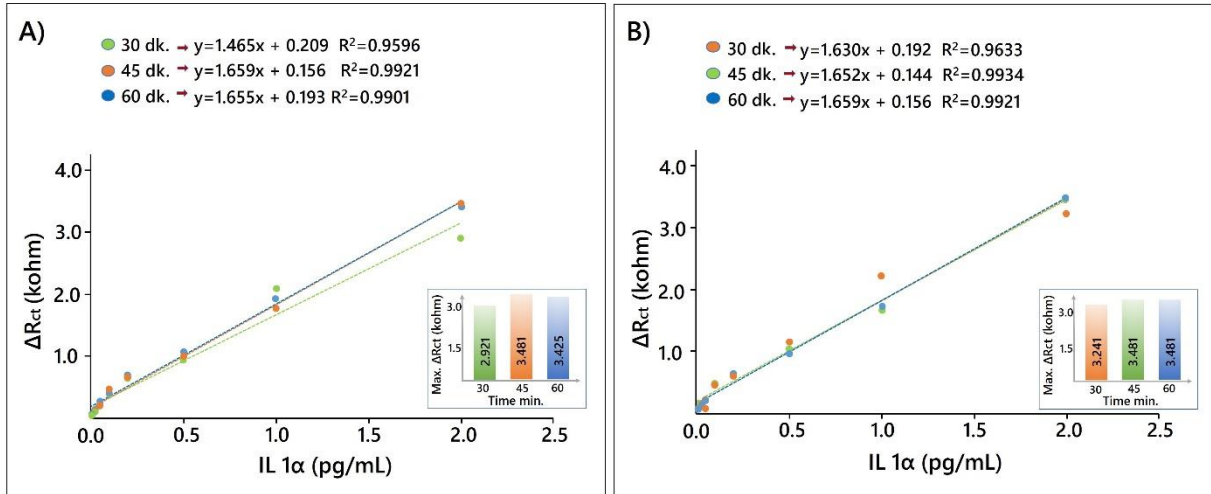
4.6.1. Biyosensör 5'in Optimizasyon Basamakları

Elektrot yüzeyinde biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu için ara yüzeylerin oluşması ve oluşan bu yüzeylerin her çalışmada tekrarlanabilmesi, biyosensörün iyi bir performans sağlaması için oldukça önemlidir. Bu sebepten dolayı, elektrot yüzeyinde film oluşturmak için 3 farklı konsantrasyonda (0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL ve 1 mg/mL) polimer kullanılmıştır. 0.25 mg/mL polimer kullanıldığında yüzeyde antikorların bağlandığı epoksi gruplarının diğer polimer konsantrasyonuna göre az olmasından dolayı daha düşük sinyaller elde edilmiştir. Yüksek polimer konsantrasyonunda (1 mg/mL) ise yüzeyde oluşan epoksi gruplar artmıştır fakat elde edilen sinyal artmamıştır. En yüksek sinyal 0.5 mg/mL konsantrasyonunda elde edilmiştir (Şekil 4.45A). Biyosensörün hassasiyeti büyük ölçüde kullanılan anti-IL 1 α antikor konsantrasyonuna bağlıdır. Bu sebeple 3 farklı konsantrasyonda (0.4 ng/mL, 2 ng/mL ve 10 ng/mL) antikor kullanılmıştır. Şekil 4.45B'de görüldüğü gibi 0.4 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilen sinyal düşüktür; 2 ng/mL ve 10 ng/mL anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilen sinyal benzerdir ve maksimum sinyal 2 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilmiştir.



Şekil 4.45. Biyosensör 4'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) PHA konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).

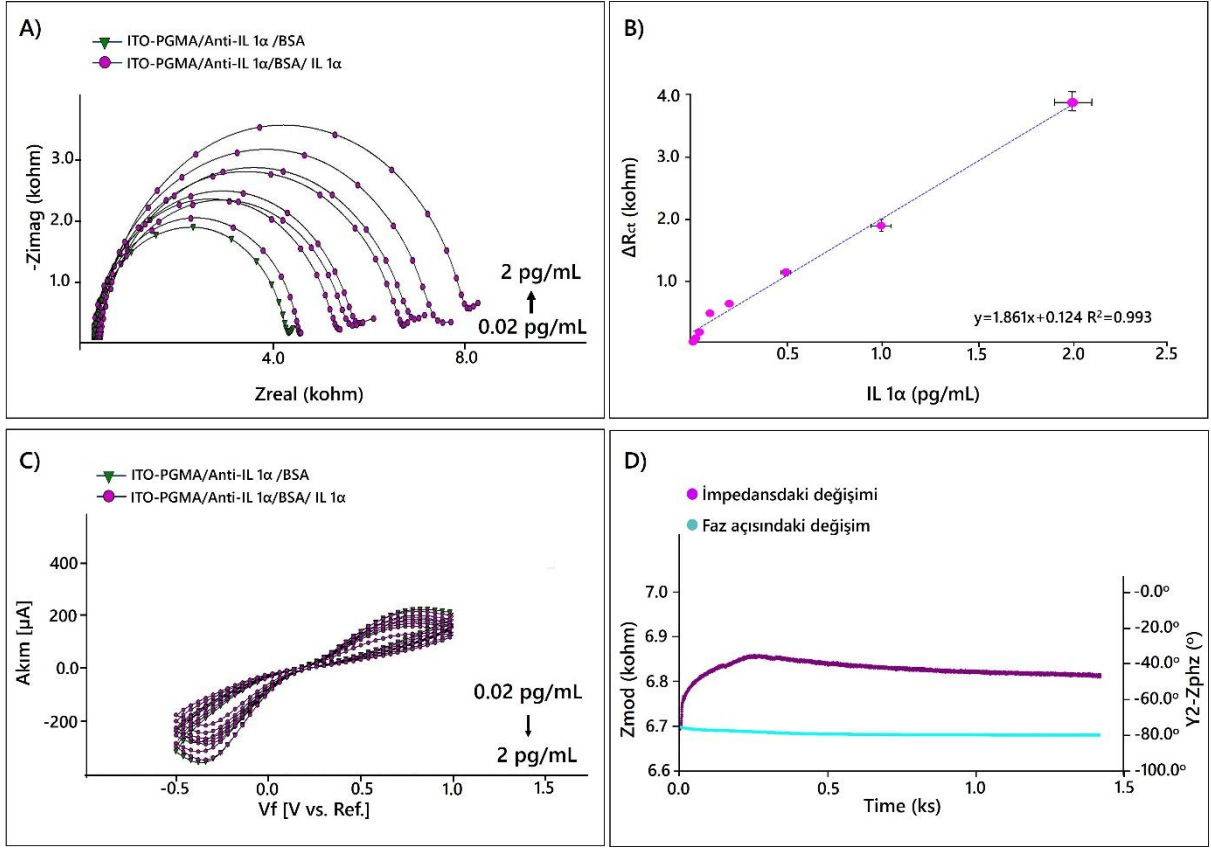
Diğer optimizasyon parametresi ise biyotanıma elementi inkübasyon süresidir. Bu parametre antikoru elektrot yüzeyine bağlanma etkisini etkilediğinden oldukça önemlidir. Bu yüzden polimer ile modifiye edilmiş ITO elektrot anti-IL 1 α antikoru içeren fosfat tamponunda 3 farklı sürede (30, 45, 60 dk) inkübe edilmiştir. Şekil 4.46A'de görüldüğü gibi 30 dk antikoru bağlanması için yeterli değildir. 45 dk ve 60 dk inkübasyonda elde edilen sinyaller 30 dk inkübasyona göre yüksektir. Fakat en yüksek sinyal 45 dakikada elde edildiğinden dolayı 45 dakika optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Son optimizasyon parametresi IL 1 α antijen inkübasyon süresidir. Bu yüzden üretilen elektrotlar 30, 45 ve 60 dk IL 1 α antijen içeren fosfat tamponuna daldırılmış ve elektrotların verdikleri cevap ölçülmüştür. Kısa inkübasyon süresi IL 1 α antijenin bağlanması için yeterli değildir. Fakat 45 ve 60 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen sinyaller benzerdir ve bu yüzden 45 dk optimum olarak seçilmiştir (Şekil 4.4B).



Şekil 4.46. Biyosensör 4'ün optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikoru inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B).

- **Lineer Tayin Aralığının Optimizasyonu**

Lineer aralık geliştirilen bir biyosensörün ölçebildiği konsantrasyon aralığını gösterir. Optimum koşullar altında EIS ölçümleri tespit limiti, ölçüm limiti ve lineer tespit aralığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Lineer tespit aralığının tespiti için hazırlanan ITO elektrotlar 8 farklı IL 1 α konsantrasyonundaki PBS tamponunda inkübe edilmiş ve EIS-CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrileri ve dönüşümlü voltammetri sonuçları şekil 4.46'da gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Farklı IL 1 α konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.

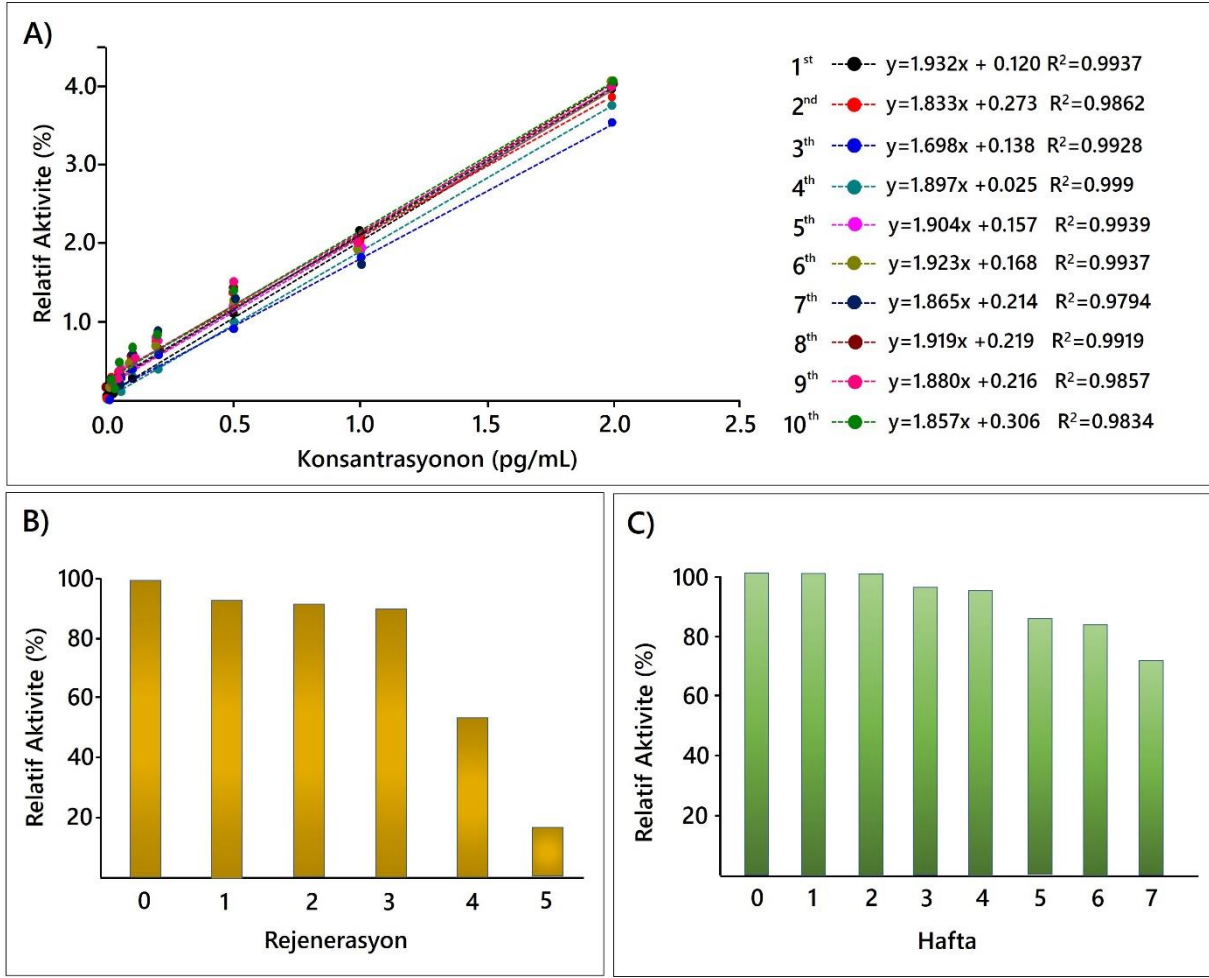
Şekil 4.47’ tan de görüldüğü gibi R_{ct} değerleri ile IL 1 α konsantrasyonları arasında bir bağıllık vardır. IL 1 α antijen konsantrasyonları arttıkça, R_{ct} değerleri artmıştır (Şekil 4.47A) fakat pik akımları azalmıştır (Şekil 4.47C). Bunun sebebi, spesifik tanıma olaylarının artması elektrolit solüsyondan elektrot yüzeyine redoks prob transferini engellemesidir. İmmunosensör cevabı ile artan IL 1 α konsantrasyonu arasında 0.01 pg/mL- 2 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.40B). Bu biyosensörün tespit limiti (LOD) 3.3 fg/mL ve ölçüm limiti 10 fg/mL’ dir.

