

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

APOPTOZİS BELİRTECİNİN BELİRLENMESİNDE BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Kezban KARTLAŞMIŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdullah TULİ

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

APOPTOZİS BELİRTECİNİN BELİRLENMESİNDE BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Kezban KARTLAŞMIŞ

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdullah TULİ**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK-2019-12115 No'lu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA-2023

KABUL VE ONAY

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Apoptozis Belirtecinin
Belirlenmesinde Biyosensör Geliştirilmesi” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 07/02/2024

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Abdullah TULİ
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Zafer YÖNDEN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Fatma H. YERLİKAYA AYDEMİR
Selçuk Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU
İnönü Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun ../../.. tarih ve Sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhine doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 07.02.2024

Kezban Kartlaşmış

Kayıtlı Olunan Program : Tıbbi Biyokimya

Tezin Konusu : Apoptozis Belirtecini Belirlenmesinde Biyosensör Geliştirilmesi

Tezin Türü : Yüksek Lisans:

Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Abdullah Tuli

Danışmanın İletişim Bilgileri

E-Posta :

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon :

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, doktora eğitimimde büyük özveri ve sabırlarıyla yardımlarını esirgemeyen tez danışmanlarım Prof. Dr. Abdullah TULİ ve Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e ve ayrıca doktora eğitimi öğrenim sürecimde birikimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Levent Kayrın'a çok teşekkür ederim.

Ders aşamasında teorik bilgilerini aktaran Tıbbi Biyokimya öğretim üyelerine ve Öğr. Gör. Dr. Ebru Dünder YENİLMEZ'e teşekkür ederim. Tezim süresince görüş ve katkılarından dolayı tez izleme komitesi hocalarımdan Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER'e teşekkür ederim. Doktora öğrenimim sürecinde manevi desteklerinden ötürü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca desteklerinden dolayı anneme ve babama teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TDK-2019-12115 No'lu proje ile maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Kaspazlar	3
2.1.1. Kaspazların sınıflandırılması	4
2.1.2. Kaspazların biyokimyası	4
2.1.3. Kaspazların fizyolojik rolleri ve önemi	6
2.1.3.1. Kaspaz-3 hakkında genel bilgi	7
2.1.3.2. İnsan hastalıklarında kaspaz-3'ün önemi	8
2.1.3.2.1. Kanser ve kaspaz-3	8
2.1.3.2.2. Nörodejeneratif hastalıklar ve kaspaz-3	9
2.1.3.2.3. Kardiyovasküler hastalıklar ve kaspaz-3	10
2.1.3.2.4. İnflamasyon ve Kaspaz-3	10
2.2. Biyosensörler	10
2.2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması	12
2.2.1.1. Dönüştürücüye göre sınıflandırma	12
2.2.1.1.1. Optik biyosensörler	13
2.2.1.1.2. Termal biyosensörler	13
2.2.1.1.3. Elektronik biyosensörler	13
2.2.1.1.4. Gravimetrik biyosensörler	13
2.2.1.1.5. Elektrokimyasal biyosensörler	14

2.2.1.1.5.1. Potansiyometrik biyosensörler.....	14
2.2.1.1.5.2. İmpedimetrik biyosensörler	14
2.2.1.1.5.3. Kondüktometrik biyosensörler	14
2.2.1.1.5.4. Voltametrik biyosensörler	14
2.2.1.1.5.5. Amperometrik biyosensörler	15
2.2.1.1.5.5.1. Antikor temelli amperometrik biyosensörler	15
2.2.1.2. Biyoreseptörlere göre sınıflandırma	17
2.2.1.2.1. Enzim temelli biyosensörler	18
2.2.1.2.2. Antikor temelli biyosensörler	18
2.2.1.2.3. Aptamer temelli biyosensörler.....	18
2.2.1.2.4. Hücre temelli biyosensörler.....	19
2.2.1.2.5. Nanobiyosensörler	19
2.2.2. Döngüsel voltametri (CV)	19
2.2.3. Biyosensörlerde immobilizasyon teknikleri	22
2.2.3.1. Adsorpsiyon	23
2.2.3.2. Tutuklama	23
2.2.3.3. Enkapsülasyon	24
2.2.3.4. Kovalent bağlama	24
2.2.3.5. Çapraz bağlama.....	24
2.2.3.5.1. Glutaraldehit (GA, pentan-1,5-dial).....	25
2.2.3.5.2. <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -3-(dimetilaminopropil)karbodiimit/ <i>N</i> - hidroksisüksinimit (EDC/NHS)	26
2.3. Antijen-Antikor Etkileşimindeki Bağlar	27
2.4. İmmobilizasyon materyalleri ve yapıları	28
2.4.1. Kitosan	28
2.4.2. Sığır Serum Albumini (BSA).....	30
2.4.3. Aljinat	31
2.4.4. Jelatin	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Gereçler	35

3.1.1. Cihazlar	35
3.1.2. Kimyasallar	35
3.1.3. Kullanılan tamponlar	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Elektrotların mekanik ve elektrokimyasal temizliği	36
3.2.2. Çalışma gruplarının belirlenmesi	37
3.2.3. İmmobilizasyon jellerinin ve biyoaktif tabakanın hazırlanması	37
3.2.4. Kaspaz-3 biyosensörünün hazırlanması	37
3.2.5. Biyoaktif tabakanın görüntülenmesi için yapılan analizler	39
3.2.5.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin alınması	39
3.2.5.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) spektrumlarının alınması	40
3.2.5.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ölçümlerinin alınması	41
3.2.6. Çalışma koşullarının optimizasyonu	41
3.2.6.1. Elektrokimyasal çalışma aralığının optimizasyonu	41
3.2.6.2. Çalışma elektrodunun belirlenmesi.....	42
3.2.6.3. pH-tampon optimizasyonu	42
3.2.6.4. Tampon derişiminin optimizasyonu	42
3.2.7. İmmobilizasyon parametrelerinin optimizasyonları.....	42
3.2.7.1. Jel bileşenlerinin optimizasyonu	42
3.2.7.2. Çapraz bağlayıcı optimizasyonu	42
3.2.8. Karakterizasyon çalışmaları.....	43
3.2.8.1. Doğrusal saptama aralığının belirlenmesi	43
3.2.8.2. Gün içi tekrarlanabilirlik	43
3.2.8.3. Günler arası tekrarlanabilirlik	43
3.2.8.4. Raf ömrü çalışması.....	43
3.2.9. ELISA ile kaspaz-3 ölçüm prosedürü.....	44
3.2.10. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. Biyoaktif tabakanın SEM mikrograflarının incelenmesi.....	46
4.1.1. Boş Au elektrodun SEM mikrografı.....	46

4.1.2. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA jeline ait SEM mikrografi.....	47
4.1.3. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit tabakaya ait SEM mikrografi	48
4.1.4. %7,5 Jelatin+%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3'e ait SEM mikrografi	48
4.1.5. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatine ait SEM mikrografi.....	49
4.1.6. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit'e ait SEM mikrografi	50
4.1.7. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3 ait SEM mikrografi	50
4.1.8. %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan'a ait SEM mikrografi	51
4.1.9. %1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10 µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS'e ait SEM mikrografi.....	52
4.1.10. %1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS+10µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografi.....	53
4.1.11. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin' e ait SEM mikrografi	53
4.1.12. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin+EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3'e ait SEM mikrografi.....	54
4.1.13. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3+10 µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografi.....	55
4.2. FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi	55
4.2.1. %7,5 Jelatin+%2,5 BSA polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrum karşılaştırması	56
4.2.2. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrum karşılaştırması	56
4.2.3. %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrum karşılaştırması	57
4.2.4. %1 Aljinat- %7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumlarının karşılaştırılması	58
4.3. AFM analizlerinin değerlendirilmesi	60
4.4. Çalışma koşullarının optimizasyonu	62
4.4.1. Çalışma elektrodunun belirlenmesi	62

4.4.2. Elektrokimyasal çalışma aralığının optimizasyonu.....	63
4.4.3. pH-Tampon optimizasyonu	64
4.4.4. Tampon derişiminin optimizasyonu	65
4.5. İmmobilizasyon parametrelerinin optimizasyonları.....	66
4.5.1. Jel bileşenlerinin optimizasyonu	66
4.5.2. Çapraz bağlayıcı optimizasyonu	67
4.6. Karakterizasyon çalışmaları.....	68
4.6.1. Doğrusal saptama aralığının belirlenmesi.....	68
4.6.2. Gün içi tekrarlanabilirlik.....	69
4.6.3. Günler arası tekrarlanabilirlik	71
4.6.4. Elektrot raf ömrünün belirlenmesi	72
4.7. ELISA ve Biyosensör Sonuçları	72
4.8. İstatiksel analiz sonuçları.....	74
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Memeli kaspazlarının sınıflandırılması ve domain yapısı.....	4
Şekil 2.2. Kaspazların aktivasyonu, yapısal özellikleri ve biyolojik işlevleri.....	5
Şekil 2.3. Apoptotik yolda kaspaz-8, 3, 6, 7'nin rolü.....	6
Şekil 2.4. Apoptozda dışsal (ölüm ligandı) ve içsel (mitokondriyal) yollar.....	7
Şekil 2.5. Biyosensörlerin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.6. Antikoru genel yapısı.....	16
Şekil 2.7. Tek kullanımlık Au elektrot üzerindeki HRP ve benzokinin etkileşimi.....	17
Şekil 2.8. Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması.....	17
Şekil 2.9. Farklı döngüsel voltamogram örnekleri.....	20
Şekil 2.10. Genel bir döngüsel voltametri.....	21
Şekil 2.11. CV deneyleri için bir reaksiyon hücresinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.12. Fiziksel ve kimyasal immobilizasyon teknikleri.....	23
Şekil 2.13. Glutaraldehitin yapısı.....	25
Şekil 2.14. Schiff bazı oluşumu ile sonuçlanan, glutaraldehitin amino ve karboksil grupları arasındaki tepkime mekanizması.....	26
Şekil 2.15. EDC/NHS çapraz bağlama şeması.....	27
Şekil 2.16. Antijen-antikor bağlanmasındaki non-kovalent bağlar.....	28
Şekil 2.17. Kitosanın kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.18. Elektrot yüzeyinde kitosana desteklenmiş biyomoleküllerin immobilizasyonu.....	29
Şekil 2.19. BSA'nın yapısı (sarı çubuk benzeri yapı proteinin dipol momentini göstermektedir).....	30
Şekil 2.20. Aljinatın kimyasal yapısı.....	31
Şekil 2.21. Aljinatın kimyasal ünitelerinin yapısı (G: guluronik asit, M: mannuronik asit).....	31
Şekil 2.22. Jelatinin yapısı.....	33
Şekil 2.23. Aljinat-Jelatin kompozitin yapısı.....	34
Şekil 3.1. a) Boş Au elektrot, b) Au elektrota immobilizasyon jelinin eklendiği durum c) immobilizasyonun gerçekleştiği durum.....	38
Şekil 3.2. Kaspaz-3 biyosensörünün şekilsel özeti.....	38
Şekil 3.3. Kaspaz-3 ELISA kitinin ölçüm yöntemi.....	45
Şekil 4.1. Boş Au elektrodun SEM mikrografı.....	46
Şekil 4.2. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA jeline ait SEM mikrografı.....	47
Şekil 4.3. Jelatin ile BSA arasındaki etkileşim sırasında gözlemlenen yapısal değişikliklerin şekilsel gösterimi.....	47
Şekil 4.4. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit tabakaya ait SEM mikrografı.....	48

Şekil 4.5.	%7,5 Jelatin+%2,5 BSA+10µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3 ait SEM mikrografi.....	49
Şekil 4.6.	%2,5 Kitosan+%7,5 Jelatine ait SEM mikrografi.....	49
Şekil 4.7.	%2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit'e ait SEM mikrografi	50
Şekil 4.8.	%2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3'ün SEM mikrografi	51
Şekil 4.9.	%1 Aljinat+ %2,5 Kitosan'a ait SEM mikrografi.....	51
Şekil 4.10.	(a) Aljinat-Kitosan iskelesinin şematik gösterimi. (b) İskelenin kimyasal yapısı	52
Şekil 4.11.	%1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10 µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS'e ait SEM mikrografi	52
Şekil 4.12.	%2,5 Kitosan+%1 Aljinat+10 µg/mL kaspaz-3 antikor+EDC/NHS+10 µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografi.....	53
Şekil 4.13.	%1 Aljinat-%7,5 Jelatin' e ait SEM mikrografi	53
Şekil 4.14.	%1 Aljinat+ %7,5 Jelatin+ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3'e ait SEM mikrografi	54
Şekil 4.15.	%1 Aljinat-%7,5 jelatin/EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3+ 10 µg/mL kaspaz-3'ün SEM mikrografi.....	55
Şekil 4.16.	%7,5 Jelatin+%2,5 BSA polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumları.....	56
Şekil 4.17.	%2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumları	57
Şekil 4.18.	%1 Aljinat+ %2,5 Kitosan polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumları.....	58
Şekil 4.19.	%1 Aljinat- %7,5 jelatin polimerlerin kullanıldığı biyoaktif tabakanın FTIR spektrumlarının karşılaştırılması	59
Şekil 4.20.	%1 Aljinat-%7,5 jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M) polimerine ait AFM görüntüsü, histogramı ve istatistiği.....	60
Şekil 4.21.	%1 Aljinat-%7,5 jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)+ 10 ng/mL Antikaspaz-3-Kaspaz-3 etkileşimine ait AFM görüntüsü, histogramı ve istatistiği	61
Şekil 4.22.	Au, Pt ve GC çalışma elektrotlarının karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.23.	Çalışma aralığının belirlenmesi.....	64
Şekil 4.24.	Optimum tampon-pH grafiği.....	65
Şekil 4.25.	Optimum tampon derişim grafiği	66
Şekil 4.26.	Aljinat ve jelatin karışımının farklı derişimlerdeki yanıt grafiği	67
Şekil 4.27.	Farklı glutaraldehit ve EDC/NHS çapraz bağlayıcı derişimlerinin kaspaz-3 biyosensör yanıtı üzerine etkisi	68
Şekil 4.28.	Kaspaz-3 biyosensörünün doğrusal saptama aralığının CV grafiği	69
Şekil 4.29.	Kaspaz-3 biyosensörünün gün içi tekrarlanabilirlik grafiği	70
Şekil 4.30.	Kaspaz-3 biyosensörünün günler arası tekrarlanabilirlik voltamogramı	71
Şekil 4.31.	Günler arası tekrarlanabilirlik grafiği.	71

Şekil 4.32. Elektrot raf ömrü grafiği.	72
Şekil 4.33. Kaspaz-3 ELISA kitinin standart grafiği.....	73
Şekil 4.34. ELISA-Biyosensör sonuçları ve korelasyon grafiği.	75
Şekil 4.35. Biyosensör ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ROC eğrisi).....	76



ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 4.1. Biyosensöre ait çalışma parametreleri	63
Çizelge 4.2. Kaspaz-3 derişimlerine karşılık gelen akım değerleri	69
Çizelge 4.3. 10 ng/mL kaspaz-3 için tekrarlanabilirlik (n=15) sonuçları	70
Çizelge 4.4. Kaspaz-3 ELISA kitinin kaspaz-3 derişimlerine karşılık gelen ortalama OD değerleri	73
Çizelge 4.5. Kaspaz-3 derişimlerinin ELISA ve biyosensör sonuçları	74



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3D	: 3 boyutlu
AC	: Alternatif akım
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
Antikaspaz-3	: Kaspaz-3 antikoru
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
Au	: Altın
Bcl-2	: B hücre lenfoma-2
BH-3	: Bcl-2 homolog alan-3
BSA	: Sığır serum albumini
c-FLIP	: FLICE inhibitör protein
CV	: Döngüsel voltametri (cyclic voltammetry)
CV	: Varyasyon katsayısı
COP	: CARD (kaspaz alım domaini) protein
DISC	: Ölüme uyaran sinyal bileşiği
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent ölçüm
FADD	: Fas bağlantılı ölüm alanı
Fe	: Ferrosen
Fe⁺	: Ferrosenyum
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
FLICE	: FADD-benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzim
GC elektrot	: Cam karbon elektrot
IL-1β	: İnterlökin-1 β
LOD	: Saptama sınırı
NALP-3	: Nükleotid bağlanma oligomerizasyon domain benzeri reseptör protein-3
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
Pt	: Platin
Ra	: Yüzeyin aritmetik ortalama pürüzlülüğü
ROC	: Alıcı İşlem Karakteristiği
Rq	: Ortalama pürüzlülük değerin karekökü

SD	: Standart sapma
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TRAIL	: Tümör nekroz faktör bağlantılı apoptoz uyarıcı ligand
XPS	: X-ışını fotoelektron spektrometresi



ÖZET

Apoptozis Belirtecini Belirlenmesinde Biyosensör Geliştirilmesi

Apoptoz gelişim ve doku homeostazında kritik rol oynayan temel bir fizyolojik süreçtir. Bu süreç, belirli koşullar altında bir dizi sinyal dizisi tarafından düzenlenir. Kaspaz kaskat sistemi, hücre içi apoptotik sinyallerin indüksiyonunda, transdüksiyonunda ve amplifikasyonunda hayati rol oynar. Bir sistein-aspartik asit proteazı olan kaspaz-3 küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, hepatoselüler karsinomda, intraserebral kanamalarda, akciğer adenokarsinomunda, şiddetli seyreden endometriyozis vakalarında, mesane karsinomunda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, Kaspaz-3'ün saptanması, apoptoz görüntüleme, erken tümör tedavisi ve diğer hastalıkların izlem etkisinin değerlendirilmesi için büyük önem taşımaktadır.

Elektrokimyasal immünoensörler aktif tabaka yüzeyinde immobilize edilmiş antikör ve özgün antijen arasındaki etkileşimlere dayanan bir tür afinite biyosensörüdür. Bu tez çalışmasında kaspaz-3'ün nicel ölçümü için elektrokimyasal immünoensör tasarımı ve bu biyosensöre ait karakterizasyon ile optimizasyon çalışmaları yapılarak elde edilen sonuçların ELISA yöntemiyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında altın elektrot yüzeyi antikaspaz-3 ile kaplandı ve tepkime ortamındaki kaspaz-3 ile etkileşimi sonucu oluşturduğu akım farkından yararlanıldı. Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda kitosan, aljinat, jelatin ve BSA'nın farklı kombinasyonları kullanılarak immobilizasyon jelleri hazırlandı. SEM mikrograflarında ve FTIR spektrumlarında optimum immobilizasyon polimerkombinasyonu Aljinat-Jelatin'de elde edilmiştir. AFM analizinden elde edilen yüzey görüntüleri SEM ve FTIR sonuçlarını desteklemektedir. Optimum çapraz bağlayıcı EDC/NHS (0,3 M:0,1 M) olup çalışma ortamı pH'si 6,5, 0,1 M asetat tamponunda optimum sonuçlar elde edilmiştir. Tasarladığımız kaspaz-3 biyosensörünün doğrusal saptama aralığı 1.5-100 ng/mL, tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen ortalama değer ($\bar{x}$)=10,02, standart sapma değeri (SD)=0,18 varyasyon katsayısı (CV)= %1,8'dir. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen standart sapma değeri 2,5'dir. Elektrodun raf ömrü ise %40 aktivite kaybının görüldüğü 30. güne kadar kullanılabilir olduğu belirlendi. ELISA yöntemi ve tasarlanan biyosensör verilerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen korelasyon katsayısı 0,9927 olup bu değer tasarlanan kaspaz-3 biyosensörünün pratikte kullanımı için uygun olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: apoptoz, elektrokimyasal immünoensör, kaspaz-3

ABSTRACT

Biosensor Development for the Determination of an Apoptosis Marker

Apoptosis is an essential physiological process that plays a critical role in development and tissue homeostasis. This process is regulated by a series of signals under certain conditions. The caspase cascade system plays a vital role in the induction, transduction, and amplification of intracellular apoptotic signals. Caspase-3, a cysteine-aspartic acid protease, has been associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer, hepatocellular carcinoma, intracerebral hemorrhages, lung adenocarcinoma, severe endometriosis cases, and bladder carcinoma. Therefore, detection of caspase-3 is of great importance for apoptosis imaging, early tumor therapy, and evaluation of the surveillance effect of other diseases.

Electrochemical immunosensors are a type of affinity biosensor based on interactions between antibodies and specific antigens immobilized on the active layer surface. In this thesis, it is aimed to compare the results obtained by performing the electrochemical immunosensor design for the quantitative measurement of caspase-3 and the characterization and optimization studies of this biosensor with the ELISA method.

In the first stage of the thesis work, the gold electrode surface was coated with anticaspase-3, and in the next stage, the current difference created by interacting with caspase-3 in the reaction medium was used. In the optimization of the bioactive layer, immobilization gels were prepared using different combinations of chitosan, alginate, gelatin, and BSA. In SEM micrographs and FTIR spectra, the optimal immobilization gel combination of Alginate-Gelatin was obtained. The surface images obtained from the AFM analysis support the SEM and FTIR results. The optimal crosslinker is EDC/NHS (0,3M/0,1M), and optimal results were obtained in a 0.1 M acetic acid/acetate buffer with a working pH of 6.5. The linear detection range of the caspase-3 biosensor we designed is 1.5-100 ng/mL, the mean value ($\bar{x}$)=10.02 obtained in the intraday repeatability study, the standard deviation value (SD)=0.18, the coefficient of variation (CV)= 1.8%. The standard deviation value obtained from the interday repeatability study is 2.52. The shelf life of the electrode was determined to be usable until the 30th day, when 40% activity loss was observed. The correlation coefficient obtained as a result of the comparison of the ELISA method and the designed biosensor data is 0.9927, which shows that the designed caspase-3 biosensor is suitable for practical use.

Keywords: apoptosis, electrochemical immunosensor, caspase-3

1. GİRİŞ

Ökaryotların homeostazı hücrelerin yaşam ve ölümü arasındaki ince denge ile mümkündür. Hücreler, bir dizi ölüm mekanizmasıyla kendilerini yok eder. Hassas bir şekilde düzenlenmiş apoptozdan ani ve rastlantısal nekrotik ölümüne kadar hücrelerin birbiriyle ilişkili olduğu mekanizmalar açısından hücre ölümünün birçok seçeneği vardır. Bu ölüm mekanizmalarını tanımlamak için özel yönergeler geliştirilmiştir¹. Hücre ölümü mekanizmalarını anlamak, yalnızca temel hücresel biyolojiye ışık tutmakla kalmaz aynı zamanda dejeneratif, bulaşıcı ve otoimmün hastalıklara karşı yeni terapötik stratejiler geliştirmeye de yardımcı olur²⁻⁴.

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, gelişim ve doku homeostazında kritik rol oynayan temel bir fizyolojik süreçtir⁵. Apoptozun ilerlemesi, belirli koşullar altında bir dizi sinyal dizisi tarafından düzenlenir. Kaspaz kaskat sistemi, hücre içi apoptotik uyarıların başlatılması, dönüştürülmesi ve çoğaltılmasında hayati rol oynar⁶.

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve inflamasyonda görevli korunmuş sistein proteaz ailesidir⁷. Bir sistein-aspartik asit proteazı olan kaspaz-3, doku farklılaşması, yenilenmesi ve nöral gelişimdeki rolleri nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. Kaspaz-3, hücre apoptozunda anahtar bir zimojendir ve apoptotik süreçte başlatıcı kaspazlar tarafından bölünene kadar aktive olmaz^{7, 8}. Kaspaz-3, tıbbi araştırmalarda değerli bir biyobelirteç olduğundan rekombinant tipinin üretimi, protein mühendisliği ve ilaç salım sistemlerinin tasarımı dahil olmak üzere birçok biyoteknolojik alanda apoptozla ilişkili bozuklukların tedavisinde, terapötik stratejilerde kullanılmaktadır⁹. Bugüne kadar kaspaz-3'ün artmış aktivitesi; küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, karaciğer kanserinde, intraserebral kanamalarda, akciğer adenokarsinomunda, şiddetli seyreden endometriyozis vakalarında, mesane kanserinde kötü prognozla ilişkilendirilmiştir¹⁰⁻¹⁵. Bu nedenle, kaspaz-3 düzeyleri, apoptoz görüntüleme, erken tümör tedavisi ve diğer hastalıkların izlem etkisinin değerlendirilmesi için büyük önem taşımaktadır¹⁶.

Biyosensörler; istenen analitleri tanımlamak için biyotanıma elemanı olarak antikorlar, enzimler, reseptörler, hücreler, mikroorganizmalar ve nükleik asitler gibi biyolojik molekülleri kullanan cihazlardır¹⁷. Led ve Clark'ın 1962 yılında ilk oksijen biyosensörünü geliştirmesinden bu yana biyosensörler, araştırmacıların ilgisini çekmeye

devam etmiştir¹⁸. Uzun zamandır tıp ve biyoteknoloji alanındaki araştırmacılar, hastalıkların tanı ve tedavisinde belirleyici moleküller olan biyobelirteçlere odaklanmıştır. Biyobelirteçleri düşük derişimlerde belirleme yeteneğine sahip olan biyosensörler, temel ve klinik bilimdeki ilerlemelere katkıda bulunmaktadır. Son derece hassas, kesin, kantitatif ölçülebilir biyobelirteçlerin saptanması, teknolojik olarak potansiyeli güçlü olan biyosensörlere bağlı olacaktır¹⁹⁻²¹. Temelde biyotanıma elemanı (biyoreseptör), dönüştürücü ve elektronik sistem olmak üzere üç bölümden oluşur. Biyotanıma elemanı biyosensörün temel bileşenidir ve istenen analitin özgül olarak tanınmasını sağlar. Antikor-antijen etkileşimlerine dayanan biyosensörler, immünolojik testlerin hassasiyetini ve özgüllüğünü fiziksel sinyal iletimi ile birleştiren immünosensörler olarak adlandırılır. Antikor-antijen arasındaki tepkimeden sonra kararlı bir kompleks oluşur ve bir dönüştürücü aracılığıyla sinyale çevrilir²². Bu sinyal üretimine bağlı olarak elektrokimyasal, optik ya da kütle değışiklikleri gibi farklı transdüksiyon sistemleri kullanılır²³. Elektrokimyasal immünosensörlerde antikor-antijen immün kompleksi oluşumu bir elektrik sinyaline dönüştürülür. Bu sinyal akım (amperometrik immünosensör), voltaj farkı (potansiyometrik immünosensör), direnç değışimi (kondüktometrik immünosensör) veya impedans değışimi (impedimetrik immün sensör) olarak ölçülür^{23, 24}. Aktif elektrot yüzeyinde bulunan hedef analitin tanınmasından sonra elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen tepkime, aktif tabakaya elektron aktarımı ile sonuçlanır ya da aktif tabakada bir potansiyel üretir. Elektron akış hızı analit derişimi ile doğru orantılıdır¹⁹.

Bu bilgiler çerçevesinde kaspaz-3'ün kantitatif ölçüm düzeyini daha hassas belirleyecek elektrokimyasal immünosensör tasarlamayı, bu tasarımı yaşama geçirecek karakterizasyon-optimizasyon çalışmalarının yapılmasını ve bu yöntemle elde edilecek sonuçların kaspaz-3 ölçümündeki klasik yöntemlerden biri olan ELISA ile karşılaştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİ

Vücuttaki birçok normal metabolik süreçte ile hücrel gelişimde rol alan apoptoz, hasarlı veya yaşlanmış hücreleri ve bağışıklık sistemi tarafından tanınmayan hücreleri ortadan kaldırmak gibi önemli işlevlere sahiptir. Bu süreç, hücre içinde belirli uyarılar aracılığıyla başlar. Kaspazlar hücre içinde çeşitli uyarıları algılayarak apoptozu başlatır, kontrol eder ve sürecin düzenli bir şekilde ilerlemesini sağlar. Kaspazların ölçümü, genellikle hücrel apoptoz süreçlerini incelemek veya belirli durumlarda kaspaz aktivitesini ölçmek için kullanılır. Florometrik, elektroforetik, mikroskopik ve spektrofotometrik yöntemlerin yanı sıra son zamanlarda biyosensörlerle de ölçüm alınmaktadır. Biyosensörler, biyolojik bir yanıtı dayalı olarak hedef bir bileşiği veya aktiviteyi ölçmek için kullanılan cihazlardır. Bu cihazlar kaspazların varlığını veya etkinliğini belirleyen, özgün uyarımlar oluşturan bir mekanizma kullanarak kaspaz seviyelerini ölçmektedir.