- **Sabit frekans İmpedans (SFI)**

Anti-IL 1 α ve IL 1 α antijen arasındaki spesifik bağlanma sabit bir frekansta izlenebilir. Bu işlem zamana karşı toplam impedansın belli bir frekansta izlenmesi ile gerçekleştirilir. SFI’ de kullanılacak sabit frekans Bode eğrisinden seçilmiştir. Bio-5’ e ait sabit frekans ölçümü şekil 4.47D’ de gösterilmiştir. Şekil 4.47D incelendiğinde impedansta artış (mor) gözlenmiştir ve bu artış anti-IL 1 α ve IL 1 α antijen arasındaki spesifik bağlanmayı kanıtlamaktadır.

- **Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, raf ömrü çalışması**

Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterlerinden biridir. Bu doğrultuda lineer aralığımızın orta noktasındaki IL-1 α konsantrasyonu (0.25 pg/mL) kullanarak ve yaptığımız tüm optimizasyon çalışmalarını göz önünde bulundurarak, 20 farklı elektroda ait sinyalleri ölçtük. Relatif standart hata %5.72 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç kabul edilebilir tekrarlanabilirliği göstermektedir.



Şekil 4.48. Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.

Tekrar üretilebilirlik biyosensörün diğer bir başarı kriteridir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmayı 10 kez tekrar ederek biyosensörümüzün tekrar üretilebilir olup olmadığını araştırdık. Şekil 4.48A'da biyosensöre ait tekrar üretilebilirlik kalibrasyon grafiği bulunmaktadır. Şekil 4.48A'dan görüldüğü gibi tüm biyosensörler benzer lineeriteye sahiptir ve relatif standart hata %3.65 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen relatif standart hata kabul edilebilir tekrar üretilebilirliği göstermektedir.

Biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği, klinik açıdan çok önemlidir. Böylece biyosensör hazırlamak için harcanan zaman azalır ve ölçüm maliyetleri düşer. Bu yüzden biyosensörün rejenerasyonu incelenmiştir. Bu test ayrıca biyosensörün sağlamlığını göstermektedir. Bu yüzden elektrotlar asidik koşullara maruz bırakılır ve biyosensörün cevabı ölçülür. Şekil 4.48B'den görüldüğü gibi biyosensör 5 döngü boyunca iyi sinyal gösterirken, 5 döngü sonunda elektrot yüzeyi bozulmuştur.

Geliştirilen biyosensörün uzun ömürlü olması biyosensörün başarısını gösteren bir kriterdir. Bu yüzden hazırlanan biyosensörler buzdolabında 10 hafta boyunca bekletildi. 7 hafta bekleme sonucunda ölçülen %73'e düşmüştür ve bu durum iyi stabiliteyi göstermektedir (Şekil 4.48C).

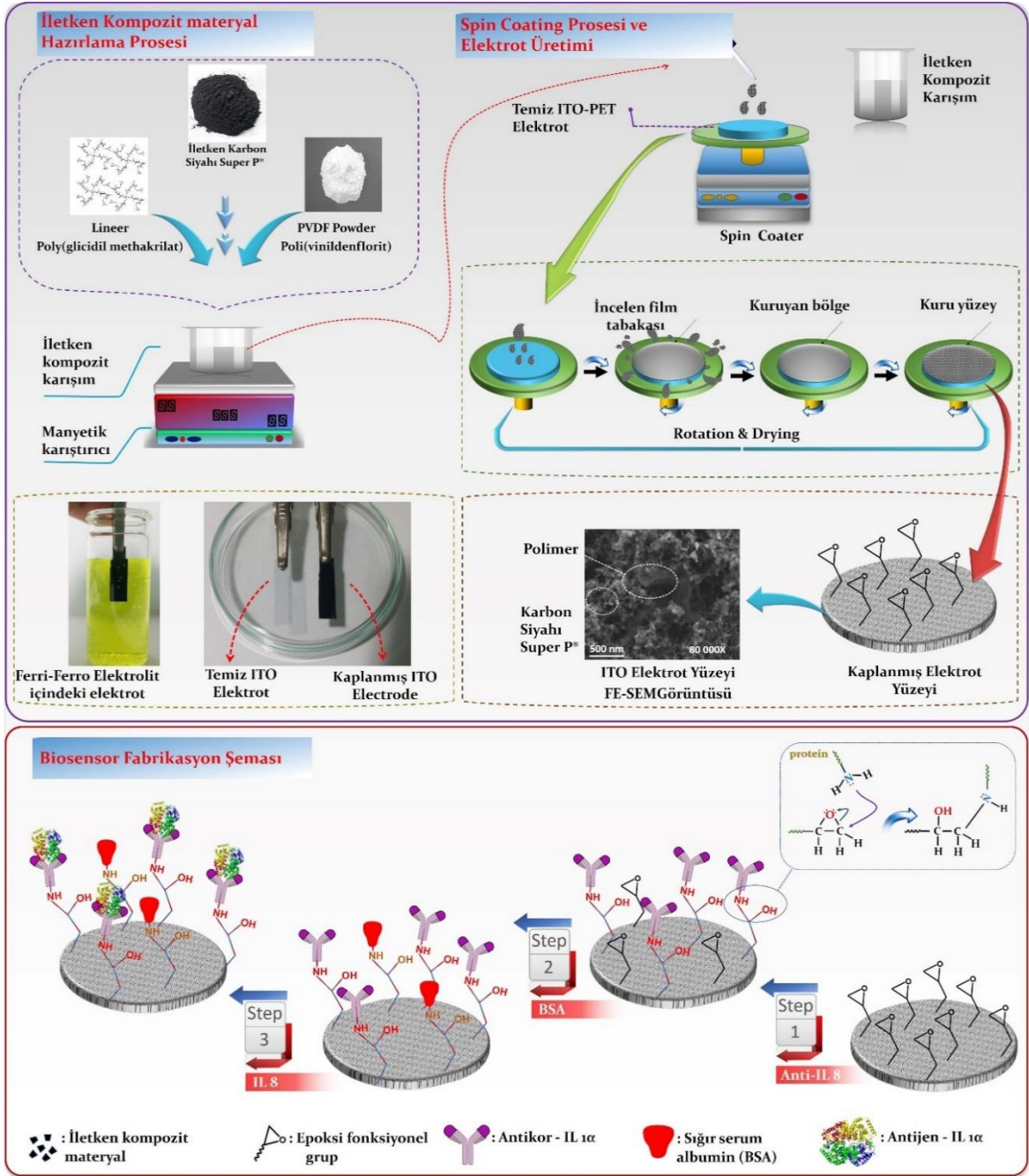
- **Biyosensör ile Gerçek Tükürük ve Serumda IL-1 α Analizi**

Geliştirdiğimiz biyosensörü denemek amacıyla gerçek serum ve tükürükte IL-1 α antijeni tayin edilmiştir. Tükürük ve serum numunelerinde biyosensör ile IL 1 α tayin etmek için 200 ve 10 kat seyreltilmiştir ve üzerine belli miktarda IL-1 α antijeni eklenmiştir. Eklenen konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar çizelge 5'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul edilebilir düzeydedir; geri kazanım %98.45-%101.38 arasındadır.

Çizelge 4.5. Serum ve tükürükte IL 1 α analiz sonuçları.

Örnek	Biyosensör sonuçları (pg/mL)	Eklenen IL-1 α (pg/mL)	Biyosensör ile bulunan toplam	% Geri Kazanım	% Relatif Farklılık
Tükürük 1	0,68	0.20	0,88	100.29	+0.29
Tükürük 2	0,71	0.20	0,92	100.16	+0.16
Tükürük 3	0,48	0.20	0,68	100.46	+0.46
Tükürük 4	0,38	0.20	0,57	98.87	-1.13
Tükürük 5	0,70	0.20	0,89	98.92	-1.08
Serum 1	0,61	0.20	0,79	98.45	-1.55
Serum 2	0,69	0.20	0,89	99.99	-0.01
Serum 3	0,73	0.20	0,94	101.38	+1.38
Serum 4	0,41	0.20	0,60	98.83	-1.17
Serum 5	0,60	0.20	0,79	99.45	-0.55

4.7. BİYOSENSÖR 6 (BİO-6)



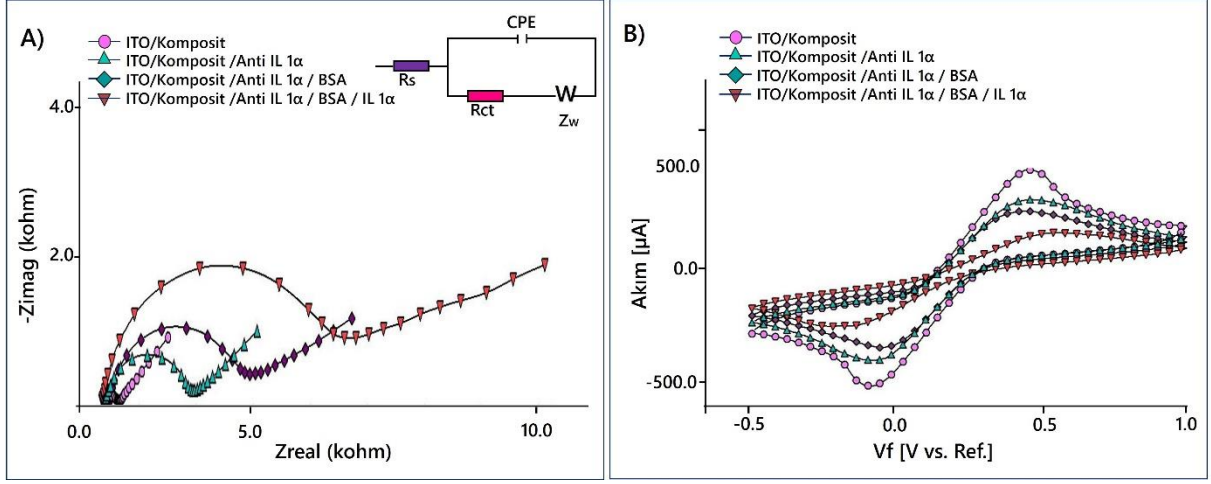
Şekil 4.49. İletken kompozit karışımın hazırlanması, Kompozit materyal kaplı elektrotların üretilmesi ve Biyosensör 6'ya ait immobilizasyon şeması.

Bu bölümde bir önceki çalışmada kullanılan polimer ara yüzey polimeri kullanılarak iletkenlik değerleri çok daha yüksek elektrotlar hazırlanmış ve bu iletkenlik artışının interleukin 1 α 'nın tespit ve tayin aralığını ne kadar ileri düzeylere taşıdığı araştırılmış ve sonuçlar birbiri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan iletken kompozit materyalin nasıl elde edildiği

elektrotların nasıl hazırlandığı biyosensör 6'ya ait immobilizasyon şeması şekil 4.49'de verilmiştir.

Bu bölümde ilk olarak iletken kompozit karışım hazırlanmıştır. Bu karışım hazırlanırken 5 mg PGMA polimer, 40 mg karbon siyahı iletken ajan (Super P), 10 mg polivinildenflorid bağlayıcı (PVDF) çözelti karışımında çözülerek (1.8 ml aseton+0.2 ml NMP) yaklaşık 60 dakika manyetik karıştırıcıda maksimum hızda karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir.

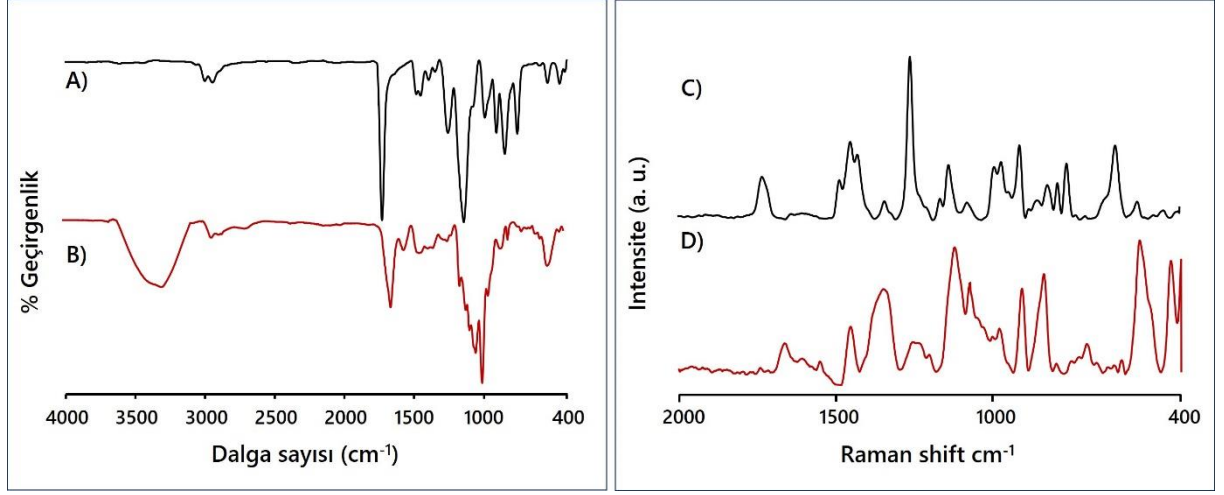
İkinci olarak elde edilen iletken kompozit karışımı önceden temizlenmiş ITO-PET elektrotlara spin coating yöntemi ile bir önceki çalışmada olduğu gibi 1000 rpm hızında, bu defa 30µl miktarlarda damlatılarak toplamda 120 saniye döndürülerek elektrot yüzeylere kaplanmıştır. Bu bölümde hazırlanan elektrotlara vakum altında kurutma işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonrasında üzerinde iletken kompozit tabakaları oluşturulmuş ITO elektrotlar, antikorların kovalent immobilizasyonuna hazır hale getirilmiştir. Şekil 4.49 de bu süreçler görsel olarak ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Elde edilen kompozit kaplı elektrotların elektrolit içerisinde dağılmadan durduğu görseller ve elektrot yüzeyinin yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüsü şekil 4.49 içinde mevcuttur. Bir sonraki basamakta hazırlanan ITO elektrotlar, Anti-IL 1α antikor içeren fosfat tamponuna daldırılıp inkübasyona bırakıldı. Zayıf bağlanmış antikorları uzaklaştırmak için elektrotlar yıkanıp saf argon altında kurutuldu ve CV-EIS ölçümleri alındı. Açık uçları bloklama ajanı olarak ise elektrotlara %0.5 BSA'da inkübasyon işlemi uygulandı ve yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. Immobilizasyon aşamalarından sonra hazır hale gelen elektrotlar, 8 farklı ve artan konsantrasyonda IL 1α içeren fosfat tamponu çözeltilerine inkübasyona bırakılmıştır. Her elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınarak ve böylece IL 1α tayini için yüksek iletkenliğe sahip biyosensör 6 üretilmiştir. Biyosensörün fabrikasyon sırasında immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltamogramlarını ve impedans eğrileri şekil 4.50'te gösterilmektedir. Ayrıca yüzeyde oluşan bu değişimleri izlemek için SEM ve AFM cihazı kullanılarak morfolojik karakterizasyon yapılmıştır (Şekil 4.52).



Şekil 4.50. Biyosensör 5'in immobilizasyon basamaklarına ait impedans eğrileri (A) ve döngüsel voltamogramları (B).

Şekil 4.50'teki ITO/kompozit kaplı impedans eğrisi incelendiğinde kompozit ile kaplanmış ITO elektrodun impedansı oldukça düşüktür. Kompozitin içinde bulunan Super P iletken bir materyal olduğundan, yüzeyin iletkenliğini oldukça arttırmıştır. Super P'nin iletken olması elektrot yüzeyinden elektrolite elektron akışını hızlandırdığı için impedans değeri veya başka bir deyişle yarı daire çapı oldukça küçüktür. Dönüşümlü voltammogramlar incelendiğinde, anodik ve katodik pik akımlarının oldukça büyük olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi yüzeyde oluşan iletken kompozit tabakanın elektron transferini kolaylaştırmasıdır. Bunun yanı sıra iletken kompozit kaplı elektrotlar ile elektrotun aktif yüzey alanı artırılmıştır. Anti-IL 1 α antikorlarının amino grupları epoksi gruplarına kovalent olarak bağlanır. Anti-IL 1 α antikorların kovalent immobilizasyonu ile impedansta bir artma ve akımda belli miktarda azalma gözlenmiştir. Epoksi gruplarının antikorların amin grupları ile yaptığı bağların nasıl oluştuğu şekil 4.49 de gösterilmiştir. Polimer kaynaklı aktif epoksi gruplarının bloke edilmesi için BSA kullanılmıştır. BSA'nın yüzeye bağlanması elektrodun yalıtkanlığını arttırmıştır. Bundan dolayı impedansta bir miktar artma ve akımda bir miktar azalma izlenmiştir. Bu adımlardan sonra ITO temelli biyosensör kullanıma hazır haldedir. IL 1 α antijenin immobilizasyonundan sonra proteinlerin yalıtkan doğasından dolayı impedansta artma ve akımda bir miktar azalma gözlenmiştir. Yukarıda bahsedilen adımlar sonucunda oluşan impedans ve akımdaki değişiklikler elektrot yüzeyinde oluşan değişikliklerin kanıtıdır.

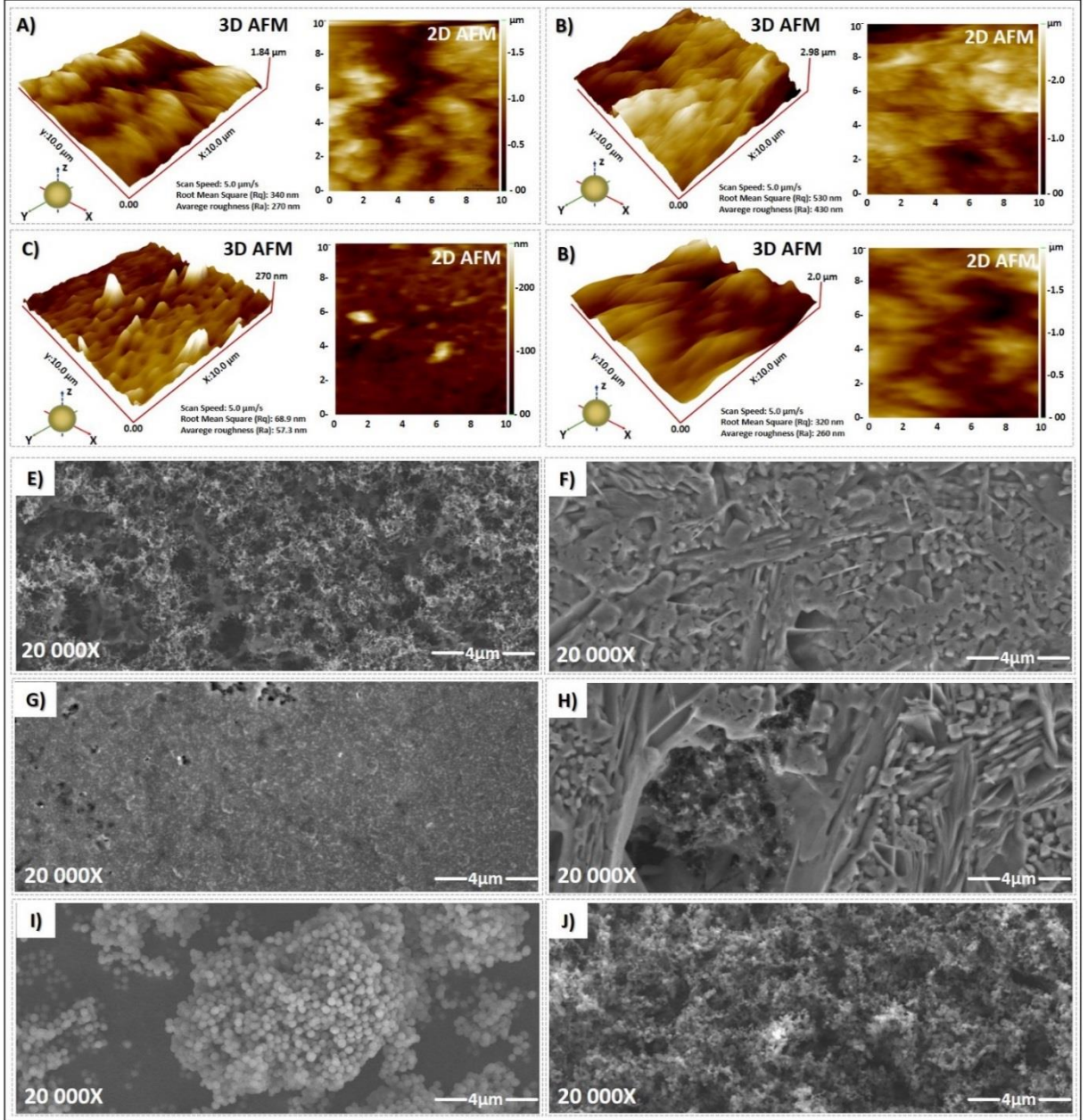
Yüzeyde polimer filmin oluştuğunu ve antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonun gerçekleştiğini izlemek için ayrıca FTIR ve Raman ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 4.51'de Bio-6 biyosensörüne ait FTIR, Raman Spektrumları gösterilmektedir.



Şekil 4.51. Kompozit ara yüzey ile modifiye edilmiş elektrotun antikör öncesi (A/C) ve sonrası (B/D) FTIR ve Raman spektrumları.

Anti-IL 1 α antikörlerin kompozit modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyon öncesi ve sonrası şekil 4.51A ve 4.51B’de gösterilmiştir. Şekil 4.51A’da gösterildiği gibi kompozit kaplı ITO elektrot, yüzeydeki epoksi gruplarından dolayı 905 cm⁻¹ ve 843 cm⁻¹ olmak üzere 2 tane absorpsiyon pikine sahiptir. 1722 cm⁻¹ ‘de gözlenen güçlü pik C=O ‘nun karbonil gruplarının gerilme titreşimini göstermektedir. Anti- IL 1 α ’nin immobilizasyonundan sonra amid I’e ait geniş band ~1640 cm⁻¹’te ve amid II’ye ait keskin band ~1547 cm⁻¹’te gözlenmiştir. Bu durum, anti- IL 1 α antikörünün polimer modifiye elektrot yüzeyine bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.51B). Antikörün elektrot yüzeyine immobilizasyonu Raman Spektrometresi ile de izlenmiştir. Polimer üzerindeki epoksi halkasının gerilme titreşimleri 1259 cm⁻¹ and 910 cm⁻¹’de gözlenmiştir (Şekil 4.51C). Amid I, II ve III bölgeleri sıklıkla 1650–1680 cm⁻¹, 1480-1570 cm⁻¹ and 1235-1300 cm⁻¹’da gözlenmektedir. Şekil 4.51D’de de görüldüğü gibi amid I, II ve III pikleri sırasıyla 1664, 1540 and 1348 cm⁻¹’de gözlenmiştir.