2.1. Kaspazlar

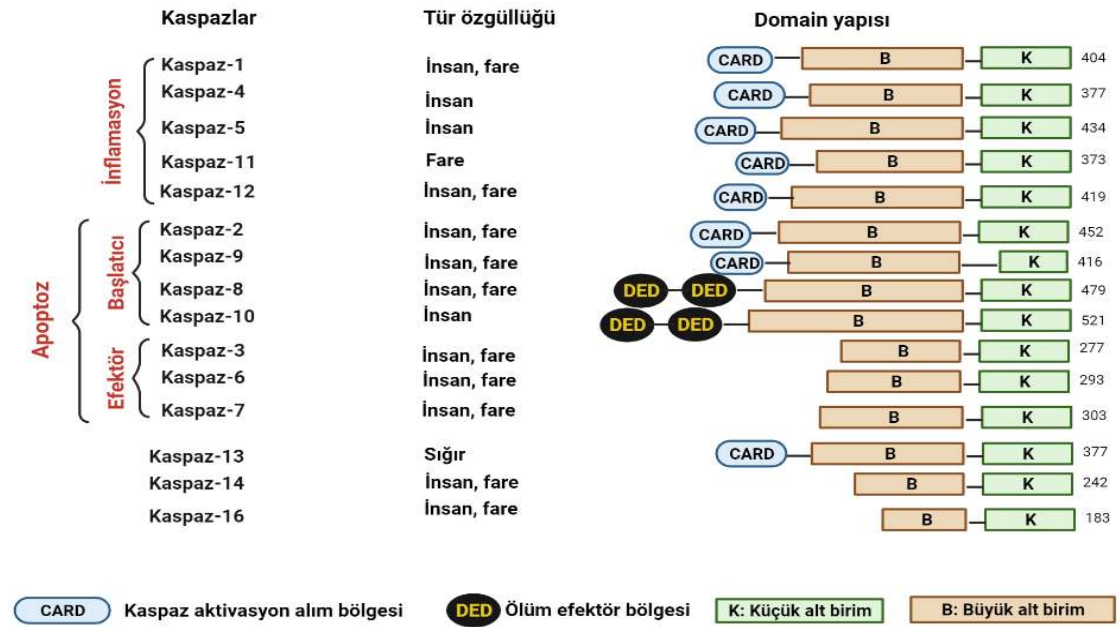
Kaspazlar “*C. elegans*, *Drosophila*”, fare ve insanlar dahil olmak üzere tüm çok hücrelilerde apoptoz süreci ile ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olan ve sitoplazmada bulunan sisteyinil-aspartat proteaz ailesidir. İlk olarak 1993 yılında Robert Horvitz tarafından keşfedilmiştir²⁵.

Kaspazlar homeostazın korunmasında, sağlıklı organ gelişiminde, inflamasyonun düzenlenmesinde ve hücre ölümünde anahtar rol oynayan endoproteaz enzimlerinin bir ailesidir. Apoptoz, vücutta homeostazı sürdürmek için dış veya iç sinyaller yoluyla tetiklenen programlanmış hücre ölümüdür. Piroptoz, inflamatuvar yollarda yer alan hücrel ölüm şeklidir. Hücre ölümünün piropitoz mekanizması, genellikle vücut enfeksiyonlara karşı savaşırken ortaya çıkmaktadır²⁶. Kaspazlar, apoptoz ve piropitoza yol açan kaskatların düzenlenmesine aktif olarak katılmaktadır²⁷. Kaspaz genlerindeki mutasyonlar kanser gelişimi, nörolojik işlev bozuklukları, kalp yetmezliği, diyabet ve diğer birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir²⁷.

2.1.1. Kaspazların sınıflandırılması

Kaspazlar, apoptoz veya piroptozdaki işlevlerine göre sınıflandırılmaktadır. Kaspaz-1, 4, 5, 11 ve 12 piroptozda yer alırken, kaspaz-2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 apoptoza katılmaktadır.

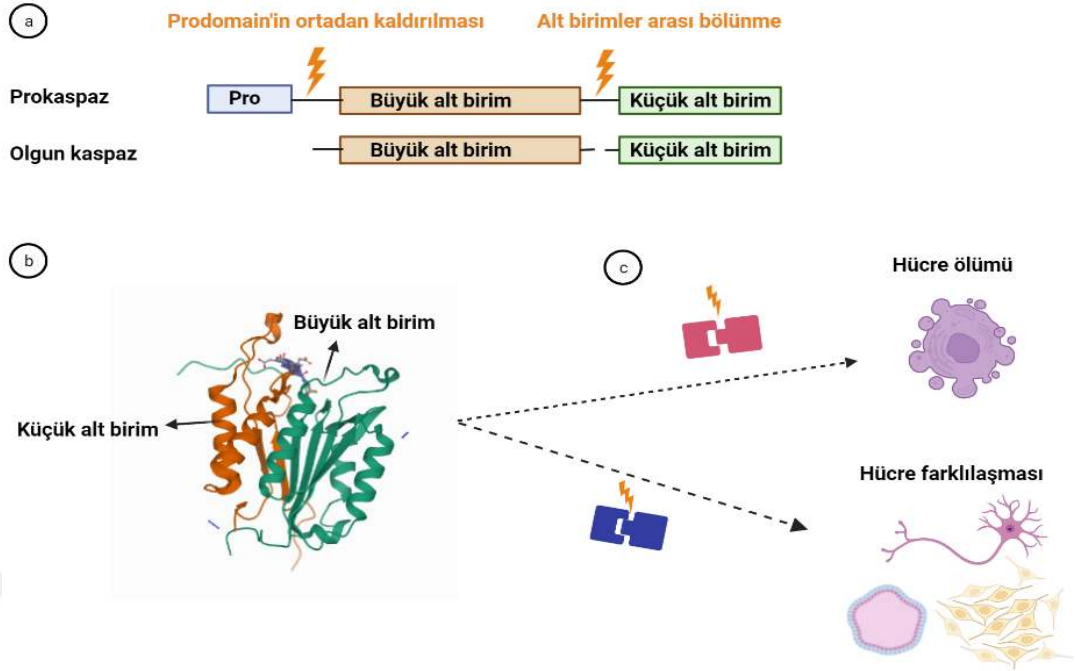
İnsan kaspaz ailesi dizi benzerliği ve biyolojik işleve dayalı olarak inflamatuvar, efektör ve başlatıcı kaspazlar olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadır. Kaspaz-1, 4, 5, 11 ve 12 inflamasyonda, kaspaz-2, 8, 9 ve 10 apoptozda başlatıcı ve kaspaz-3, 6 ve 7 ise apoptozda efektör (yürütücü) görev almaktadır. Kaspaz-13, 14 ve 16'nın işlevleri daha az kategorize edilmektedir (Şekil 2.1) ²⁸.



Şekil 2.1. Memeli kaspazlarının sınıflandırılması ve domain yapısı.

2.1.2. Kaspazların biyokimyası

Çoğu proteazda olduğu gibi, kaspazlar da hücre içinde prokaspaz olarak da bilinen aktif olmayan zimojenler olarak bulunmaktadır. Tüm olgun kaspazlar, kaspaz-3'ün kristal yapısı ile gösterildiği gibi, her biri bir aktif bölge içeren büyük (p20) ve küçük bir alt birimden (p10) oluşan bir dimerden oluşmaktadır. Prokaspazların büyük N-terminal ön alanları (pro), apoptotik uyarıların dönüştürülmesinde yer alan ölüm domaini üst ailesi olarak adlandırılan 80-100 kalıntı uzunluğunda yapısal motifler içermektedir²⁹.



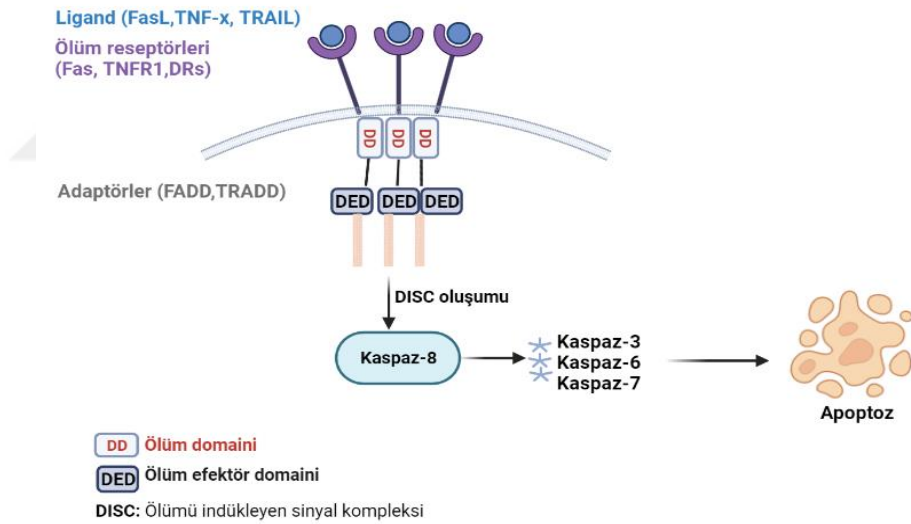
Şekil 2.2. Kaspazların aktivasyonu, yapısal özellikleri ve biyolojik işlevleri (a) Kaspaz aktivasyonu; prodomainin ortadan kaldırılması ve alt birimler arası bağlayıcının bölünmesi ile gerçekleşir. (b) Olgun kaspaz; aktif bölge, küçük alt birim (kırmızı) ve büyük alt birimin (yeşil) bağlandığı dimer yapıdan meydana gelir. Şekil Kaspaz-3'ün protein veri bankasından alınmış yapısal temsiliyi göstermektedir (PDB ID (Protein Data Bank Identification number) 4JQY)³⁰ (c) Kaspazların farklı substratlarının tanımlanması (kırmızı, mavi) hücre ölümü ve farklılaşması gibi süreçlerin anlaşılmasına ışık tutmaktadır.

Prokaspaz-3, -6 ve -7 gibi prokaspazlar, yapısal dimerler olarak ifade edilir ve başlatıcılar (kaspaz-2, 8, 9, 10) tarafından veya otoproteoliz ile alt birimler arası bağlayıcı bölge içinde bölünerek aktive olurlar. Aktivasyonun ardından kaspazlar, hedefler arasında 500 kattan fazla değişebilen oranlarda, birkaç ile birkaç yüz hedef arasında değişen, önceden tanımlanmış bir dizi substratı parçalamaya başlar²⁶. Aktivasyonun ardından kaspazlar, hedefler arasında 500 kattan fazla değişebilen hızlarda önceden tanımlanmış birkaç ile birkaç yüz arasında değişen bir dizi substratı parçalamaya başlar. Kaspaz aktivasyonu apoptoz ya da piroptoz yoluyla hücre ölümüne veya hücre farklılaşmasına yol açabilir (Şekil 2.2). Özgün fenotipik sonuçlar olasılıkla (i) hangi kaspazların aktive olduğu, (ii) hangi substratların parçalandığı, (iii) hücresel içerik ve (iv) hücredeki aktivasyon sonrası düzenleyici mekanizma içeren çok sayıda faktöre bağlıdır³¹.

2.1.3. Kaspazların fizyolojik rolleri ve önemi

Çoğu kaspazın fizyolojik rolleri türler arasında korunmaktadır. Son zamanlarda kaspaz aktivitesi çalışmaları ve hücre ölümü yokluğunda kaspaz substratlarının tanımlanması, hücrel tepkilerde kaspazların işlevlerinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur³².

Apoptotik yolda kaspaz-2, 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlar iken kaspaz-3, 6 ve 7 efektör kaspazlar olarak işlev görmektedir. Kaspaz-8, TNF (Tumor necrosis factor) ailesi üyesi tarafından başlatılan ölüm reseptörü aracılı apoptozun anahtar başlatıcısıdır. TNF ailesinin ölüm reseptörlerini aktive etmesinden sonra kaspaz-8, Fas bağlantılı ölüm alanı (FADD, FAS-Associated Death Domain) adaptör proteinine bağlanma yoluyla ölümü indükleyen sinyal kompleksine (DISC, Death-Inducing Signaling Complex) alınır. Bu alım, kaspaz-8 ve bunu takiben efektör kaspazları aktifleştirerek hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (Şekil 2.3)³³.



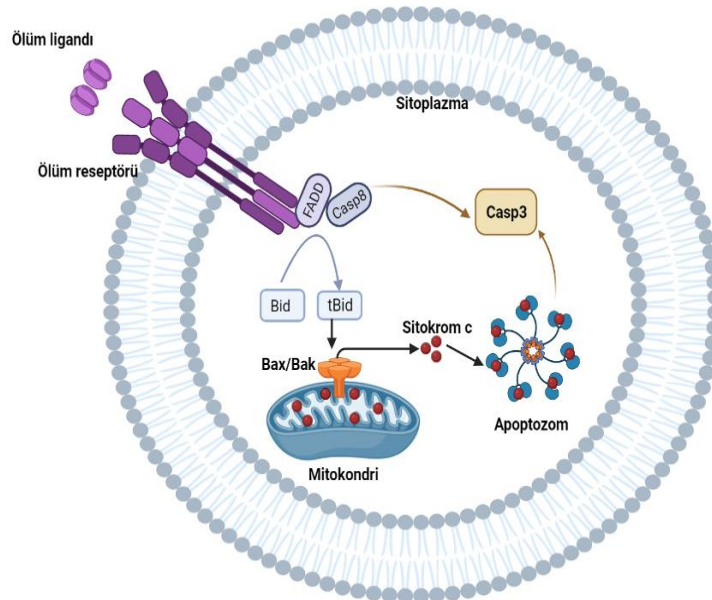
Şekil 2.3. Apoptotik yolda kaspaz-8, 3, 6, 7'nin rolü.

Kaspaz-3, -6 ve -7, apoptotik hücrelerde ana hücrel substratları parçalayan önemli efektör kaspazlardır. Bunlar, içsel veya dışsal yollardan gelen sinyalleri arttırmakla birlikte substrat özgüllükleri değişkenlik göstermektedir³⁴. Kaspazların apoptotik olmayan işlevleri, hem katalitik alanları tarafından uygulanan proteolizi hem de prodomainleri tarafından uygulanan proteolitik olmayan işlevleri içerir²⁵.

2.1.3.1. Kaspaz-3 hakkında genel bilgi

Kaspaz-3 (CPP32, CPP32B, apopain, YAMA ya da kısa adıyla casp3), aspartata özgü sisteinil proteaz ailesinin üyesi bir endoproteaz olup, 12 kDa ve 17 kDa'lık iki alt birimden oluşan küçük bir proteindir. Efektör kaspaz-3 başlangıçta olgunlaşmamış bir zimojen (prokaspaz-3) olarak sentezlenir. Prokaspaz-3, kararlı bir dimerdir; her monomer kısa bir N-terminal prodomainden (<30 amino asit uzunluğunda), büyük bir alt birimden ve alt birimler arası bir bağlayıcıyla birbirine bağlanan küçük bir alt birimden oluşur. Kaspaz-3, işlevsel biçiminde (yani tetramerik yapıda) iki özdeş aktif bölgeye sahiptir. Kısa aspartat-glutamat-valin-aspartat (D-E-V-D) tetrapeptid dizilimli her aktif bölge, aspartat kalıntısından sonra bölgedeki substratları özgül olarak parçalayabilen, korunmuş bir katalitik histidin-sistein motifi içerir³⁵.