Şekil 4.52’te elektrotun her immobilizasyon basamağından sonra SEM ve AFM görüntüleri bulunmaktadır. Döndürerek kaplama yöntemi ile yüzeyi kompozit ile kaplanmış elektrot yüzeyin net bir şekilde gözlemlenmektedir (Şekil 4.52A) ve eğer karşılaştırmak gerekirse temiz ITO görüntüsünden oldukça farklıdır (Şekil 4.11A). İletken karbon siyahı Super P ve PVDF’e ait SEM görüntüleri şekil 4.52I ve 4.52J’de gösterilmiştir. Şekil 4.52E, 4.52I ve 4.52J karşılaştırıldığında, PGMA polimerin kompozit içinde homojen dağıldığı görülmektedir. Bu basamakta elektrot yüzeyinin ortalama pürüzlülük değeri 270 nm’dir. Elektrot yüzeyinde kompozitte bulunan polimerdeki aktif glisidil gruplara kovalent olarak anti-IL 1 α antikörlerin bağlanmış olduğu SEM resimimde net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.52F) ve morfoloji tamamen değişmiştir.



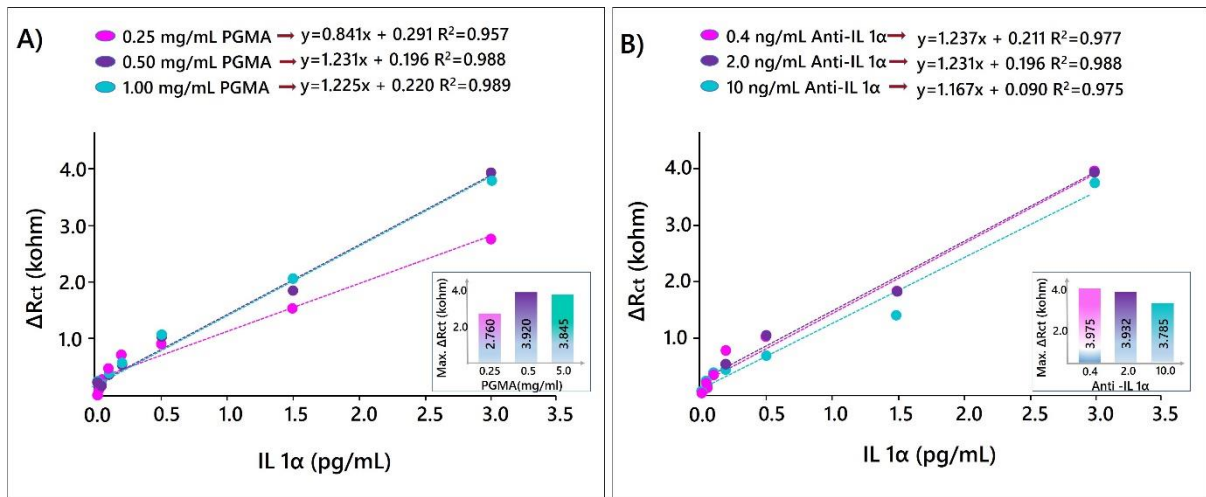
Şekil 4.52. Biyosensör immobilizasyon adımlarına ait SEM ve AFM görüntüleri; kompozit modifikasyonu sonrası (A ve E); antikor immobilizasyonu sonrası (B ve F); BSA ile bloklama sonrası (C ve G); Antikor-antijen etkileşim sonrası elektrot yüzey görüntüsü. (E) Super P, (F) PVDF'e ait SEM görüntüsü.

Şekil 4.52F anti- IL 1 α antikorunun immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin görsel bir kanıtıdır. Bu basamaktaki ortalama pürüzlülük değerinde (430 nm) bağlanmadan dolayı artış gözlenmiştir (Şekil 4.52B). BSA'nın elektrot yüzeyindeki serbest uçlara bağlanması ile yüzeyde diğer çalışmalarda olduğu gibi bir smooth bir görüntü hakimdir (Şekil 4.52G) ve yüzeydeki ortalama pürüzlülük değeri 57.3 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.52C). Anti- IL 1 α antikor ile IL 1 α antijen etkileşiminden sonra yüzeyde bir önceki

basamaktakine göre dramatik değişimler gözlenmiştir (Şekil 4.52H) ve ortalama pürüzlülük değeri 260 nm'dir (Şekil 4.52D).

4.7.1. Biyosensör 6'nın Optimizasyon Basamakları

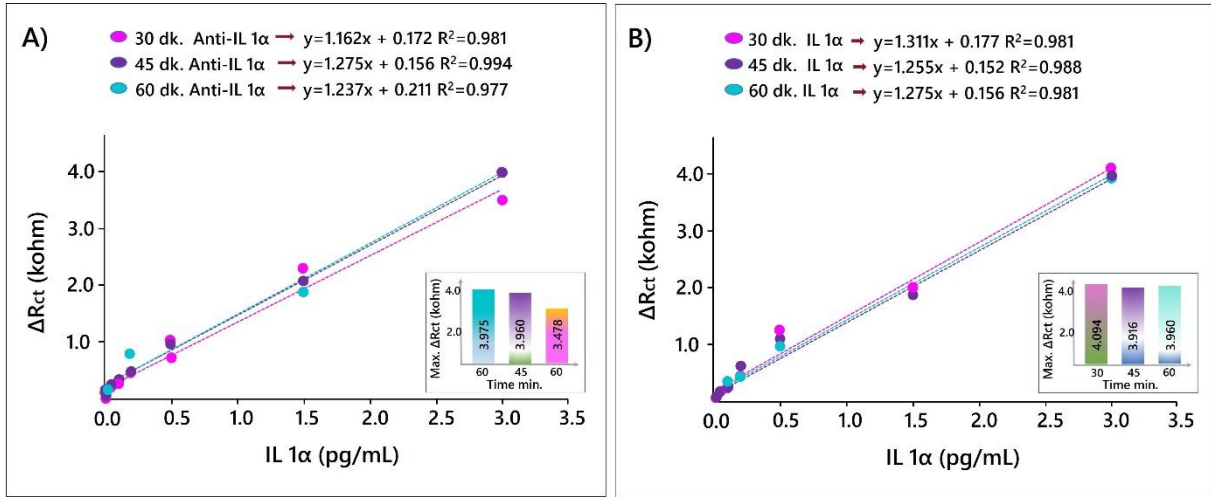
Elektrot yüzeyinde biyotanıma elementlerinin immobilizasyonu için ara yüzeylerin oluşması ve oluşan bu yüzeylerin her çalışmada tekrarlanabilmesi, biyosensörün iyi bir performans sağlaması için oldukça önemlidir. Bu sebepten dolayı, elektrot yüzeyinde antikor immobilizasyonu için uygun gruplara sahip ara yüzey oluşturmak için 3 farklı konsantrasyonda (0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL ve 1 mg/mL) polimer kullanılmıştır. 0.25 mg/mL polimer kullanıldığında yüzeyde antikorların bağlandığı epoksi gruplarının diğer polimer konsantrasyonuna göre az olmasından dolayı daha düşük sinyaller elde edilmiştir. Yüksek polimer konsantrasyonunda (1 mg/mL) ise yüzeyde oluşan epoksi gruplar artmıştır fakat elde edilen sinyal artmamıştır. En yüksek sinyal 0.5 mg/mL konsantrasyonunda elde edilmiştir (Şekil 4.53A). Biyosensörün hassasiyeti büyük ölçüde kullanılan anti-IL 1 α antikor konsantrasyonuna bağlıdır. Bu sebeple 3 farklı konsantrasyonda (0.4 ng/mL, 2 ng/mL ve 10 ng/mL) antikor kullanılmıştır. Şekil 4.53B'de görüldüğü gibi kullanılan üç konsantrasyonda da elde edilen sinyaller yüksektir. Maksimum sinyal 0.4 ng/mL konsantrasyonunda anti-IL 1 α antikor kullanıldığında elde edilmiştir. Düşük antikor konsantrasyonun kullanımı biyosensör maliyetini düşürmektedir.



Şekil 4.53. Biyosensör 6'nın optimizasyonları sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A) kompozit içinde bulunan PGMA polimer konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu (B).

Diğer optimizasyon parametresi ise biyotanıma elementi inkübasyon süresidir. Bu parametre antikorun elektrot yüzeyine bağlanmasını etkilediğinden oldukça önemlidir. Bu

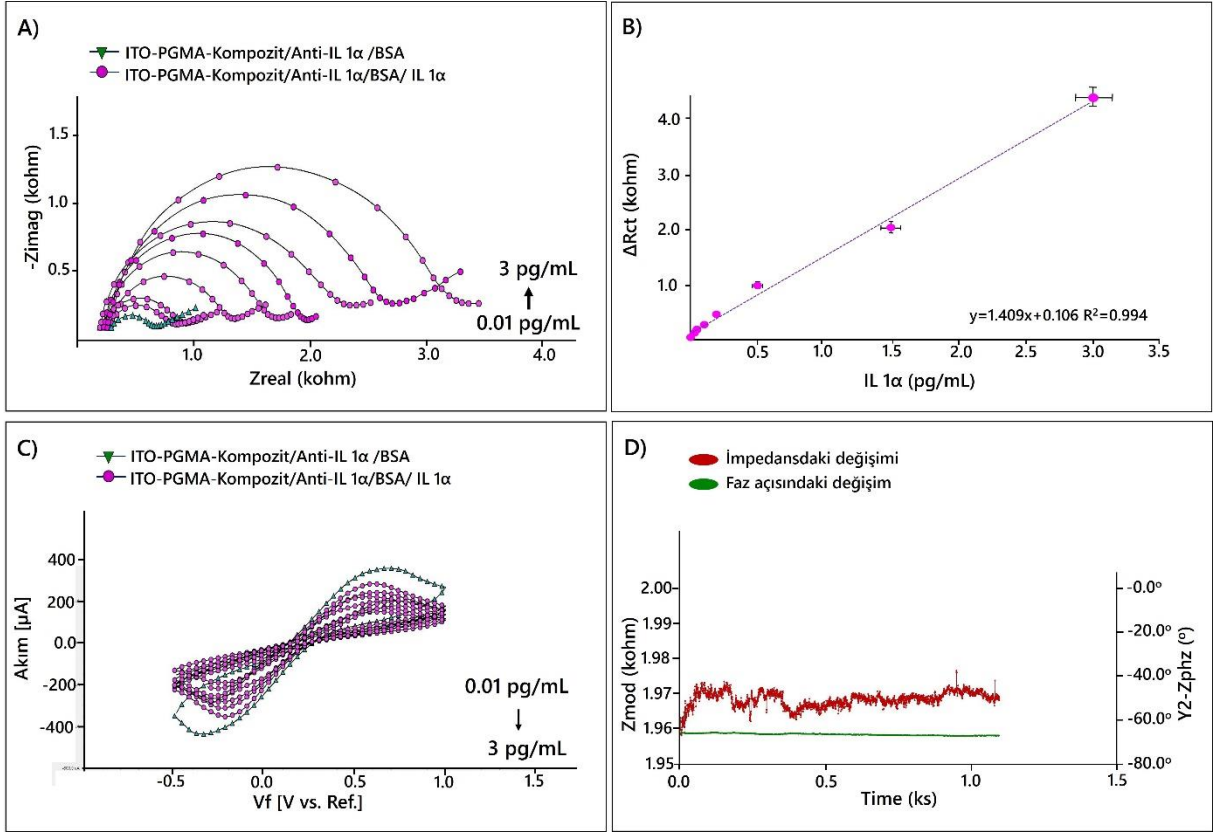
yüzden polimer ile modifiye edilmiş ITO elektrot anti-IL 1 α antikor içeren fosfat tamponunda 3 farklı sürede (30, 45, 60 dk) inkübe edilmiştir. Şekil 4.54A'de görüldüğü gibi 30 dk antikorların bağlanması için yeterli değildir. 45 dk ve 60 dk inkübasyonda elde edilen sinyaller 30 dk inkübasyona göre yüksektir. Fakat en yüksek sinyal 45 dakikada elde edildiğinden dolayı 45 dakika optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Son optimizasyon parametresi IL 1 α antijen inkübasyon süresidir. Bu yüzden üretilen elektrotlar 30, 45 ve 60 dk IL 1 α antijen içeren fosfat tamponuna daldırılmış ve elektrotların verdikleri cevap ölçülmüştür. Tüm inkübasyon süreleri sonunda elde edilen sinyaller benzerdir ve maksimum sinyal 30 dk inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Bu yüzden 30 dk optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir (Şekil 4.54B).



Şekil 4.54. Biyosensör 6'nın optimizasyonlar sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri antikor inkübasyon süresi (A); antijen inkübasyon süresi (B).

- **Lineer Tayin Aralığının Optimizasyonu**

Lineer aralık geliştirilen bir biyosensörün ölçebildiği konsantrasyon aralığını gösterir. Optimum koşullar altında EIS ölçümleri tespit limiti, ölçüm limiti ve lineer tespit aralığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Lineer tespit aralığının tespiti için hazırlanan ITO elektrotlar 8 farklı IL 1 α konsantrasyonundaki PBS tamponunda inkübe edilmiş ve EIS-CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrileri ve dönüşümlü voltametri sonuçları şekil 4.55'de gösterilmiştir.



Şekil 4.55. Farklı IL 1 α konsantrasyonları kullanılarak elde edilen lineer tayin aralık grafiği (B); İmpedans (A); döngüsel voltammetri (C); sabit frekans impedans (D) ölçüm sonuçları.

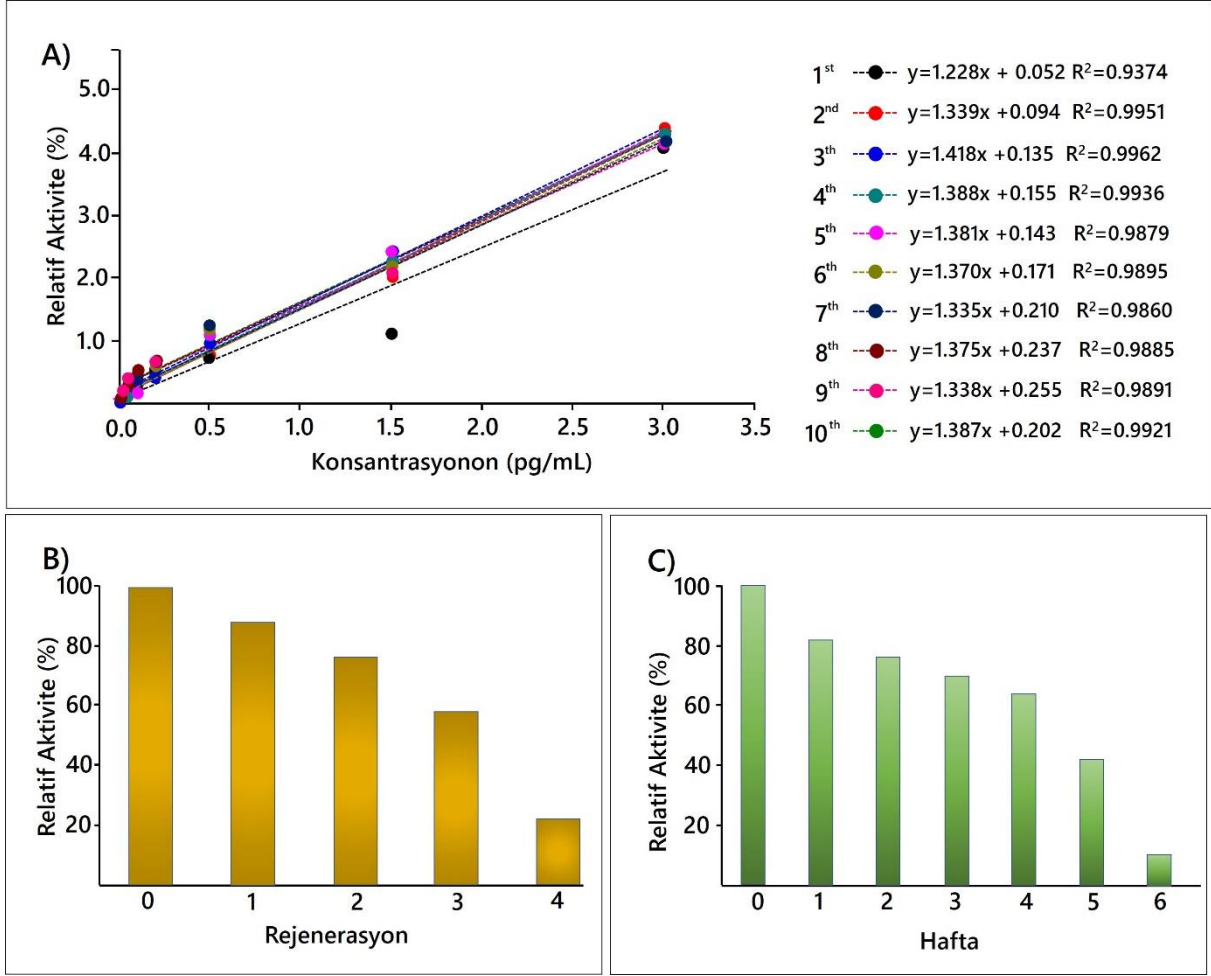
Şekil 4.55’den de görüldüğü gibi R_{ct} değerleri ile IL 1 α konsantrasyonları arasında bir bağıllık vardır. IL 1 α antijen konsantrasyonları arttıkça, R_{ct} değerleri artmıştır (Şekil 4.55A) fakat pik akımları azalmıştır (Şekil 4.55B). Bunun sebebi, spesifik tanıma olaylarının artması elektrolit solüsyondan elektrot yüzeyine redoks prob transferini engellemesidir. İmmunosensör cevabı ile artan IL 1 α konsantrasyonu arasında 0.01 pg/mL – 3 pg/mL aralığında lineer bir korelasyon bulunmuştur. Bu biyosensörün tespit limiti (LOD) 3 fg/mL ve ölçüm limiti 10 fg/mL’dir.

- **Sabit frekans İmpedans (SFI)**

Anti-IL 1 α ve IL 1 α antijen arasındaki spesifik bağlanma sabit bir frekansta izlenebilir. Bu işlem zamana karşı toplam impedansın belli bir frekansta izlenmesi ile gerçekleştirilir. SFI’de kullanılacak sabit frekans Bode eğrisinden seçilmiştir. Bio-6’e ait sabit frekans ölçümü şekil 4.55D’de gösterilmiştir. Şekil 4.55D incelendiğinde impedansta artış (kırmızı) gözlenmiştir ve bu artış anti-IL 1 α ve IL 1 α antijen arasındaki spesifik bağlanmayı kanıtlamaktadır.

- **Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, raf ömrü çalışması**

Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterlerinden biridir. Bu doğrultuda lineer aralığımızın orta noktasındaki IL-1 α konsantrasyonu (0.25 pg/mL) kullanarak ve yaptığımız tüm optimizasyon çalışmalarını göz önünde bulundurarak, 20 farklı elektroda ait sinyalleri ölçtük. Relatif standart hata %5.46 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç kabul edilebilir tekrarlanabilirliği göstermektedir.



Şekil 4.56. Tekrar üretilebilirlik denemesi sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri (A); rejenerasyon (B); depolama ömrü (C) sonuçları.

Tekrar üretilebilirlik biyosensörün diğer bir başarı kriteridir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmayı 10 kez tekrar ederek biyosensörümüzün tekrar üretilebilir olup olmadığını araştırdık. Şekil 4.56A’da biyosensöre ait tekrar üretilebilirlik kalibrasyon grafiği bulunmaktadır. Şekil 4.56A’den görüldüğü gibi tüm biyosensörler benzer lineeriteye sahiptir ve relatif standart hata %4.43 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen relatif standart hata kabul edilebilir tekrar üretilebilirliği göstermektedir.

Biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği, klinik açıdan çok önemlidir. Böylece biyosensör hazırlamak için harcanan zaman azalır ve ölçüm maliyetleri düşer. Bu yüzden biyosensörün rejenerasyonu incelenmiştir. Bu test ayrıca biyosensörün sağlamlığını göstermektedir. Bu yüzden elektrotlar asidik koşullara maruz bırakılır ve biyosensörün cevabı ölçülür. Şekil 4.56B'den görüldüğü gibi biyosensör 6 döngü boyunca iyi sinyal gösterirken, 4 döngü sonunda elektrot yüzeyi bozulmuştur.

Geliştirilen biyosensörün uzun ömürlü olması biyosensörün başarısını gösteren bir kriterdir. Bu yüzden hazırlanan biyosensörler buzdolabında 10 hafta boyunca bekletildi. 5 hafta bekleme sonucunda ölçülen %42'ye düşmüştür ve bu durum iyi stabiliteyi göstermektedir (Şekil 4.56C).

- **Biyosensör ile Gerçek Tükürük ve Serumda IL-1 α Analizi**

Geliştirdiğimiz biyosensörü denemek amacıyla gerçek serum ve tükürükte IL-1 α antijeni tayin edilmiştir. Tükürük ve serum numunelerinde biyosensör ile IL 1 α tayin etmek için 200 ve 10 kat seyreltilmiştir ve üzerine belli miktarda IL-1 α antijeni eklenmiştir. Eklenen konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar çizelge 'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul edilebilir düzeydedir; geri kazanım %98.35-%102.36 arasındadır.

Çizelge 4.6. Serum ve tükürükte IL 1 α analiz sonuçları

Örnek	Biyosensör sonuçları (pg/mL)	Eklenen IL-1 α (pg/mL)	Biyosensör ile bulunan toplam	% Geri Kazanım	% Relatif Farklılık
Tükürük 1	0,63	0.20	0,81	98,45	-1,55
Tükürük 2	0,68	0.20	0,89	101,22	+1,22
Tükürük 3	0,43	0.20	0,65	102,18	+2,18
Tükürük 4	0,33	0.20	0,54	100,45	+0,45
Tükürük 5	0,70	0.20	0,91	100,35	+0,35
Serum 1	0,54	0.20	0,76	102,36	+2,36
Serum 2	0,73	0.20	0,94	100,99	+0,99
Serum 3	0,64	0.20	0,85	101,19	+1,19
Serum 4	0,34	0.20	0,54	98,35	-1,65
Serum 5	0,56	0.20	0,76	100,12	+0,12

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kanser, bugün dünyadaki en yaygın hastalıklardan biridir ve en önde gelen ölüm sebepleri arasındadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, dünyada her yıl yaklaşık 14 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmaktadır. Nüfusunun yaşlanmasıyla yeni vaka sayısının önümüzdeki 20 yılda yüzde 70 artacağı tahmin edilmektedir. Kanserde erken teşhis, uygulanacak tedavinin başarısı ve yaşama şansının artması açısından hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle hassas ve spesifik teşhis yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir. Bu sebepten dolayı, bu tez çalışmasında kanser hastalığında vücutta aktif olarak arttıkları bilenen biyomarkerların tayinine yönelik biyosensörler tasarlanması hedeflenmektedir.

Biyosensörler, analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu transduser yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensör sistemlerinde en büyük sorunlardan biri biyolojik materyalin elektrot yüzeyine immobilizasyonudur. Immobilizasyon adımı biyolojik materyalin ve doğal olarak biyosensörün yaşam ve kullanım süresini belirler. İdeal bir immobilizasyon sisteminin seçimi ile hazırlanan biyosensör sistemlerinden son yıllarda ticari alanda da geniş çapta yararlanılmaktadır.