Kaspaz-3, apoptotik hücrelerde hem dışsal hem de içsel yollar tarafından aktive edilen apoptozun önemli bir aracısı olarak tanımlanmıştır. Birçok protein tarafından düzenlenen içsel mitokondriyal yoldaki hücre ölüm sinyalleri, apoptozom yapısındaki apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'i (Apaf-1) ve başlatıcı kaspazları aktive eder. Septamerik apoptozomun yapısal elemanı olan Apaf-1'in aktivasyonunu takiben mitokondriden sitokrom c salınımına yol açar. Apoptozoma bağlı kaspazlar parçalanarak kaspaz-3'ü aktive eder (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Apoptozda dışsal (ölüm ligandı) ve içsel (mitokondriyal) yollar.

Kaspaz-3'ün doku farklılaşması, rejenerasyon ve nöral gelişimde yer almak gibi apoptotik olmayan birçok işlevi de bulunmaktadır. Hücreler içindeki birincil rollerine ek olarak, kaspaz-3 önemli klinik olaylarda da görev almaktadır. Kaspaz-3'ün olağandışı aktivasyonu, programlanmış hücre ölümünü uyarmak yerine tümör oluşumuna yol açabilir. Ayrıca, kaspaz-3'ün hiperaktivasyonu ve ardından aşırı hücre ölümü, Huntington hastalığı (HD) ve Alzheimer hastalığı (AD) gibi nörodejeneratif hastalıkları teşvik edebilir³⁶.

Birçok kaspaz türü keşfedilmiş olmasına rağmen, Kaspaz-3 kapsamlı şekilde çalışılan ve apoptozun belirlenmesi/görüntülemesi için çekici ve net bir hedef haline gelen tek türdür. Kaspaz-3 aktive olduğunda apoptotik uyarıları tetikleyerek geri dönüşümsüz apoptoz kaskadına yol açar. Apoptozda yeri doldurulamaz bir yönetici protein olarak Kaspaz-3, Kaspaz-8, 9 ve 10'un etkisi altında kendi kendine aktive olur ve parçalanır. Kaspaz-3'ün aktivitesi, hücre apoptozunu zamanında izlemenin dinamik sürecini yansıtabilmektedir³⁷. Özellikle, apoptoz sürecinin değerlendirilmesi, ilaçların etkinliğini veya tümör tedavisinin etkinliğini yansıtabilir, ardından kanser hastalarının sağkalım oranını belirleyebilir. Dahası, kaspaz-3'ü belirleyen sistemler apoptozu izlemek, klinik ilaçların terapötik etkisini değerlendirmek, entegre tanı ve tedavinin etkisini belirlemek ve diğer biyolojik olarak aktif maddeler ile apoptoz arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için kullanılabilir³⁸. Kaspaz-3 hücrenin doğal yaşam döngüsü ve hücrel homeostazın korunmasında görev almanın yanı sıra immün işlev, hücrel proliferasyon, hücrel farklılaşma gibi birçok işleve sahiptir³⁹.

2.1.3.2. İnsan hastalıklarında kaspaz-3'ün önemi

2.1.3.2.1. Kanser ve kaspaz-3

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve hücre bölünmesi ile apoptoz arasındaki dengenin kaybolduğu bir durumdur. Kaspaz-3 proteini bölünür ve kaspaz-8 ile kaspaz-10 kendi kendine parçalanır. Kaspaz-3'ün ekspresyonunda regülasyon basamağının bozulması apoptotik akışta kaspaz-3'ün eksikliği ve karsinogenez ile sonuçlanabilir. Kötü huylu prostat vakalarında kaspaz-3'ün mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonunu inceleyen bir çalışmada kaspaz-3 immünoreaktivitesinin olmadığını bulmuştur.

Tümör oluşumunda apoptoz kaybında rol oynayan hücreler, hastalığın ilerlemesinde öneme sahip olabilir. Aynı zamanda bu dokularda kaspaz-3 ekspresyonunun patolojik derecelendirme, (Gleason skorları), klinik evreleme ile ilgili gelecekte tanı ve tedavi için yeni bir hedef olabileceği önerilmiştir⁴⁰.

Tek ve çok değişkenli analizlerde, düşük oranda parçalanmış kaspaz-3 ekspresyonuna sahip hastalar mide, yumurtalık, serviks ve kolorektal kanserlerde, yüksek oranda parçalanmış kaspaz-3 ekspresyonu olanlara kıyasla daha kısa sağkalım süresine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle kaspaz-3 bu dört kanser türünün potansiyel bir prognoz faktörü olarak görülmektedir^{40, 41}. Ayrıca özofagus, mide ve kolorektal kanserli 2000'den fazla hasta üzerinde yapılan bir meta-analiz ve sistematik derleme, düşük kaspaz-3 ekspresyonun bu 3 kanser türünde de prognostik faktör olabileceğini bildirmektedir⁴².

2.1.3.2.2. Nörodejeneratif hastalıklar ve kaspaz-3

Alzheimer hastalığı, kısa süreli hafızadaki bozukluklar ve ardından demans ile karakterize en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Nöronal ölümün kesin moleküler mekanizmaları belirsiz olmasına rağmen, apoptozun bu hastalık ile ilişkili nöronal ölümün ana nedeni olduğu bilinmektedir. Amiloid beta (A β), apoptozun uyarılmasında ve hastalığın patogenezinde önemli bir role sahiptir. A β birikimi mitokondriyal strese, sitokrom c salınımına ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur. Alzheimer hastalığında beyinde kaspaz-3 seviyelerinin, aynı yaştaki sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir⁴³.

Huntington hastalığı, Huntingtin (HTT) gen mutasyonunun neden olduğu otozomal dominant nörodejeneratif bir hastalıktır ve klinik olarak istemsiz hareketler, kişilik değişiklikleri ve kademeli demans ile karakterizedir. Sinaptik plastisitedeki kusurlar ve bilişsel bozukluklar, bu hastalığın başlangıcındaki erken sonuçlar olarak kabul edilir. Huntington hastalığında da nöronal ölümün kesin patojenik mekanizmaları hâlâ belirsizdir. Ancak bazı apoptotik uyarıların patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Kaspaz-3, Huntington hastalarına yardımcı olmak için potansiyel bir tanı belirteci ve terapötik hedef olduğu düşünülen uyarıcı faktördür. Hem kaspaz-6 hem de kaspaz-3, toksik ürünler üretmek için HTT geni üzerinde etki eder. Nörodejeneratif

hastalıkların çoğunun, kaspaz-3'ün anahtar araçları değiştirerek nöronal disfonksiyona katkıda bulunduğu öne sürülmüştür⁴⁴.

2.1.3.2.3. Kardiyovasküler hastalıklar ve kaspaz-3

Kaspaz-3 hücre apoptozu, hücre oluşumu ve gelişim sırasında kas farklılaşması ve olgunlaşmasını modüle eden kardiyak miyositlerin apoptotik sinyallerinde anahtar bir düzenleyicidir. Apoptoz aktivasyonu gerçekleşmiş olsa da hücreler miyokarda uzun süre kalmaktadır. Fakat kardiyomiyopatide, kardiyomiyositlerin çoğunda çekirdekte herhangi bir değişiklik olmaksızın yüksek oranda kaspaz-3 aktive olur. Bununla birlikte, kaspaz-3 aktivasyonu, miyofibriler proteinlerin (α -aktin, miyozin ağır-hafif zincir, tropomiyozin, kardiyak troponinler ((T, I, C) ve trimerik troponin kompleksi) parçalanmasına yol açarak kontraktıl disfonksiyona neden olur⁴⁵.

Kalp yetmezliği genellikle kardiyak miyositlerin progresif azalması ve kontraktıl disfonksiyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Apoptozun, kalp yetmezliğinin ilerlemesi sırasında sorumlu olduğu hücre ölüm türü olduğu düşünülmektedir. Kalp yetmezliği sırasında apoptozu sonlandırmak için, karbobenzoksi-valil-alanilaspartil-[O-metil]-florometilketon (Z VAD-FMK) ve N-Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (DEVD-CHO) gibi kaspaz-3 inhibitörlerinin kullanılması umut verici ajan olarak bildirilmiştir⁴⁶.

2.1.3.2.4. İnflamasyon ve Kaspaz-3

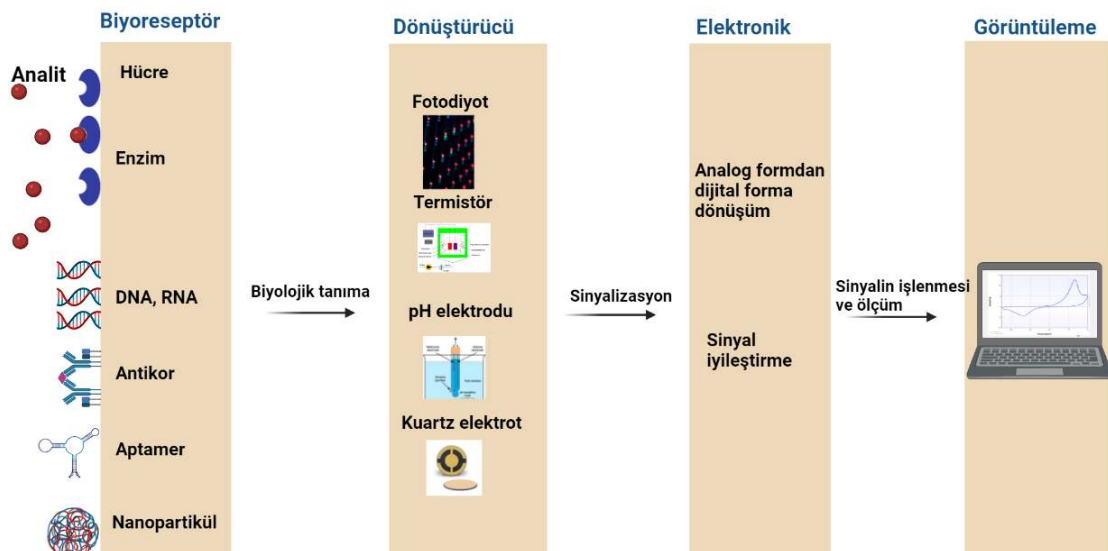
Kaspaz-3, IL-6 gibi sitokinlerin parçalanması ve TNF üretiminin artması yoluyla inflamasyonda yüksek oranda eksprese edilmektedir. Çalışmalar, kaspaz-3'ün 24 kDa alt biriminin böbrek işlevi, tübülointerstisyel hasar ve böbrek fibrozu üzerindeki etkilerle birlikte diğer kaspazlara kıyasla iskemi/reperfüzyon hasta gruplarında önemli ölçüde yükseldiğini göstermiştir. Bu, kaspaz-3'ün uzun süreli iskemi/reperfüzyon, böbrek hasarında kilit bir faktör olan ve çeşitli immünosupresanların efektörü olan inflamasyonun ilerlemesinde rol aldığını göstermektedir⁴⁷.

2.2. Biyosensörler

Biyosensörlerin geçmişi, M. Cremer'in bir sıvıdaki asit derişiminin cam bir zarın zıt taraflarında bulunan sıvı kısımları arasında ortaya çıkan elektrik potansiyeli ile orantılı olduğunu gösterdiği 1906 yılına kadar uzanmaktadır⁴⁸. 1909 ve 1922 yılları

arasında, Griffin ve Nelson ilk olarak invertaz enziminin alüminyum hidroksit ve kömür üzerinde immobilizasyonunu gösterdi⁴⁹. İlk gerçek biyosensör ise, oksijen tespiti için 1956'da Leland C. Clark tarafından geliştirildi. 1962'de Leland Clark tarafından glukozun saptanması için bir amperometrik enzim elektrotunun gösterilmesini, 1969'da Guilbault ve Montalvo tarafından üre saptamak için ilk potansiyometrik biyosensörün keşfi izledi⁵⁰. Sonunda 1975'te ilk ticari biyosensör, "Yellow Spring Instruments" (YSI) tarafından geliştirildi. i-STAT sensörünün geliştirilmesinden bu yana, biyosensör alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir⁵¹. Bu alan artık temel bilimlerle mikro/nano-teknoloji, elektronik ve uygulamalı tıbbın temelleri arasında köprü kuran multidisipliner bir araştırma alanıdır⁵². "Web of Science" veritabanında yapılan taramada 2005'ten 2023'e kadar "biyosensörler" konusunda 100.000'den fazla yayın gözlemlendi.

Biyosensörler, tepkimedeki bir analitin derişimiyle orantılı olarak üretilen biyolojik ya da kimyasal sinyalleri ölçen bir cihazdır. Bu cihazlar hastalık izleminde, ilaç keşfinde ve vücut sıvılarında (kan, idrar, tükürük, ter) hastalığa neden olan mikroorganizmaların veya diğer belirteçlerin belirlenmesi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır^{53, 54}. Tipik bir biyosensör; analit, biyoreseptör, dönüştürücü, elektronik ve görüntüleme bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Biyosensörlerin şematik gösterimi.

- **Analit:** Tespit edilmek istenen maddedir. Örneğin glukoz miktarını ölçmek için tasarlanmış bir biyosensörde analit glukozdur⁵⁵.
- **Biyoreseptör:** Analite özgün olan moleküllerdir. Enzimler, hücreler, aptamerler, DNA ve antikorlar, biyoreseptörlere bazı örneklerdir. Biyoreseptörün analit ile etkileşimi sonucu sinyal oluşturma süreci (ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişimi vb.) biyolojik tanıma olarak adlandırılmaktadır⁵⁶.
- **Dönüştürücü:** Enerji biçimlerinin birbirine dönüşümünü sağlayan bileşendir. Bir biyosensörde dönüştürücünün rolü, biyolojik tanımayı ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir. Bu enerji dönüşüm süreci sinyalizasyon olarak bilinmektedir. Çoğu dönüştürücü, genellikle analit-biyoreseptör etkileşimlerinin miktarıyla orantılı olan optik veya elektriksel sinyaller üretmektedir⁵⁷.
- **Elektronik:** Dönüştürülen sinyali işleyen ve görüntüleme için gerekli olan biyosensörün bir parçasıdır. Amplifikasyon ve sinyallerin analogdan sayısal biçime dönüştürülmesi gibi “sinyal koşullandırmayı (bir sinyali, şeklini veya modunu işleyerek bir cihaz ile uyumlu hale getirme durumunu) ” gerçekleştiren karmaşık elektronik devrelerden oluşmaktadır. İşlenen sinyaller daha sonra biyosensörün görüntüleme birimi tarafından nicel hale getirilmektedir⁵⁷.
- **Görüntüleme:** Bir bilgisayar ekranı ya da kullanıcı tarafından anlaşılabilir sayılar ya da eğriler oluşturan ve doğrudan kullanıcı yorumlama sisteminden oluşan bileşendir. Bu bölüm genellikle, biyosensörün sonuçlarını kullanıcı dostu şekilde üreten bir donanım ve yazılım bileşiminden oluşmaktadır. Ekrandaki çıkış sinyali, son kullanıcının gereksinimlerine bağlı olarak sayısal, grafik, tablo ya da görüntü olabilir⁵⁸.