Tükürük, on yıldan fazladır diagnostik araç olarak ilgi çeken vücut sıvıdır. Yapılan araştırmalar sonunda tükürüğün hastalıklar hakkında bilgi verebileceğini ve kan veya üre ile yapılan testlere yardımcı olacağı belirlenmiştir. Tükürük, çok bileşenli oral sıvıdır ve noninvazif yollarla toplanabilir, ayrıca genel sağlık ve hastalıkların izlenmesinde dikkat çekici potansiyele sahiptir. İnsan tükürüğü çok çeşitli proteinler ve peptidler içerir, bu proteinlerin her biri çeşitli biyolojik fonksiyon taşır. Tükürüğün içindeki zengin çeşitte moleküllerin varlığı, hastalık biyomarkerları açısından tükürüğü zengin kılar. Tükürüğün şu anki HIV, kanser, kardiyak hastalıkları ve oto-immün hastalıkların teşhisinde kullanımı, tükürüğün klinik teşhiste yararlı bir kurtarıcı olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, bu hastalıkların tükürük analizi ile tespiti dikkat çekmektedir. Tükürüğün, teşhis ortamı olarak kullanılmasının başlıca avantajları, örnekleme kolay ve non invanzif olması böylece kan toplanması sırasında rahatsızlık ve ağrıyı, üre toplama sırasında oluşan mahremiyet hissini elime eder.

Bu tez çalışmasında tükürükte bulunan ve kanser oluşumu ile vücut sıvılarında konsantrasyonu artan 3 farklı biyomarkerin (interleukin 1 α , interleukin 1 β ve interleukin 8) tayinine yönelik 6 farklı biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörlerin fabrikasyonu sırasında indiyum kalay oksit (ITO) ve florin doplanmış kalay oksit (FTO) tabakalar transduser olarak

kullanılmıştır. Daha sağlam ve daha hassas bir biyosensör üretmek için biyosensör fabrikasyonuna etki eden deneysel koşullar optimize edilmiştir. Üretilen biyosensörün performansını ölçmek için tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, depo stabilitesi ve tekrar kullanılabilirlik yetisi (rejenerasyon) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Bio-1 biyosensörünün fabrikasyonu sırasında ITO tabaka transduser, PHA ara yüzey materyali, anti-interleukin 1 β biyolojik materyal olarak kullanılarak interleukin 1 β tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, PHA ilk kez bu tez çalışmasında elektrot ara yüzey materyali olarak kullanılmıştır. Geliştirilen biyosensörün elektrokimyasal karakterizasyonu CV ve EIS teknikleri ile, morfolojik karakterizasyonu SEM ve AFM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PHA'nın elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturması FTIR, Raman ve SEM-EDX kullanılarak takip edilmiştir. Ayrıca, antikorların elektrot yüzeyine immobilizasyonu FTIR ve Raman ölçümleri ile kanıtlanmıştır. Geliştirilen biyosensör 0.025-3 pg/mL tayin aralığına ve 7.5 fg/mL tespit ve 25 fg/mL ölçüm limitine sahiptir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik RSD'leri %4.56 ve %5.42 olarak hesaplanmıştır. Düşük RSD değerleri biyosensörün başarısını göstermektedir. Ayrıca biyosensör 7 hafta stabilite göstermektedir. Ek olarak, geliştirilen biyosensörler serum ve tükürükte IL 1 β tayininde kullanılmış ve doğruluğunu tespit etmek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bio-2 biyosensöründe Bio-1'den farklı olarak biyotanıma elementi olarak anti-IL 8 antikorlar kullanılarak IL 8 antijeni tayin edilmiştir. Bio-2 biyosensörünün tayin aralığı 0.02-3 pg/mL, tespit limiti 6 fg/mL ve tayin limiti 19 fg/mL'dir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik RSD'leri %4.49 ve %5.20'dir. Düşük RSD değerleri biyosensörün başarısını göstermektedir. Bio-2 biyosensörü de Bio-1'de olduğu gibi 7 hafta stabilite göstermektedir. Serum ve tükürükteki analitik uygulaması gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ELISA kit sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların birbirine yakın olması biyosensörün başarısını göstermektedir.

ITO elektroda alternatif olan FTO elektrot kullanılarak Bio-3 ve Bio-4 biyosensörleri geliştirilmiştir. FTO, dünyadaki indiyum rezervlerinin azalmasından dolayı ITO elektroda alternatiftir. Son günlerde literatürde FTO temelli biyosensörlerin sayısı artmaktadır. Bio-3 biyosensörünün fabrikasyonu için FTO elektrot üzerinde bir silanlama ajanı olan IPTES kullanılarak kendiliğinden oluşan tabakalar oluşturulmuştur. Geliştirilen bu biyosensör IL 8 tayininde kullanılmıştır. Bio-4 biyosensörünün fabrikasyonu sırasında FTO elektrot yüzeyinde ITO elektrot yüzeyinde olduğu gibi PHP kullanılarak tek tabaka oluşturulmuş, PHP modifiye FTO elektrot IL 1 α tayininde kullanılmıştır. Biyosensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu CV ve EIS teknikleri ile, morfolojik karakterizasyonu SEM ve AFM kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. IPTES modifikasyonu kullanılarak üretilmiş Bio-3 biyosensörü 0.04-2 pg/mL tayin aralığına, 10.6 tespit ve 35.3 tayin limitine; PHP modifikasyonu ile üretilen Bio-4 biyosensörü ise 0.02-2 pg/mL tayin aralığına, 6 fg/mL tespit ve 19 tayin limitine sahiptir. Bio-3 biyosensörü için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik RSD'leri %5.57 ve %6.15 olarak hesaplanmıştır. Düşük RSD değerleri biyosensörün başarısını göstermektedir. Bio-3 biyosensörünün raf ömrü takip edildiğinde 5 hafta stabilite gösterdiği izlenmiştir. Tükürükteki analitik uygulaması gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ELİSA kit sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların birbirine yakın olması biyosensörün başarısını göstermektedir. Bio-4 biyosensörü için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik RSD'leri %4.85 ve %2.65 olarak hesaplanmıştır. Düşük RSD değerleri biyosensörün başarısını kanıtlamaktadır. Bio-4 biyosensörünün depolama ömrü takip edildiğinde 9 hafta stabilite gösterdiği izlenmiştir. Tükürük ve serumdaki analitik uygulaması gerçekleştirilmiş ve biyosensör cevabının doğruluğunu kanıtlamak için standart katma yöntemi kullanılmıştır. Yüksek geri kazanım değerleri metodun başarısını kanıtlamaktadır.

Biyosensör 5 ve 6 üretimi diğer biyosensörlerden farklı olarak tasarlanmıştır. Bu biyosensörlerin yüzeyinde tek tabakalar oluşturmak yerine dönerek kaplama (spin coating) yöntemi ile ince filmler oluşturulmuştur. Bio-5 biyosensörünün üretimi için elektrotların ara yüzeyi polimer modifikasyonu tek adımda hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem özellikle ince film üretiminde ucuz, oldukça pratik ve uygulanabilirliği kolay olan bir yöntemdir. Bu metod kullanımının avantajı oluşan film tabakasının homojen yapıda olmasıdır. Bio-6 biyosensörünün Bio-5'den farkı; Bio-6 biyosensöründe polimer haricinde iletkenliği arttırmak için Super P kullanılmış olmasıdır. Polimer, Super P ve PVDF karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra elektrot yüzeyine döndürülerek kaplanmış, böylece kompozit kaplı elektrot üretilmiştir. Biyosensörlerin her modifikasyon basamakları elektrokimyasal (CV ve EIS) teknikler ve morfolojik (SEM ve AFM) teknikler ile karakterize edilmiştir. Sadece polimer kaplanarak hazırlanan Bio-5 biyosensörü 0.01-2 pg/mL tayin aralığına, 3.3 fg/mL tespit ve 10 fg/mL tayin limitine; kompozit kaplanarak hazırlanan Bio-4 biyosensörü ise 0.01-3 pg/mL tayin aralığına, 3 fg/mL tespit ve 10 fg/mL tayin limitine sahiptir. Bio-5 biyosensörü için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik RSD'leri %5.72 ve %3.65 olarak hesaplanmıştır. Düşük RSD değerleri biyosensörün başarısının kanıtıdır. Bio-5 biyosensörünün raf ömrü takip edildiğinde 7 hafta stabilite gösterdiği gözlenmiştir. Bio-6 biyosensörü için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik RSD'leri %5.16 ve %4.43 olarak hesaplanmıştır. Düşük RSD değerleri biyosensörün başarısının kanıtıdır. Bio-5 biyosensörünün depolama ömrü takip edildiğinde 5 hafta stabilite gösterdiği gözlenmiştir. Her iki biyosensör kullanılarak serum ve tükürükteki IL

1 α konsantrasyonu ölçülmüştür ve biyosensörler standart katma metodu ile doğrulanmıştır. Yüksek gerikazanım değerleri biyosensörlerin başarısını kanıtlamaktadır.

Tez çalışması kapsamında 6 farklı biyosensör geliştirilmiş ve bu biyosensör iyi bir tekrarlanabilirliğe, tekrar üretilebilirliğe ve uzun depolama ömrüne sahiptir. Biyosensörlerin hazırlanışının kolay oluşu, geniş bir tayin aralığına sahip olması ve düşük tespit limitlerine sahip olması biyosensörleri başarılı kılmaktadır. İlave olarak klinik uygulamalardaki başarısı biyosensörü ticari hale getirilip kullanılabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak yapılan çalışmalar doğrultusunda üretilen biyosensörler, tek kullanımlık pratik ve ekonomik elektrot teknolojisinin kanser biyomarkerlarının tespitinde yüksek duyarlılık ve seçicilikte kullanılabilceğini işaret etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Al Kawas, S., Rahim, Z.H., Ferguson, D.B., 2012. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch. Oral Biol.*, 57:1 1-9.
- Amirudin, A., Thieny, D., 1995. Application of electrochemical impedance spectroscopy to study the degradation of polymer-coated metals. *Prog. Org. Coat.* 26:1 1-28.
- Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Palleschi, G., Piermarini, S., Ricci, F., Volpe, G., 2016. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 79: 114-126.
- Arya, S.K., Prusty, A.K., Singh, S., Solanki, P.R., Pandey, M.K., Datta, M., Malhotra, B.D., 2007. Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer. *Anal. Biochem.* 363:2 210-218.
- Aydın, E.B., Aydın, M., Sezgintürk, M.K., 2017. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF α in human saliva and serum samples. *Biosens. Bioelectron.* 97: 169-176.
- Aydın, E.B., Aydın, M., Sezgintürk, M.K., 2018a. 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. *Sens. Actuators, B.* 270: 18-27.
- Aydın, E.B., Sezgintürk, M.K., 2017a. Indium Tin Oxide (ITO): A promising material in biosensing technology. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 97: 309-315.
- Aydın, E.B., Sezgintürk, M.K., 2017b. A sensitive and disposable electrochemical immunosensor for detection of SOX2, a biomarker of cancer. *Talanta* 172, 162-170.
- Aydın, E.B., Sezgintürk, M.K., 2018. An impedimetric immunosensor for highly sensitive detection of IL-8 in human serum and saliva samples: A new surface modification method by 6-phosphonohexanoic acid for biosensing applications. *Anal. Biochem.* 554: 44-52.
- Aydın, M., Aydın, E.B., Sezgintürk, M.K., 2018b. A disposable immunosensor using ITO based electrode modified by a star-shaped polymer for analysis of tumor suppressor protein p53 in human serum. *Biosens. Bioelectron.* 107, 1-9.

- Bahadır, E., Sezgintürk, M., 2016a. Label-free, ITO-based immunosensor for the detection of a cancer biomarker: Receptor for Activated C Kinase 1. *Analyst* 141:19, 5618-5626.
- Bahadır, E.B., Sezgintürk, M.K., 2015a. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta* 132, 162-174.
- Bahadır, E.B., Sezgintürk, M.K., 2015b. Electrochemical biosensors for hormone analyses. *Biosens. Bioelectron.* 68, 62-71.
- Bahadır, E.B., Sezgintürk, M.K., 2016b. A review on impedimetric biosensors. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 44(1), 248-262.
- Balasubramanian, K., Burghard, M., 2006. Biosensors based on carbon nanotubes. *Anal. Bioanal. Chem.* 385:3, 452-468.
- Banerjee, P., Bhunia, A.K., 2009. Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins. *Trends Biotechnol.* 27:3, 179-188.
- Banyamin, Z.Y., Kelly, P.J., West, G., Boardman, J., 2014. Electrical and optical properties of fluorine doped tin oxide thin films prepared by magnetron sputtering. *Coatings* 4:4, 732-746.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Sigaud, M., Bausells, J., Errachid, A., 2017. A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection. *Biosens. Bioelectron.* 93, 170-175.
- Barthelmebs, L., Hayat, A., Limiadi, A.W., Marty, J.-L., Noguier, T., 2011. Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sens. Actuators, B* 156:2, 932-937.
- Bisquert, J., 2002. Theory of the impedance of electron diffusion and recombination in a thin layer. *J. Phy. Chem. B* 106:2, 325-333.
- Bohunicky, B., Mousa, S.A., 2011. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol., Sci. Appl.* 4, 1.
- Canbaz, M.Ç., Sezgintürk, M.K., 2014. Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection. *Anal. Biochem.* 446, 9-18.
- Cervin Serrano, S., González Villareal, D., Aguilar-Medina, M., Romero-Navarro, J.G., Romero Quintana, J.G., Arámbula Meraz, E., Osuna Ramírez, I., Picos-Cárdenas, V.,

- Granados, J., Estrada-García, I., 2014. Genetic polymorphisms of interleukin-1 alpha and the vitamin d receptor in mexican mestizo patients with intervertebral disc degeneration. *Int. J. Genomics* 2014.
- Chai, Y., Horikawa, S., Simonian, A., Dyer, D., Chin, B.A., 2013. Wireless magnetoelastic biosensors for the detection of Salmonella on fresh produce. *Sensing Technology (ICST), 2013 Seventh International Conference on*, pp. 174-177. IEEE.
- Chatterjee, S.K., Zetter, B.R., 2005. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future.
- Chen, L., Xu, S., Li, J., 2011. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chem. Soc. Rev.* 40:5, 2922-2942.
- Chianeh, Y.R., Prabhu, K., 2014. Biochemical markers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4, S33-S40.
- Chiang, C.-Y., Hsieh, M.-L., Huang, K.-W., Chau, L.-K., Chang, C.-M., Lyu, S.-R., 2010. Fiber-optic particle plasmon resonance sensor for detection of interleukin-1 β in synovial fluids. *Biosens. Bioelectron.* 26:3, 1036-1042.
- Chullasat, K., Kanatharana, P., Limbut, W., Numnuam, A., Thavarungkul, P., 2011. Ultra trace analysis of small molecule by label-free impedimetric immunosensor using multilayer modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* 26:11, 4571-4578.
- Cole, K.S., Cole, R.H., 1941. Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics. *J. Chem. Phy.* 9:4, 341-351.
- Conneely, G., Aherne, M., Lu, H., Guilbault, G.G., 2007. Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal. Chim. Acta.* 583:1, 153-160.
- Couniot, N., Afzalian, A., Van Overstraeten-Schlögel, N., Francis, L., Flandre, D., 2015. Capacitive biosensing of bacterial cells: analytical model and numerical simulations. *Sens. Actuators, B.* 211, 428-438.
- Crew, A., Lonsdale, D., Byrd, N., Pittson, R., Hart, J.P., 2011. A screen-printed, amperometric biosensor array incorporated into a novel automated system for the simultaneous determination of organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 26:6, 2847-2851.
- Daasch, L., Smith, D., 1951. Infrared spectra of phosphorus compounds. *Anal. Chem.* 23:6, 853-868.

- de Carvalho, C.C., 2011. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.* 29:1, 75-83.
- Del Sol, A., Balling, R., Hood, L., Galas, D., 2010. Diseases as network perturbations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:4, 566-571.
- Dong, T., Pires, N.M.M., 2017. Immunodetection of salivary biomarkers by an optical microfluidic biosensor with polyethylenimine-modified polythiophene-C70 organic photodetectors. *Biosens. Bioelectron.* 94, 321-327.
- Edmondson, S., Huck, W.T., 2004. Controlled growth and subsequent chemical modification of poly (glycidyl methacrylate) brushes on silicon wafers. *J. Mater. Chem.* 14:4, 730-734.
- El-Said, W.A., Choi, J.-W., 2014. Electrochemical Biosensor consisted of conducting polymer layer on gold nanodots patterned Indium Tin Oxide electrode for rapid and simultaneous determination of purine bases. *Electrochim. Acta* 123, 51-57.
- Elshafey, R., Tlili, C., Abulrob, A., Tavares, A.C., Zourob, M., 2013. Label-free impedimetric immunosensor for ultrasensitive detection of cancer marker Murine double minute 2 in brain tissue. *Biosens. Bioelectron.* 39:1, 220-225.
- Fan, Z., Lin, Q., Gong, P., Liu, B., Wang, J., Yang, S., 2015. A new enzymatic immobilization carrier based on graphene capsule for hydrogen peroxide biosensors. *Electrochim. Acta* 151, 186-194.
- Fong, Z.V., Winter, J.M., 2012. Biomarkers in pancreatic cancer: diagnostic, prognostic, and predictive. *The Cancer Journal* 18:6, 530-538.
- Gündoğdu, A., Aydın, E.B., Sezgintürk, M.K., 2017. A novel electrochemical immunosensor based on ITO modified by carboxyl-ended silane agent for ultrasensitive detection of MAGE-1 in human serum. *Anal. Biochem.* 537, 84-92.
- Hamad, A.-W.R., Gaphor, S.M., Shawagfeh, M.T., Al-Talabani, N.G., 2011. Study of serum and salivary levels of Proinflammatory cytokines, Potential Biomarkers in the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Acad. J. Cancer Res.* 4:2, 47-55.
- Han, P., Xu, S., Feng, S., Hao, Y., Wang, J., 2016. Direct determination of creatinine based on poly (ethyleneimine)/phosphotungstic acid multilayer modified electrode. *Talanta* 151, 114-118.

- Helali, S., Martelet, C., Abdelghani, A., Maaref, M.A., Jaffrezic-Renault, N., 2006. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads on gold surface for the detection of atrazine. *Electrochim. Acta* 51(24), 5182-5186.
- Hou, L., Cui, Y., Xu, M., Gao, Z., Huang, J., Tang, D., 2013. Graphene oxide-labeled sandwich-type impedimetric immunoassay with sensitive enhancement based on enzymatic 4-chloro-1-naphthol oxidation. *Biosens. Bioelectron.* 47, 149-156.
- Jayanthi, V.S.A., Das, A.B., Saxena, U., 2017. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* 91, 15-23.
- Justino, C.I., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A., 2015a. Analytical applications of affibodies. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 65, 73-82.
- Justino, C.I., Freitas, A.C., Amaral, J.P., Rocha-Santos, T.A., Cardoso, S., Duarte, A.C., 2013. Disposable immunosensors for C-reactive protein based on carbon nanotubes field effect transistors. *Talanta* 108, 165-170.
- Justino, C.I., Freitas, A.C., Pereira, R., Duarte, A.C., Santos, T.A.R., 2015b. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 68, 2-17.
- Justino, C.I., Rocha-Santos, T.A., Duarte, A.C., 2010. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 29(10), 1172-1183.
- Kafi, A., Chen, A., 2009. A novel amperometric biosensor for the detection of nitrophenol. *Talanta* 79(1), 97-102.
- Kaur, N., Thakur, H., Prabhakar, N., 2016. Conducting polymer and multi-walled carbon nanotubes nanocomposites based amperometric biosensor for detection of organophosphate. *J. Electroanal. Chem.* 775, 121-128.
- Khan, M.Z.H., 2016. Effect of ITO surface properties on SAM modification: A review toward biosensor application. *Cogent Engineering* 3(1), 1170097.
- Khondoker, M.A.H., Yang, S.Y., Mun, S.C., Kim, J., 2012. Flexible and conductive ITO electrode made on cellulose film by spin-coating. *Synth. Met.* 162:21-22, 1972-1976.

- Kong, J., Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39:8, 549-559.
- Korostoff, A., Reder, L., Masood, R., Sinha, U.K., 2011. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. *Oral oncology*, 47:4, 282-287.
- Krause, C.E., Otieno, B.A., Bishop, G.W., Phadke, G., Choquette, L., Lalla, R.V., Peterson, D.E., Rusling, J.F., 2015. Ultrasensitive microfluidic array for serum pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein to assess oral mucositis risk in cancer patients. *Anal. Bioanal. Chem.* 407:23, 7239-7243.
- Kumar, S., Kumar, S., Tiwari, S., Augustine, S., Srivastava, S., Yadav, B.K., Malhotra, B.D., 2016. Highly sensitive protein functionalized nanostructured hafnium oxide based biosensing platform for non-invasive oral cancer detection. *Sens. Actuators B*, 235, 1-10.
- Kurouski, D., Van Duyne, R.P., Lednev, I.K., 2015. Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review. *Analyst*, 140:15, 4967-4980.
- Labuda, J., Brett, A.M.O., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Paleček, E., Wang, J., 2010. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 82:5, 1161-1187.
- Lawrence, C., 1988. The mechanics of spin coating of polymer films. *The Physics of fluids* 31:10, 2786-2795.
- Lee, J.H., Huynh-Nguyen, B.-C., Ko, E., Kim, J.H., Seong, G.H., 2016. Fabrication of flexible, transparent silver nanowire electrodes for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Sens. Actuators B*, 224, 789-797.
- Lee, K.-T., Liu, D.-M., Liang, Y.-Y., Matsushita, N., Ikoma, T., Lu, S.-Y., 2014. Porous fluorine-doped tin oxide as a promising substrate for electrochemical biosensors—demonstration in hydrogen peroxide sensing. *J. Mater. Chem. B*, 2:44, 7779-7784.
- Lewis, B.G., Paine, D.C., 2000. Applications and processing of transparent conducting oxides. *MRS bulletin* 25:8, 22-27.