2.2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörlerin sınıflandırılması çeşitli ve çok disiplinli bir alan olup çeşitli kriterler söz konusu olup genellikle biyoreseptörlere ve dönüştürücü tiplerine göre sınıflandırılmaktadır.

2.2.1.1. Dönüştürücüye göre sınıflandırma

Çalışma prensiplerine göre dönüştürücüler genel olarak optik, termal, elektronik gravimetrik ve elektrokimyasal olarak sınıflandırılır.

2.2.1.1.1. Optik biyosensörler

Optik dönüştürücü sistemle bütünleşmiş bir biyolojik tanıma elemanından oluşan analitik cihazlardır. Optik biyosensörlerde transdüksiyon işlemi, tanıma elemanları (enzim, antikor, aptamer vb) tarafından oluşturulan fiziksel veya kimyasal değişikliklere yanıt olarak soğurma, yansıma, kırılma, genlik, frekans veya ışık polarizasyonunda değişikliğe neden olur. En yaygın kullanılan optik biyosensörlere flüoresan temelli, kemilüminesan temelli ve optik fiber temelli sensörler örnek verilebilir⁴⁹.

2.2.1.1.2. Termal biyosensörler

Biyolojik tepkimelerin (ekzotermik/endotermik) temel özelliklerinden yani tepkime sırasında emilen veya salınan ısı enerjisinin ölçümünden yararlanılır. Bu sistemlerde biyoreseptör olarak enzimler tercih edilir⁴⁹.

2.2.1.1.3. Elektronik biyosensörler

Bu biyosensörlerin çalışma prensibi, alan etkili transistörlere (Field-effect transistors, FETs) dayanır. FET, bir elektrik alan kullanarak içinden geçen akımı düzenleyen üç uçlu (kaynak, kapı ve boşaltım uçları) bir cihazdır. İmpedanslarının kapı uçları aracılığıyla değiştiği yarı iletken üzerindeki kaynak ve boşaltım uçları arasında çalışırlar. Son zamanlarda FET tabanlı dönüştürücüler, analit ve FET yüzeyi arasındaki etkileşimleri doğrudan dönüştürme kapasiteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Bir biyomolekül biyoreseptör yüzeyine bağlanırsa, yüzey potansiyelini değiştirir. Kanal genişliğindeki eşdeğer değişim, kaynak ve boşaltma (drenaj) uçları (terminalleri) arasındaki akımı değiştirir. Bu yarı iletken tabanlı dönüştürücüleri kullanan biyosensörlerdeki yüksek impedans, analit ve biyoreseptör tepkimelerinden kaynaklanan kimyasal değişiklikleri tespit etmede kullanılır⁴⁹.

2.2.1.1.4. Gravimetrik biyosensörler

Yüzeydeki protein veya antikor gibi sabitlenmiş materyalin kütlesindeki küçük değişikliklere yanıt vererek ölçülebilir sinyal üreten kütle temelli biyosensörlerdir⁴⁹.

2.2.1.1.5. Elektrokimyasal biyosensörler

Analit ve dönüştürücünün elektrokimyasal özelliklerine dayanan çalışma prensibi ile yaygın olarak araştırılan ve kullanılan biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler yüksek hassasiyet, seçicilik ve algılama yeteneği sergilemektedir⁵⁹. Bu biyosensörde, biyoreseptör ve analit arasındaki dönüştürücü yüzeyinde voltaj, akım, impedans ve kapasitans açısından saptanabilir elektrokimyasal sinyaller üreten bir tepkime meydana gelmektedir. İletim ilkesine dayalı olarak elektrokimyasal biyosensörler; potansiyometrik, impedimetrik, kondüktometrik, voltametrik ve amperometrik olarak sınıflandırılmaktadır⁶⁰.

2.2.1.1.5.1. Potansiyometrik biyosensörler

Sıfır akım altında referans elektrotu göre çalışma elektrotunda analit ve biyoreseptör etkileşimi nedeniyle biriken yükü yani bu elektrotlar arasındaki potansiyel farkı ölçmektedir. Bir biyokimyasal tepkimeyi potansiyel bir sinyale dönüştürmek için iyon seçici elektrotlar ve iyon duyarlı alan etkili transistörler kullanılmaktadır⁶¹.

2.2.1.1.5.2. İmpedimetrik biyosensörler

Küçük bir sinüzoidal uyarma sinyali uygulandığında elektrot/elektrolit arayüzünde üretilen elektrik impedansını ölçmektedir. Sensör elektrotunda düşük genlikli AC voltajının uygulanmasını içerir ve ardından faz içi/dışı akım yanıtı bir impedans analizörü kullanılarak frekansın bir işlevi olarak ölçülmektedir⁶².

2.2.1.1.5.3. Kondüktometrik biyosensörler

Bir elektrokimyasal tepkime nedeniyle elektron çifti arasındaki iletkenlik değişimini nicel hale getirmektedir. Kondüktometrik ve impedimetrik biyosensörler genellikle canlı biyolojik sistemlerdeki metabolik süreçleri izlemek için kullanılmaktadır⁶³.

2.2.1.1.5.4. Voltametrik biyosensörler

Uygulanan potansiyelin kontrollü değişimi sırasında akımı ölçerek analiti tespit etmektedir. Bu sensörlerin üstünlüğü, son derece hassas ölçümleri ve birden fazla analitin aynı anda saptanmasını içermektedir⁶⁴.

2.2.1.1.5.5. Amperometrik biyosensörler

İki ya da üç elektrotlu konfigürasyonlarda çalışır. Bu sensörler, referans elektroda karşı çalışma elektroduna sabit bir potansiyel uygulandığında elektrokimyasal oksidasyon veya elektroaktif türlerin azalması nedeniyle üretilen akımı ölçmektedir. Çalışma elektrodunun yüzeyinde üretilen akım, çözeltide bulunan analitin derişimi ile orantılıdır. Potansiyometrik biyosensörlerle karşılaştırıldığında bu yöntem hassas, hızlı, kesin ve doğrusal tepkiye izin verir bu da onu seri üretim için daha uygun hale getirir. Ancak zayıf seçicilik ve diğer elektroaktif maddelerden kaynaklanan parazitler bu sensörlerin kısıtlılığıdır⁶⁵.

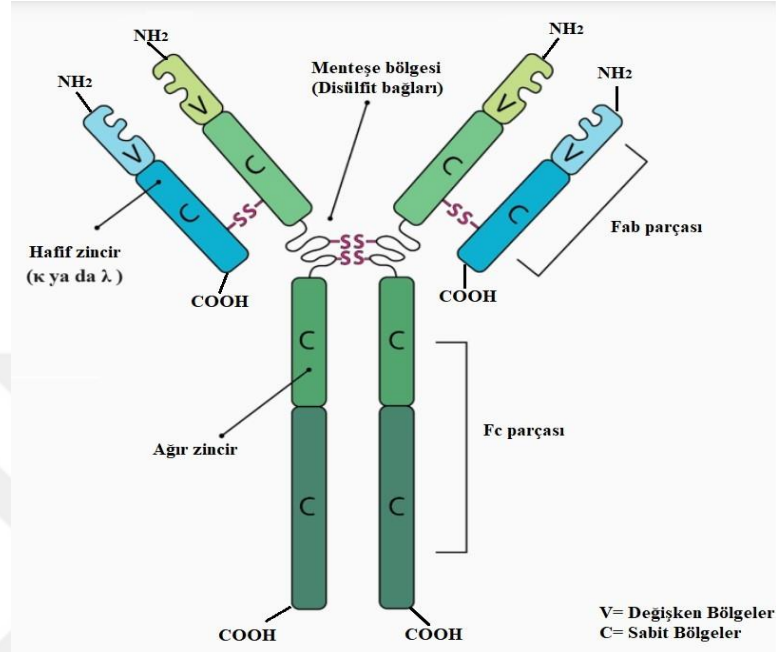
2.2.1.1.5.5.1. Antikor temelli amperometrik biyosensörler

Geleneksel *in vitro* tanılama zaman alıcıdır ve merkezi laboratuvarlar deneyimli personel ve büyük ekipman gerektirir. Biyosensör teknolojilerindeki son gelişmeler, zaman, doğruluk ve maliyet açısından geleneksel standartları karşılayan/aşan hasta başı testleri uygulama potansiyeline sahiptir. Doğadaki en zarif tasarlanmış ve işlenmiş moleküller arasında yer alan antikorlar, mükemmel hedef özgüllükleri ve afiniteleri nedeniyle bir dizi sensör cihazında hayati bir rol oynamaktadır⁶⁶.

Antikorlar ya da immünglobulinler, bağışıklık sisteminin savunma mekanizmalarında yer alan yüksek oranda çözünür serum glikoproteinleridir. Ağır zincir sabit bölge dizilerine bağlı olarak beş sınıfa ayrılabilirler: IgM, IgD, IgG, IgE ve IgA. Bir antikorun temel yapısı Şekil 2.6'da özetlenmiştir ve iki ayrı yapıtaşına bölünebilir; antijen bağlayıcı parça (Fab) ve sabit parça (Fc)⁶⁷. Antikorlar iki ağır ve iki hafif zincirden oluşur. Antikorlarda kappa (κ) ve lambda (λ) olarak adlandırılan iki tip hafif zincir bulunur. Hafif zincirin her birinin amino ucunda antijen bağlanma bölgesine katkıda bulunan bir değişken (V) alan ve izotipi belirleyen sabit (C) alan vardır. Her değişken ya da sabit alan yaklaşık 110-130 amino asitten oluşur. Ağır zincirin izotipi, antikorun işlevsel özelliklerini belirler. Y şeklindeki antikorun gövdesi veya Fc parçası, ağır zincirlerin karboksi terminal alanlarından oluşur. Bu parça ve menteşe bölgeleri farklı izotiplerdeki antikorlarda farklılık gösterir dolayısıyla antikorların işlevsel özelliklerini de belirler⁶⁸.

IgG, tüm immünoglobulin izotipleri arasında en uzun serum yarı ömrüne sahiptir. IgG ayrıca ağır zincir sabit bölgesindeki yapısal, antijenik ve işlevsel

farklılıklara dayalı olarak dört alt sınıfa ayrılır. IgG alt sınıfları farklı işlevsel aktiviteler sergiler. Örneğin, IgG1 ve IgG3 antikorları genellikle protein antijenlerine yanıt olarak uyarılırken, IgG2 ve IgG4, polisakkarit antijenleri ile ilişkilidir⁶⁹.



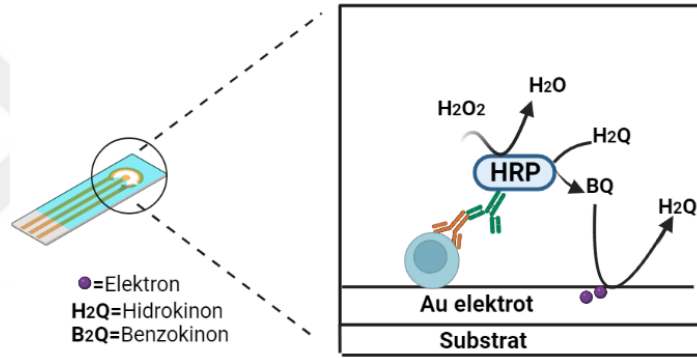
Şekil 2.6. Antikoru genel yapısı.

Elektrokimyasal immünosensörlerde antijen-antikor kompleksinin oluşumu ile elektrik sinyaline dönüştürülen bu sinyaller, bir elektrik akımı (amperometrik immünosensörler), bir voltaj farkı (potansiyometrik immünosensörler) ve bir direnç değişikliği (iletkenlik immünosensörler) olmak üzere 3 farklı şekilde oluşabilir⁷⁰.

Amperometrik immünosensörlerin en yaygın türü, bir redoks enzimi (enzimatik etiket) tarafından üretilen redoks türlerinin ölçülebilir bir akıma dönüştürüldüğü, elektrokimyasal algılamalı ELISA testleri gibi düşünülebilir. Testin amacı, antijen-antikor komplekslerinin oluşumu yoluyla serumda antikor varlığını tespit etmektir⁷¹.

Olağan bir strateji; antijeni örneğin amino veya karboksilik asit tiyolleri gibi yeterli moleküler bağlayıcılar yoluyla altın gibi iletken bir elektrotun yüzeyi üzerinde immobilize etmektir. Tiyoller, altın yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır, kendiliğinden oluşan bir tek tabaka oluşturur ve proteinlerin kovalent olarak bağlanabileceği küçük bir hidrokarbon zincirin sonunda amino ya da karboksilik gruplar sağlar. Pozitif bir serumla inkübasyon süresi (tipik olarak 30 ila 60 dakika) sırasında antijen-antikor kompleksleri

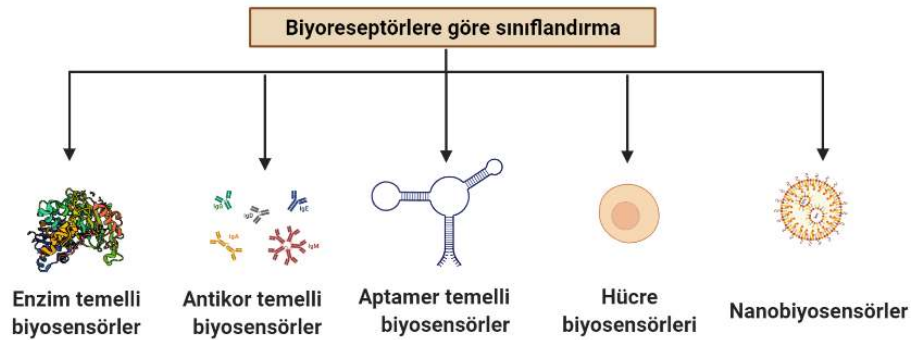
oluşur. Durulamadan sonra, yaban turpu peroksidazı (HRP) gibi bir redoks enzimi ile etiketlenmiş anti-Ig antikorları içeren bir çözelti ile ikinci bir inkübasyon gerçekleştirilir. Antijen-antikor etiketli antikor kompleksinin oluşumu, enzim substratı ve uygun bir redoks aracısının (kofaktör) eklenmesinden sonra saptanır. HRP varlığında substrat hidrojen peroksittir ve redoks aracısı uygun bir elektron donörü (hidrokinon gibi indirgenmiş bir tür) olmalıdır. HRP enzimatik aktivitesi, indirgenmiş herhangi bir redoks aracısını (hidrokinon vb), elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak daha da indirgenen oksitlenmiş forma (benzokinon vb) dönüştürür (Şekil 2.7). Böylece, kararlı durum akımı oluşturulur. Negatif serumlar için, ilk etapta antijen-antikor-enzim etiketli antikor kompleksleri oluşmaz böylece ölçülen akım değerleri önemli ölçüde daha düşüktür. Bu nedenle yüksek akım değerleri olumlu bir sonucun göstergesidir^{72, 73}.



Şekil 2.7. Tek kullanımlık Au elektrot üzerindeki HRP ve benzokinon etkileşimi.

2.2.1.2. Biyoreseptörlere göre sınıflandırma

Biyoreseptörlere göre biyosensörler; enzimatik, antikor temelli, aptamer temelli, hücre biyosensörleri ve nanobiyosensörler olarak 5'e ayrılmaktadır⁵⁸ (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması.

2.2.1.2.1. Enzim temelli biyosensörler

Enzimler, biyolojik tepkime hızını arttırmada etkili olan yaygın biyokatalizörlerdir. Enzim temelli biyosensörün çalışma ilkesi hedef analitin belirlenmesi için katalitik tepkimeye ve bağlanma yeteneklerine bağlıdır⁷⁴. Analit tanıma sürecinde genel mekanizmalar şu şekildedir: (i) Analit ve enzim arasındaki etkileşim sonucu analitin enzim tarafından katalitik dönüşümünün ölçülmesi, (ii) analit tarafından inhibe edilen ya da aktive edilen enzimin oluşturduğu analit derişimi/enzimatik ürün oluşumunun artması/azalması, (iii) enzim özelliklerinin değişiminin izlenmesidir. Enzim temelli biyosensörlerin var olan geçmişi sayesinde, enzim özgünlüğü temelinde çeşitli biyosensörler üretilebilir^{75, 76}. Bununla birlikte, enzim yapısı son derece hassastır; bu da duyarlılığını, kararlılığını ve uyarlanabilirliğini pahalı ve karmaşık hale getirmektedir⁷⁷.

2.2.1.2.2. Antikor temelli biyosensörler

Antikorlar, geniş uygulama alanları ve güçlü antijen-antikor etkileşimleri nedeniyle yirmi yıldan beri kullanılan afinite biyotanıma elemanlarıdır. Antikorlar, disülfid bağlarıyla birbirine bağlanan iki ağır ve iki hafif polipeptit zincirden oluşan “Y” şeklinde immünoglobulin (Ig) yapısına sahiptir⁷⁸. Ağır zincirlerdeki farklılıklara dayalı olarak beş antikor sınıfı tanımlanmıştır: IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE. Ligand olarak gömülü bir antikora sahip olan ya da antikor-antijen etkileşimi üzerinde işlev gören biyosensörlere immünosensörler denir. İmmünosensörler (i) etiketsiz ya da (ii) etiketli olarak sınıflandırılmaktadır. Etiketsiz immünosensörler, kompleks oluşumunun neden olduğu fiziksel değişiklikler ile antijen-antikor kompleksini özel olarak belirlemek için oluşturulur. Etiketli immünosensörde ise hassas olarak saptanabilir bir etiket eklenir. Antijen-antikor kompleksi, etiketlenerek ölçümü yoluyla hassas bir şekilde değerlendirilmektedir⁷⁹.

2.2.1.2.3. Aptamer temelli biyosensörler

Aptamerler, hedef moleküllere seçici olarak bağlanan, iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) yapılara katlanabilen yapay tek sarmallı nükleik asitlerdir. 2B ya da 3B yapılarda, daha yüksek yüzey yoğunluğu ve daha az uzaysal engelleme nedeniyle hedefler yüksek bağlanma yeteneğine sahiptir⁸⁰. Aptamerlerin nükleik asit karakteri

nedeniyle, geniş bir sıcaklık ve saklama koşulu aralığında yapısal ve işlevsel olarak kararlıdır. Biyolojik sistemlerin üretilmesini gerektiren antikorların aksine aptamerler kimyasal olarak sentezlenebilir, pH 5-8 aralığında kararlıdır ve belirli sıcaklıklarda yeniden katlanma yeteneğine sahiptir. Aptamerlerin bir başka yararı, hedef molekül için saptama ölçütlerine göre kimyasal olarak modifiye edilebilmeleridir⁸¹.

2.2.1.2.4. Hücre temelli biyosensörler

Tüm hücre temelli biyosensörler potansiyel biyotanıma elemanlarına sahip oldukları için bakteri, mantar, mayalar, küfler, algler, protozoa ya da virüsler kullanır. Kendilerini kopyalayıp ekstraksiyon ve saflaştırmaya gereksinim duymadan, antikorlar gibi tanıma öğeleri üretebilirler. Hayvan ya da bitki hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre temelli biyosensörlerin kullanımı daha kolaydır⁸². Hücreler çok çeşitli analitler ile etkileşime girip dönüştürücünün kaydedebileceği elektrokimyasal yanıtı gösterir ve iletir. İyi duyarlılıkları, yüksek seçicilikleri ve algılama yetenekleri nedeniyle bu biyosensörler, çevresel izleme, gıda analizi, farmakoloji, ağır metaller, pestisitler, organik kirleticilerin tespiti ve ilaç taramasında başarıyla kullanılmaktadır⁸³.

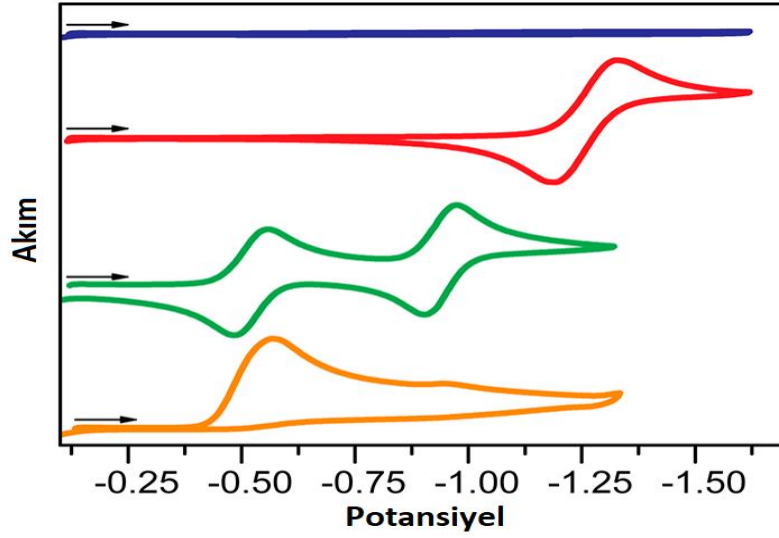
2.2.1.2.5. Nanobiyosensörler

Nanomateriyaller son zamanlarda yeni bir biyoreseptör kategorisi olarak kabul edilmektedir. Nanoteknoloji ve nanobilimin ilerlemesiyle, farklı nanomateriyaller biyoreseptör olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküller, biyoalgılama teknolojisinde daha geniş bir uygulama yelpazesi sunmakta ve dönüştürücüler kadar biyoreseptör olarak da işlev görmektedir⁸⁴.

2.2.2. Döngüsel voltametri (CV)

Elektrokimyasal sensörlerde kullanılan teknikler; analitin özelliklerine, çevresel etmenlere, ölçüm hücresi tasarımına ve ölçüm sistemi kullanılabilirliğine göre seçilmektedir. Bu tekniklerde genel olarak döngüsel voltametri, diferansiyel puls, doğrusal tarama, sabit akım voltametrisi, kare dalga voltametrisi gibi farklı birçok seçenek bulunmakla birlikte indirgenme-yükseltgenme tepkimelerindeki pikleri değerlendirebilmek için döngüsel voltametri tekniği ile çalışılır. Döngüsel voltametri (CV), bir potansiyelin değiştirilmesi ve ardından ortaya çıkan akımın ölçülmesi yoluyla

bir analit hakkında bilgilerin elde edildiği bir elektro-analitik yöntemdir⁸⁵. Analitlerin redoks potansiyeli ve elektrokimyasal tepkime hızları (örneğin kimyasal hız sabiti) hakkında bilgi edinmek için de yararlıdır. Şekil 2.9'daki grafikler voltamogram ya da döngüsel voltamogram olarak adlandırılır. Yatay eksen sisteme uygulanan potansiyeli, dikey eksen ise ortaya çıkan akımı göstermektedir. Şekildeki oklar başlangıç ve tarama yönünü göstermektedir⁸⁶.

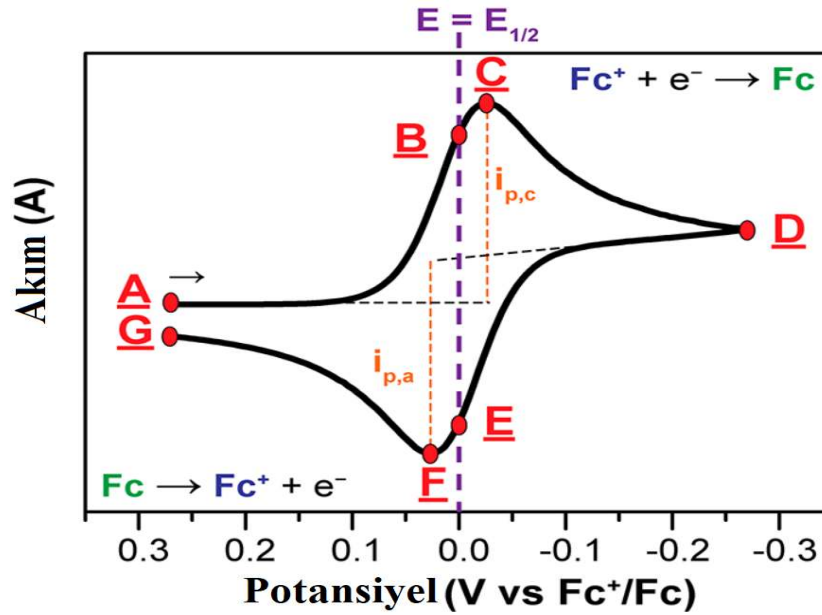


Şekil 2.9. Farklı döngüsel voltamogram örnekleri⁸⁶.

Döngüsel voltametri, iki tepe potansiyeli $E_{tepe 1}$ ve $E_{tepe 2}$ arasında bir döngüsel potansiyel taraması gerçekleştirilir. Tarama, bu tepe potansiyellerinden birinde veya aralarında herhangi bir yerde başlayabilir. Grafik doğrusal değildir ancak küçük potansiyel adımlar (E_{step} ya da $E_{adım}$) yapılır. Akım, her adımın %25'lik aralık süresi ($Aralık\ süresi = E_{adım} / tarama\ hızı$) boyunca ölçülür. Dolayısıyla, akıma karşı potansiyel eğrinin tarama başına nokta sayısı: $[2 \times (E_{son} - E_{başlangıç}) \div E_{adım}] + 1$ 'dir. Tarama hızı, iki adım arasındaki süreyi ve dolayısıyla örnekleme süresini belirleyen V/s cinsinden belirtilir⁸⁷. Tarama hızı kritik bir etmendir çünkü bir taramanın süresi buna bağlı olarak anlamlı bir kimyasal tepkimenin gerçekleşmesine izin vermek için yeterli zaman sağlamalıdır. Bu nedenle, tarama hızının değiştirilmesi farklı sonuçlar verebilir.

Gerilim referans elektrot ile çalışma elektrotu arasında ölçülür iken akım, çalışma elektrotu ile karşı elektrot arasında ölçülür. Elde edilen ölçümler, voltamogram olarak da bilinen akıma karşı voltaj olarak çizilir. Analitin elektrokimyasal indirgeme

potansiyeline doğru voltaj arttıkça akım da artacaktır. Bu indirgeme potansiyelini aşan voltajla, oksidasyon potansiyeli aşıldığından elektrot yüzeyine yakın analit derişimi azaldıkça bir tepe oluşturarak akım azalır⁸⁸. Tarama voltaj tersine çevrildiğinde ürünü ilk tepkimeden sonra yeniden oksitlemeye başlayacaktır. Bu, ileri taramaya kıyasla ters polaritede akımda bir artış üretir ancak voltaj taraması ikinci bir tepe oluşturarak tekrar azalır. Ters tarama ayrıca belirli bir tarama hızında bir tepkimenin tersine çevrilebilirliği hakkında bilgi sağlar⁸⁹.

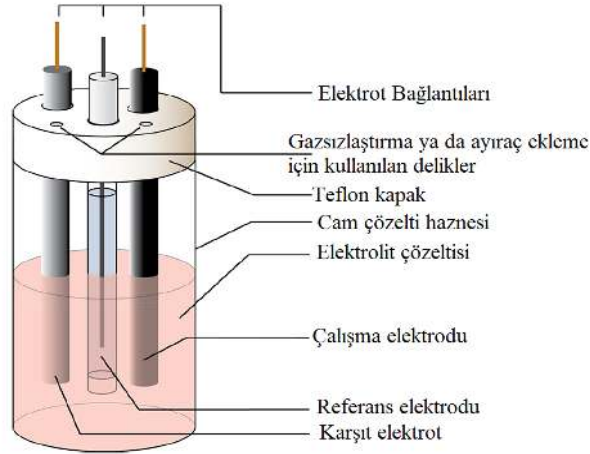


Şekil 2.10. Genel bir döngüsel voltametri (Fc^{+} : Ferrosenyum, Fc : Ferrosen, $i_{p,c}$: katodik akım piki, $i_{p,a}$: anodik akım piki)⁸⁶.

Elgrishi ve arkadaşlarının hazırladığı döngüsel voltammogram kılavuzunda potansiyel A noktasından D noktasına negatif olarak (katodik) taranırken, ferrosenyum (Fc^{+}), ferrosene (Fc) indirgendiği için elektrodun yanında sürekli olarak tükenir. Katodik akımın pik olarak ($i_{p,c}$) gözlemlendiği C noktasında akım, çözeltiden difüzyon yoluyla ilave Fc^{+} verilmesiyle belirlenir. Difüzyon tabakası olarak adlandırılan indirgenmiş Fc 'yi içeren elektrot yüzeyindeki çözelti hacmi, tarama boyunca artmaya devam eder. Bu, Fc^{+} 'nin elektroda ulaşmasını yavaşlatır. Böylece, daha negatif potansiyellere tarama yapıldığında, çözeltiden elektrot yüzeyine Fc^{+} difüzyon hızı yavaşlar ve tarama devam ettikçe akımda bir azalmaya neden olur ($\text{C} \rightarrow \text{D}$). Bağlanma potansiyeline (D) ulaşıldığında, tarama yönü tersine çevrilir ve potansiyel, pozitif

(anodik) yönde taranır. Elektrot yüzeyindeki Fc^+ derişimi tükenirken, Fc derişimi artar. Elektrot yüzeyinde bulunan Fc , uygulanan potansiyel daha pozitif hale geldikçe Fc^+ 'ya oksitlenir. B ve E noktalarında, elektrot yüzeyindeki Fc^+ ve Fc derişimleri eşittir. Bu, gözlemlenen iki tepe noktası (C ve F) arasındaki orta potansiyele karşılık gelir ve yukarıda belirtildiği gibi tersinir bir elektron aktarımı için E_0 'ı tahmin etmenin basit bir yolunu sağlar⁹⁰. Böylece iki pik analitin elektrottan difüzyonu nedeniyle ayrılır (Şekil 2.10).