- Li, M., Zhao, W., Tian, L., Li, H., Fan, B., 2017. Fabrication of Biosensor for Selective Electrochemical Determination of Glycated Hemoglobin. *Int. J. Electrochem. Sci.* 12(9), 8411-8420.
- Lisdat, F., Schäfer, D., 2008. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:5, 1555.
- Liu, J., Duan, Y., 2012. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral oncology* 48:7, 569-577.
- Lowe, C.R., 2007. Overview of biosensor and bioarray technologies. *Handbook of biosensors and biochips.*
- Luo, X., Davis, J.J., 2013. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chem. Soc. Rev.* 42:13, 5944-5962.
- Lushtinetz, R., Seifert, G., Jaehne, E., Adler, H.J.P., 2007. Infrared spectra of alkylphosphonic acid bound to aluminium surfaces. *Macromolecular symposia*, pp. 248-253. Wiley Online Library.
- Matsushima, K., Oppenheim, J.J., 1989. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1:1, 2-13.
- Mattox, D.M., Mattox, V.H., 2007. Review of Transparent Conductive Oxides (TCO). *Soc. Vac. Coaters.*
- Mishra, R., 2012. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral oncology* 48:7, 578-584.
- Mukaida, N., Harada, A., Yasumoto, K., Matsushima, K., 1992. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol. Immunol.* 36:8, 773-789.
- Muñoz, J., Montes, R., Baeza, M., 2017. Trends in Electrochemical Impedance Spectroscopy involving nanocomposite transducers: characterization, architecture surface and biosensing. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 97, 201-215.
- Nagler, R.M., 2009. Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis. *Oral oncology* 45:12, 1006-1010.
- Noroozifar, M., Khorasani-Motlagh, M., Nadiki, H.H., Hadavi, M.S., Foroughi, M.M., 2014. Modified fluorine-doped tin oxide electrode with inorganic ruthenium red dye-

- multiwalled carbon nanotubes for simultaneous determination of a dopamine, uric acid, and tryptophan. *Sens. Actuators B*, 204, 333-341.
- Nygren, P.Å., 2008. Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three- helix bundle scaffold. *The FEBS journal* 275:11, 2668-2676.
- Ozmen, M., Can, K., Ersoz, M., 2009. Immobilization of albumin on indium-tin oxide (ITO) surface via isocyanate linkage. *J. Electroanal. Chem.* 633:1, 228-234.
- Pandey, C.M., Dewan, S., Chawla, S., Yadav, B.K., Sumana, G., Malhotra, B.D., 2016. Controlled deposition of functionalized silica coated zinc oxide nano-assemblies at the air/water interface for blood cancer detection. *Anal. Chim Acta.* 937, 29-38.
- Pejcic, B., De Marco, R., 2006. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim. Acta.* 51:28, 6217-6229.
- Perumal, V., Hashim, U., 2014. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. App. Biomed.* 12:1, 1-15.
- Polanska, H., Raudenska, M., Gumulec, J., Sztalmachova, M., Adam, V., Kizek, R., Masarik, M., 2014. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral oncology* 50:3, 168-177.
- Prabhakar, N., Thakur, H., Bharti, A., Kaur, N., 2016. Chitosan-iron oxide nanocomposite based electrochemical aptasensor for determination of malathion. *Anal. Chim. Acta.* 939, 108-116.
- Radhika, T., Jeddy, N., Nithya, S., Muthumeenakshi, R., 2016. Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma-An insight. *Journal of oral biology and craniofacial research* 6, S51-S54.
- Rajkumar, K., Nandhini, G., Ramya, R., Rajashree, P., Kumar, A.R., Anandan, S.N., 2014. Validation of the diagnostic utility of salivary interleukin 8 in the differentiation of potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma in a region with high endemicity. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 118:3, 309-319.
- Regan, E.M., Hallett, A.J., Wong, L.C., Saeed, I.Q., Langdon-Jones, E.E., Buurma, N.J., Pope, S.J., Estrela, P., 2014. A novel cobalt complex for enhancing amperometric and impedimetric DNA detection. *Electrochim. Acta.* 128, 10-15.

- RK, I., Kallichurn, H., 2012. What will be the Future Development of Electrochemical Biosensors for the Detection and Quantification of Biomarkers 2:4, 1-5.
- Russo, N., Bellile, E., Murdoch-Kinch, C.A., Liu, M., Eisbruch, A., Wolf, G.T., D'silva, N.J., 2016. Cytokines in saliva increase in head and neck cancer patients after treatment. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology 122:4, 483-490.
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D., 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnol. Adv. 30:3, 489-511.
- Schoch, P., Pomytkin, I., 2015. Skin rejuvenating effects of interleukin-1 alpha: A cosmetic study on collagen deposition and elasticity in ageing skin. Aesthetics, 2:3, 1-4.
- Sharma, R., Deacon, S.E., Nowak, D., George, S., Szymonik, M., Tang, A., Tomlinson, D., Davies, A., McPherson, M., Wälti, C., 2016. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. Biosens. Bioelectron. 80, 607-613.
- Singh, A., Choudhary, M., Singh, M., Verma, H., Singh, S.P., Arora, K., 2015. DNA Functionalized direct electro-deposited gold nanoaggregates for efficient detection of Salmonella typhi. Bioelectrochemistry 105, 7-15.
- Sivasubramanian, R., Sangaranarayanan, M., 2015. A facile formation of silver dendrites on indium tin oxide surfaces using electrodeposition and amperometric sensing of hydrazine. Sens. Actuators B, 213, 92-101.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2017. Principles of instrumental analysis. Cengage learning.
- Sohn, S., Han, Y.S., 2011. Transparent conductive oxide (TCO) films for organic light emissive devices (OLEDs). Organic Light Emitting Diode-Material, Process and Devices. InTech.
- Song, M.-J., Kim, S., Min, N.K., Jin, J.-H., 2014. Electrochemical serotonin monitoring of poly (ethylenedioxythiophene): poly (sodium 4-styrenesulfonate)-modified fluorine-doped tin oxide by predeposition of self-assembled 4-pyridylporphyrin. Biosens. Bioelectron. 52, 411-416.
- Stadler, A., 2012. Transparent conducting oxides-An up-to-date overview. Materials 5:4, 661-683.

- Sultana, T., Svechnikov, K., Weber, G.n., Söder, O., 2000. Molecular cloning and expression of a functionally different alternative splice variant of prointerleukin-1 α from the rat testis. *Endocrinology* 141:12, 4413-4418.
- Sun, Q., Sun, F., Wang, B., Liu, S., Niu, W., Liu, E., Peng, C., Wang, J., Gao, H., Liang, B., 2014. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin α v β 6 upregulation in colorectal cancer. *Cancer letters* 354:2, 245-253.
- Tang, H., Zhang, W., Geng, P., Wang, Q., Jin, L., Wu, Z., Lou, M., 2006. A new amperometric method for rapid detection of *Escherichia coli* density using a self-assembled monolayer-based bienzyme biosensor. *Anal. Chim. Acta.* 562:2, 190-196.
- Tawil, N., Sacher, E., Mandeville, R., Meunier, M., 2014. Bacteriophages: biosensing tools for multi-drug resistant pathogens. *Analyst* 139:6, 1224-1236.
- Thomas Jr, G.J., 1999. Raman spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:1, 1-27.
- Tiwari, I., Singh, M., Pandey, C.M., Sumana, G., 2015. Electrochemical genosensor based on graphene oxide modified iron oxide–chitosan hybrid nanocomposite for pathogen detection. *Sens. Actuators B*, 206, 276-283.
- Torrente-Rodríguez, R., Campuzano, S., Montiel, V.R.-V., Gamella, M., Pingarrón, J., 2016. Electrochemical bioplatfroms for the simultaneous determination of interleukin (IL)-8 mRNA and IL-8 protein oral cancer biomarkers in raw saliva. *Biosens. Bioelectron.* 77, 543-548.
- Tyona, M., 2013. A theoritical study on spin coating technique. *Adv. Mater. Res.* 2:4, 195-208.
- Velásquez, I.M., Frumento, P., Johansson, K., Berglund, A., de Faire, U., Leander, K., Gigante, B., 2014. Association of interleukin 8 with myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program. *Int. J. Cardiol.* 172:1, 173-178.
- Velázquez-Nevárez, G., Vargas-García, J., Lartundo-Rojas, L., Chen, F., Shen, Q., Zhang, L., 2016. Preparation, characterization and electronic properties of fluorine-doped tin oxide films. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 31:1, 48-51.
- Wan, Y., Deng, W., Su, Y., Zhu, X., Peng, C., Hu, H., Peng, H., Song, S., Fan, C., 2011. Carbon nanotube-based ultrasensitive multiplexing electrochemical immunosensor for cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* 30:1, 93-99.

- Wang, J., 2005a. Carbon- nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis* 17:1, 7-14.
- Wang, J., 2005b. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst* 130:4, 421-426.
- Wang, X., Lu, X., Chen, J., 2014. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2, 25-32.
- Wong, D.T., 2006. Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer. ‘Oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6:3, 267-272.
- Xie, K., 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine growth factor rev.* 12:4, 375-391.
- Yagati, A.K., Pyun, J.-C., Min, J., Cho, S., 2016. Label-free and direct detection of C-reactive protein using reduced graphene oxide-nanoparticle hybrid impedimetric sensor. *Bioelectrochemistry* 107, 37-44.
- Yang, L., Bashir, R., 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol. Adv.* 26:2, 135-150.
- Yang, L., Li, Y., 2005. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157: H7. *Biosens. Bioelectron.* 20:7, 1407-1416.
- Zarogoulidis, P., Katsikogianni, F., Tsiouda, T., Sakkas, A., Katsikogiannis, N., Zarogoulidis, K., 2014. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. *Cancer Invest.* 32:5, 197-205.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Wang, X., 2013. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin. Chim. Acta* 415, 261-265.

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
GOKAEK Başkanı

Namık Kemal Mah. Kampüs Cad. No:1 59030
Telefon: (0 282) 250 59 04 - Faks: (0 282) 250 99 28
Elektronik Ağ: <http://tip.nku.edu.tr>

Ayrıntılı Bilgi İçin: Engin Deniz RENÇBER
e- posta: edrencher@nku.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Elif Burcu AYDIN, 09 Eylül 1985 yılında Tekirdağ'da doğdu. Lisans öğrenimini Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde 2009 yılında tamamlamıştır. Ayrıca Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde yandal yapmıştır. 2012 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim dalından yüksek lisans derecesini aldı.

Tez Süresinde Yapılan Akademik Yayınlar;

- Aydın E. B., Sezgintürk M. K., A disposable and ultrasensitive ITO based biosensor modified by 6-phosphonohexanoic acid for electrochemical sensing of IL-1 β in serum and saliva Analytica Chimica Acta, in press.
- Aydın E. B., Sezgintürk M. K., An impedimetric immunosensor for highly sensitive detection of IL-8 in human serum and saliva samples: A new surface modification method by 6-phosphonohexanoic acid for biosensing applications, Analytical Biochemistry 554 (2018) 44-52.
- Aydın E. B., Aydın M., Sezgintürk M. K., A disposable immunosensor using ITO based electrode modified by a star-shaped polymer for analysis of tumor suppressor protein p53 in human serum, Biosensors and Bioelectronics 107 (2018) 1-9.
- Aydın E. B., Sezgintürk M. K., Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology, TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, pp. 309-315, 2017.
- Aydın E. B., Aydın M., Sezgintürk M. K., A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF α in human saliva and serum samples, Biosensors and Bioelectronics, vol. 97, pp. 169-176, 2017.
- Gündoğdu A., Aydın E. B., Sezgintürk M. K., A novel electrochemical immunosensor based on ITO modified by carboxyl-ended silane agent for ultrasensitive detection of MAGE-1 in human serum, Analytical Biochemistry, vol. 537, pp. 84-92, 2017.

- Aydın E. B., Sezgintürk M. K., A sensitive and disposable electrochemical immunosensor for detection of SOX2, a biomarker of cancer, *Talanta*, pp. 162-170, 2017.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 286-306, 2016.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., A comparative study of short chain and long chain mercapto acids used in biosensor fabrication: A VEGF-R1-based immunosensor as a model system, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, pp. 1-9, 2016.
- Bahadır E. B., Applications of graphene in electrochemical sensing and biosensing, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 1-14, 2016.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Poly(amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications, *Talanta*, vol. 148, pp. 427-438, 2016.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., A review on impedimetric biosensors, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, pp. 1-15, 2016.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Label-free, ITO-based immunosensor for the detection of a cancer biomarker: Receptor for Activated C Kinase 1, *The Analyst*, vol. 141, pp. 5618-5626, 2016.
- Ekmekyapar F., Bahadır E. B., Meriç Pagano S., Ecotoxicological and inorganic chemicals' characterization of rainwater in an urban residential area, *Desalination and Water Treatment*, vol. 56, pp. 1291-1298, 2015.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biotreat/biowarfare analyses, *Analytical Biochemistry*, vol. 478, pp. 107-120, 2015.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M.K., Electrochemical biosensors for hormone analyses, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 68, pp. 62-71, 2015.
- Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*, vol. 132, pp. 162-174, 2015.

Kitap Bölümleri;

Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Food Biosensors, Bölüm: Food Biosensors: Perspective, reliability, selectivity, response time, quality control and cost effectiveness, Yayın Yeri: RSC, 2017.

Bahadır E. B., Sezgintürk M. K., Nanobiosensors, Bölüm: Biosensor technologies for analyses of food contaminants, Yayın Yeri: ELSEVIER, 2017.

Bahadır E. B., Meriç Pagano S., Urban Water Reuse Handbook (UWRH), Bölüm: Rain Water use in Urban Area, Yayın Yeri: Taylor and Francis, Editör: Saeid Eslamian, 2015.