Döngüsel voltamogramların alınması için gerekli deneysel düzenek Şekil 2.11'de gösterilmektedir. Çalışma, referans ve karşıt olmak üzere 3 elektrodun kullanıldığı reaksiyon hücreleri, çoğu elektrokimyasal deney için tipiktir.

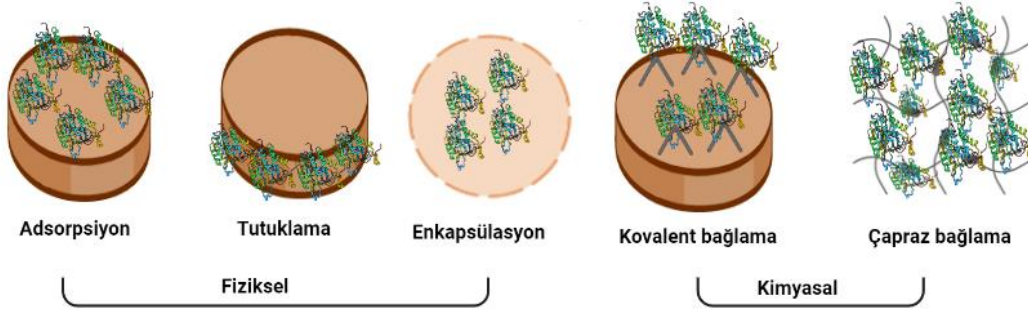


Şekil 2.11. CV deneyleri için bir reaksiyon hücresinin şematik gösterimi⁹¹.

2.2.3. Biyosensörlerde immobilizasyon teknikleri

Bir biyosensörün biyolojik tanıma kısmını tasarlamak için dönüştürücünün yüzeyinde biyolojik elementlerin hareketsiz hale getirilmesi gereklidir. Sensör hazırlamanın kilit yönlerinden biri, uygun immobilizasyon tekniğinin seçilmesidir. Bunun nedeni, immobilizasyondan sonra biyotanıma elemanın/molekülünün etkisiz hale gelmesi ya da süzülerek uzaklaşması ihtimalinin olmasıdır. Biyomoleküller, biyosensör kullanımı sırasında yapılarını, işlevlerini ve biyolojik aktivitelerini koruyabilmelidir⁹². Biyosensörlerde önemli iki immobilizasyon yöntemi yaygın olarak bilinmektedir: Fiziksel ve kimyasal (Şekil 2.12). Uygun tekniğin seçimi, seçilen biyolojik tanıma elemanına, dönüştürücüye, fiziksel-kimyasal ortama ve analitin özelliklerine bağlıdır⁴⁹.

İmmobilizasyon teknikleri



Şekil 2.12. Fiziksel ve kimyasal immobilizasyon teknikleri.

2.2.3.1. Adsorpsiyon

Van der Waals kuvveti, elektrostatik kuvvet, iyonik bağ ya da hidrojen bağ gibi zayıf çekici kuvvetler tarafından inert katı malzemenin dış yüzeyinde biyolojik tanıma elemanının hareketsiz hale getirildiği bir yöntemdir. Bu yöntem enzimatik biyosensörlerde görülmektedir. Bu yöntemin üstünlüğü, biyoreseptör aktivitesine zarar vermeyen basit ve ekonomik süreci içerir. Bunun yanı sıra biyolojik elementlerde herhangi bir değişiklik ve bir matris oluşturulmasını gerektirmez. Bu yöntemin kısıtlanması ise immobilizasyonun pH, sıcaklık ve iyonik güçteki değişikliklere duyarlı olması, zayıf etkileşimlerle bağlanması ve depolama kararlılığına sahip olması yer almaktadır⁹³.

2.2.3.2. Tutuklama

Bu süreçte biyolojik tanıma elemanları, kovalent ya da kovalent olmayan bağlar yoluyla 3D matrisler içinde fiziksel olarak tutulmaktadır. Tutuklama işleminde enzim bir monomer çözeltisinde karıştırılır, ardından monomer çözeltisinin bir kimyasal tepkimeyle ya da değişen deneysel koşullarla polimerizasyonu sağlanır. Biyolojik tanıma öğeleri, organik ya da inorganik malzemelerin 3 boyutlu ağının içine eklenir. Kullanılan organik malzemeler polidimetilsiloksan (PDMS), fotopolimer, jelatin, aljinat, selüloz, asetat fitalat, polipropilen ve poliakrilamid iken inorganik malzemeler aktif karbon ve gözenekli seramik malzemelerdir⁹⁴.

2.2.3.3. Enkapsülasyon

Biyolojik tanıma elemanlarının küresel yarı geçirgen bir zar içine alındığı basit ve ucuz bir işlemdir. Zar polimerik, lipoidal, lipoprotein bazlı olabilir. Kapsülasyonda iki yöntem tercih edilir: (i) Suyla karışmayan sıvı fazlarda enzim mikro damlacıklarının faz ayrımı ve (ii) iki karışmaz maddenin ara yüzeyinde bir monomerin polimerizasyonu. Bu işlemler polimerik zar içinde enzimlerin tutulmasına neden olmaktadır⁹⁵.

2.2.3.4. Kovalent bağlama

Doğrudan kovalent bağlanma, biyotanıma elemanının ya elektrot/dönüştürücü yüzeyine ya da zarın inert matrisine sıkıca bağlandığı en yaygın kullanılan enzim immobilizasyon tekniğidir. Membran matrisi boyunca immobilizasyon işlemi iki adımı içermektedir: İşlevsel polimerin sentezi ve kovalent immobilizasyon. Bağlanma mekanizması, biyolojik tanıma elemanı ve işlevsel protein grupları ve dönüştürücü/membran matris yüzeyinin tepken grupları arasındaki etkileşime bağlıdır. Doğrudan kovalent bağlanmanın üstünlüğü, çevresel değişikliklere karşı güçlü direnç, biyolojik tanıma elemanının sızıntısının az olması ve biyolojik tanıma elemanı ile matris arasında güçlü bağ oluşumunu içermektedir. Bu yöntemin kısıtlılığı ise geliştirilen matrisin bir kez kullanıldıktan sonra yeniden üretilmemesidir⁹⁶.

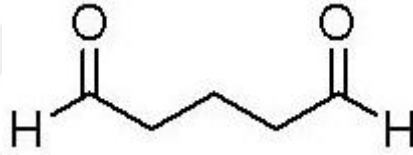
2.2.3.5. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama tepkimesi; biyotanıma elemanları arasında ya da biyotanıma elemanları ile işlevsel olarak inert proteinler (örneğin sığır serum albumini) arasında moleküller arası kovalent çapraz bağlantıların oluşumuyla gerçekleşir. Bu işlem, 3 boyutlu çapraz bağlı yapılardaki enzim moleküllerini dönüştürücü yüzeyine bağlamak için bağlayıcı görevi gören çok işlevli tepkenlerin yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Çapraz bağlanma için gereken optimal koşullar pH, sıcaklık ve iyonik güçtür. Daha kısa tepki süresine, daha güçlü bağlanmaya ve enzimlerin daha yüksek katalitik aktivitesine izin vermektedir. Üstünlüğü; enzimlerin daha az sızması, daha güçlü kimyasal bağlanma ve uygun kararlılık sağlayan ajanlar kullanılarak biyolojik tanıma elemanı için ortamın ayarlanabilmesidir. Kısıtlılığı ise matris-protein yerine protein molekülleri arasında kovalent çapraz bağların oluşması ve bu kısmi protein yapısının bozunması, çapraz bağlama immobilizasyonunun uygulanmasını sınırlandırır^{49, 97}.

Çapraz bağlayıcı ajanlar, farklı kimyasal grupları veya bileşenleri bağlama yeteneğine sahip moleküllerdir. Bu tür moleküller, biyolojik veya kimyasal sistemlerde genellikle birçok farklı hedef molekülü tanıyabilme yeteneğine sahiptirler. Biyosensörlerde disülfidler, maleimidler, azidler, imin gruplar, hidrazin ve dioksiran gibi ajanların yanı sıra **glutaraldehit** ve **EDC/NHS** (*N*-etil-*N'*-3-(dimetilaminopropil) **karbodiimite**/ *N*-hidroksisüksinimit) ajanları da sıklıkla kullanılmaktadır⁹⁸.

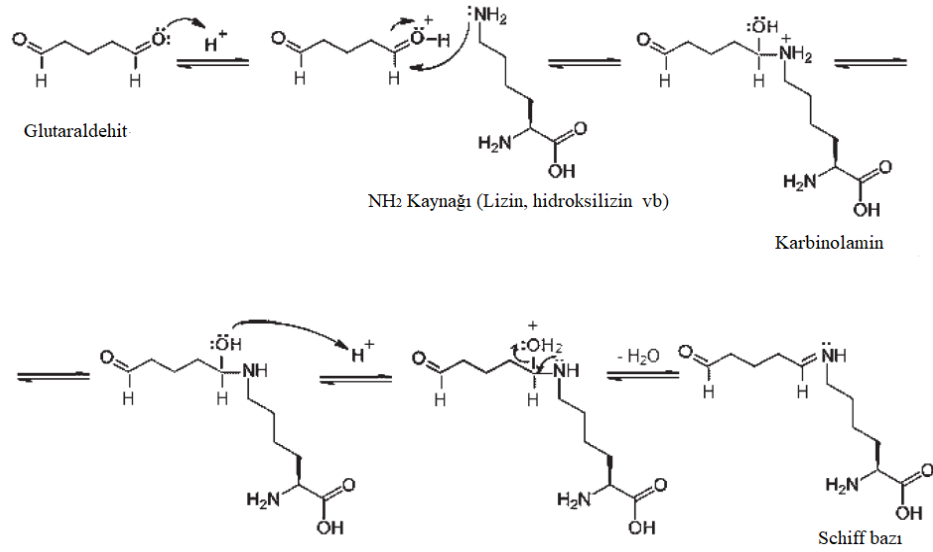
2.2.3.5.1. Glutaraldehit (GA, pentan-1,5-dial)

$\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$ formülüne sahip beş karbonlu aldehit yapıya sahip, bifonksiyonel ajandır (Şekil 2.13). Genellikle sıvı formda bulunur ve oda sıcaklığında da sıvıdır.



Şekil 2.13. Glutaraldehitin yapısı⁹⁹.

Glutaraldehitin aracılık ettiği polimer çapraz bağlanma mekanizması, aldehit işlevsel grupları ile lizin veya hidroksilizin protonlanmamış ϵ -amino grupları ($-\text{NH}_2$) ile nükleofilik tepkime yoluyla açıklanabilir. Daha belirgin olarak, tepkimenin ilk adımı, karbinolamin adı verilen tetrahedral kararsız bir ara ürün oluşturmak için karbonil gruplarına ϵ - NH_2 gruplarının nükleofilik eklenmesini içerir. İkinci adımda, $-\text{OH}$ grubunun protonlanması ve ardından bir su molekülünün kaybı, konjuge Schiff bazlarını verir¹⁰⁰ (Şekil 2.14). Bu tür tepkimeler, normalde asidik koşullar gerektirse de nötr ile hafif alkali pH değerleri bir immobilizasyon materyali olan jelatinin çapraz bağlamasını sağlayabilir.

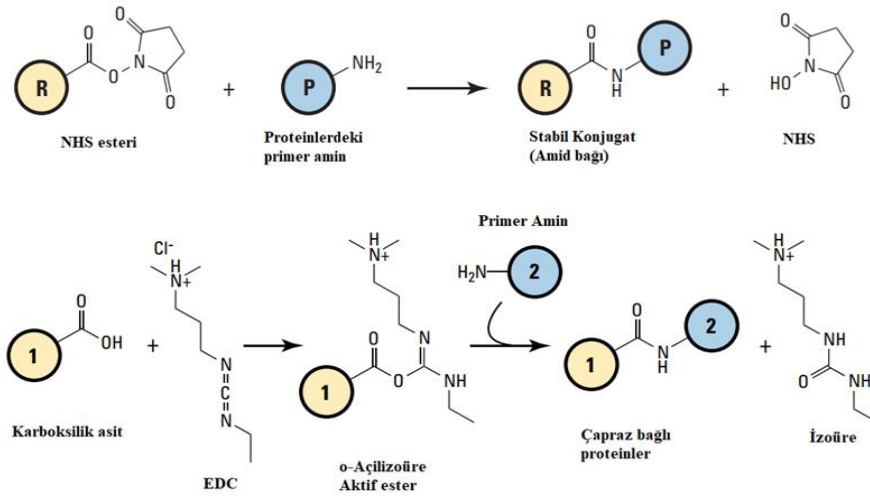


Şekil 2.14. Schiff bazı oluşumu ile sonuçlanan, glutaraldehitin amino ve karboksil grupları arasındaki tepkime mekanizması¹⁰¹.

Böyle bir mekanizma, polimerler arasında intramoleküler veya moleküller arası yeni kovalent bağların oluşumuyla sonuçlanır. Moleküller arası oluşan köprüler, glutaraldehitin sulu çözelti içinde polimerizasyonu veya aldol kondenzasyon tepkimesiyle oluşur.

2.2.3.5.2. *N*-etil-*N'*-3-(dimetilaminopropil)karbodiimit/*N*-hidroksisüksinimit (EDC/NHS)

EDC, çapraz bağın parçası olmadan karboksilatları ($-COOH$) birincil aminlere ($-NH_2$) doğrudan konjuge eder. Peptitler ve proteinler çok sayıda karboksil ve amin içerdiğinden doğrudan EDC aracılı çapraz bağlama genellikle polipeptitlerin rastgele polimerizasyonuna neden olur. Bununla birlikte bu tepkime, immobilizasyon prosedürlerinde (örneğin, proteinleri karboksilatlanmış bir yüzeye tutturma) ve immünojen hazırlamada (küçük bir peptidin büyük bir taşıyıcı proteine bağlanması gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁰².



Şekil 2.15. EDC/NHS çapraz bağlama şeması¹⁰³.

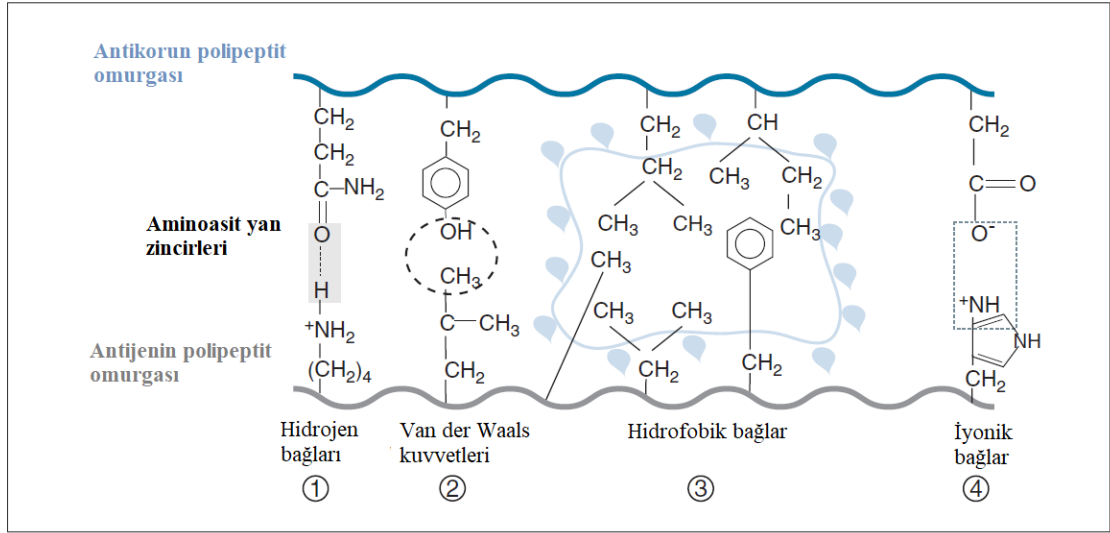
EDC, ortamdaki birincil amino gruplarından nükleofilik saldırı ile kolayca yer değiştiren aktif bir *o*-açilizoüre ara ürününü oluşturmak için karboksilik asit gruplarıyla tepkimeye girer. Birincil amin, karboksil grubuyla bir amit bağı oluşturur ve EDC yan ürünü, çözünür bir üre türevi olarak salınır. *o*-açilizoüre ara ürünü sulu çözeltilerde kararsızdır. Amin ile tepkimeye girmeme, ara maddenin hidrolizi, karboksillerin rejenerasyonu ve üre salınımı ile sonuçlanır¹⁰⁴.

NHS esterleri, karboksilat moleküllerinin EDC aktivasyonu ile oluşturulan tepken gruplarıdır. NHS ester ile aktive olan çapraz bağlayıcılar, kararlı amit bağları vermek üzere hafif alkali koşullarda birincil aminlerle tepkimeye girer. N-hidroksisüksinimit (NHS) veya analogu (sülfo-NHS), verimliliği artırmak ya da kararlı ara ürünler oluşturmak için genellikle EDC birleştirme protokollerine dahil edilir (Şekil 2.15). EDC, NHS'yi karboksillere bağlayarak, fizyolojik pH'ta birincil aminlere konjuge ederken, *o*-açilizoüre ara maddesinden önemli ölçüde daha kararlı olan bir NHS esteri oluşturur¹⁰⁵.

2.3. Antijen-Antikor Etkileşimindeki Bağlar

Antijen-antikor bağı, çok sayıda kovalent olmayan, moleküller arası kuvvetin sonucudur. Bu kuvvetlerin hiçbirisi kendi başına çok güçlü değildir ancak hepsi söz konusu antijenik epitopu tanımlayan çeşitli bölgelerde aynı anda çalıştığından, çok sıkı bir bağ oluşturmak için birleşirler¹⁰⁶. Bununla birlikte, bağ tersine çevrilebilir ve yüksek

tuz derişimi, deterjan ya da fizyolojik olmayan pH uygulaması ile her iki molekülde de değişiklik olmadan ayrılabilir. Bozunma deneyleri, antijen-antikor bağlanması da dört tür zayıf kovalent olmayan kuvvetin (hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik bağlar ve iyonik bağlar) tanımlanabileceğini göstermiştir (şekil 2.16)¹⁰⁷.

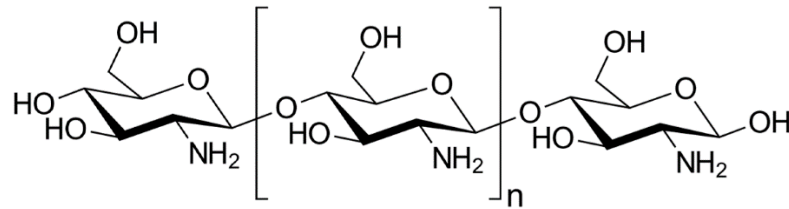


şekil 2.16. Antijen-antikor bağlanmasındaki non-kovalent baęlar¹⁰⁸.

2.4. İmmobilizasyon materyalleri ve yapıları

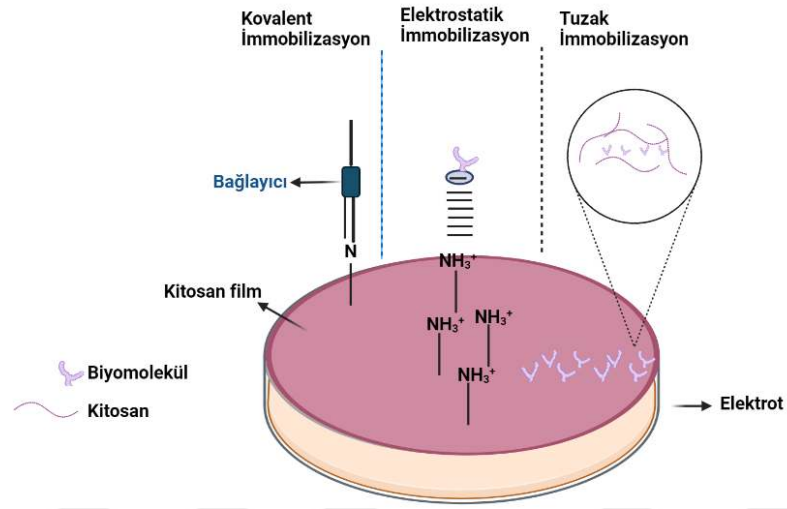
2.4.1. Kitosan

Kitosan ya da $\beta(1,4)$ 2-amino-2-deoksi- β -D-glukoz ($C_6H_{11}O_4N$), kitinin aminoasetil gruplarının alkali ortamda hidrolize edilmesiyle endüstriyel olarak elde edilen hidrofilik bir biyopolimerdir (şekil 2.17)¹⁰⁹.



şekil 2.17. Kitosanın kimyasal yapısı¹¹⁰.

Kitosan antibakteriyel ve antioksidan özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra, demir, bakır, kadmiyum ve magnezyum için seçici şelasyon özellikleri de tanımlanmıştır. Kitosan omurgasındaki amino ($-NH_2$) ve alkol ($-OH$) işlevsel grupları, bu polisakkaritin diğer türlerle kararlı kovalent bağ oluşturmalarını sağlar. Ayrıca biyouyumlu, adezyon gücü, biyoparçalanabilir olması da sensörlerde film oluşturmaları için potansiyel kullanımını arttırmaktadır¹¹¹.

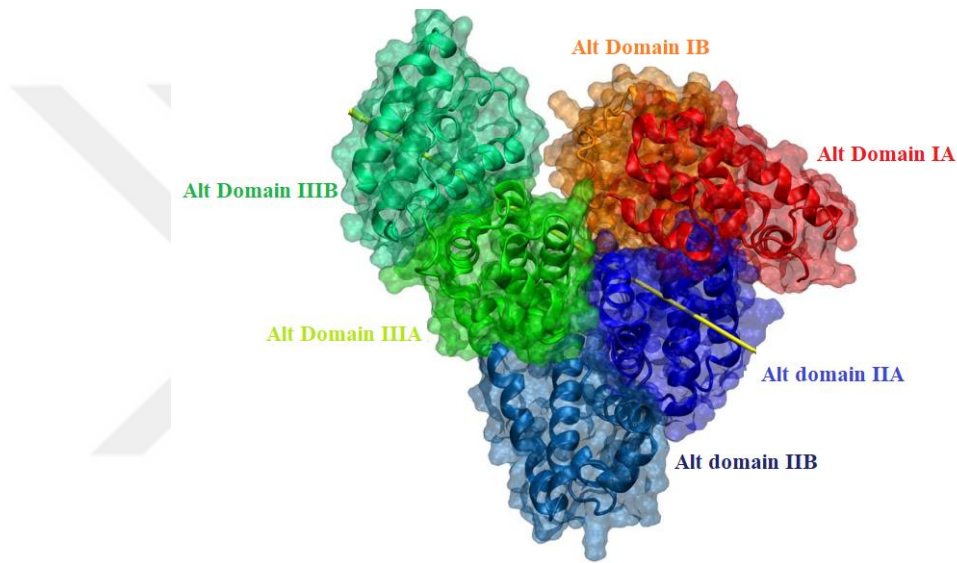


Şekil 2.18. Elektrot yüzeyinde kitosanla desteklenmiş biyomoleküllerin immobilizasyonu.

Elektrokimyasal biyosensörlerde kitosan zinciri, çok güçlü imin ya da amit bağları oluşturan biyomoleküllerin karbonil grupları ve ılımlı koşullar altında oldukça tepken olan serbest amino grupları açısından çok zengindir. Böylece biyoaktif tabaka, yüksek kararlılık ve yeniden üretilebilirlik açısından optimum koşulları sağlar. Kitosanın makromoleküler zinciri aynı zamanda yüksek elektron aktarım hızına ve özgün yüzey alanına sahip kompozitler üretmek için başka polimerler ile kolayca modifiye edilebilir. Ayrıca serbest amin ve alkol grupları sayesinde kitosan, elektrokimyasal biyosensörlerin hazırlanması için enzimler, DNA ve antikorlar/antijenler gibi biyomoleküllerin immobilizasyonunda büyük ölçüde kullanılmaktadır (Şekil 2.18)¹¹².

2.4.2. Sığır Serum Albumini (BSA)

BSA, 29 α -sarmal'dan meydana gelen 583 amino asitlik bir moleküldür. 66400 Da'lık moleküler kütleye sahiptir. Amino asit zinciri, disülfid bağları ile dokuz ilmeğe bölünmüş ve kalp şeklinde düzenlenmiş 3 homolog ancak yapısal olarak farklı domainlerden (I,II ve III) oluşmaktadır (Şekil 2.19). Her domain A ve B olmak üzere 2 alt domainden oluşmaktadır. Proteinin ikincil yapısı esas olarak α -sarmalıdır (%74), geri kalan polipeptit zinciri sırayla ve alt domainler arasında uzatılmış esnek bölgelerden oluşmaktadır¹¹³.

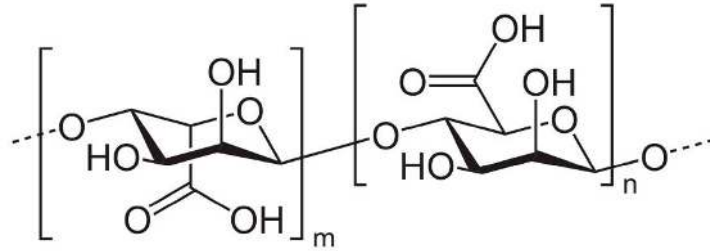


Şekil 2.19. BSA'nın yapısı (sarı çubuk benzeri yapı proteinin dipol momentini göstermektedir)¹¹³.

Proteinin otuz beş sistein (Cys) kalıntısının biri hariç tümü, on yedi disülfid köprüsünde yer alır. Bu genişletilmiş disülfid köprü ağı, BSA'nın şekil ve yapısından sorumludur. BSA diğer moleküllere bağlanırken üçüncül yapısındaki değişiklikler molekül salındığında kolayca tersine çevrilebildiğinden dolayı “yumuşak protein” olarak adlandırılır. Ayrıca, sert proteinler (örneğin lizozim) olarak adlandırılan enzimatik albuminlerin aksine yumuşak proteinlerin yapısı, çözelti pH'sinden önemli ölçüde etkilenir. Bu özellik BSA'nın çeşitli biyolojik molekülleri, ilaçları, yağ asitlerini, flavonoidleri ve altın nanopartiküller gibi diğer molekülleri bağlama, taşıma ve salınım konusundaki teknolojik potansiyeli için çok önemlidir¹¹⁴.

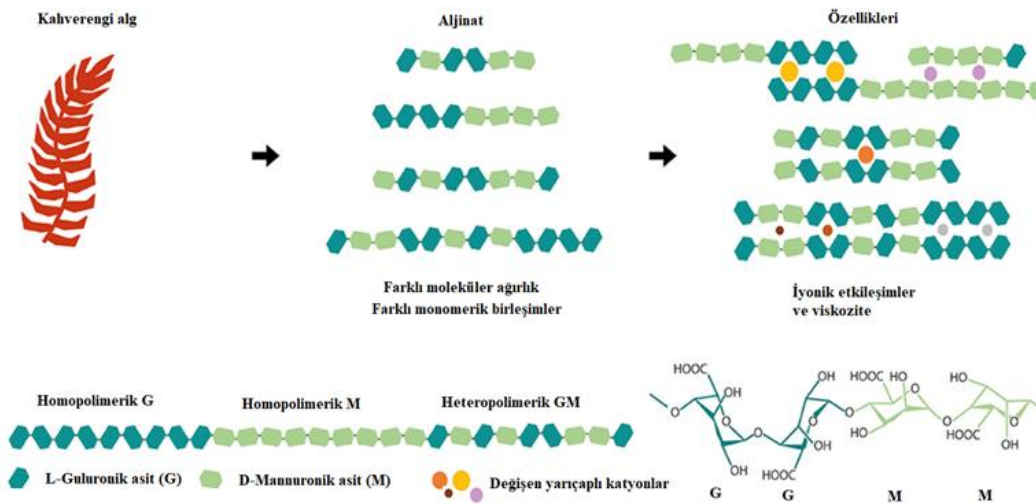
2.4.3. Aljinat

Aljinat, *Azotobacter sp* ve *Pseudomonas sp*'nin hücre duvarında ve alglerde doğal olarak oluşan bir polisakkarittir. Aljinatın lineer zincirleri, serbest işlevsel hidroksil ($-OH$) ve karboksil ($-COOH$) grupları taşıyan α -L-guluronik asit (G) bloklarını ve 1,4-bağlı β -D-mannuronik asit (M) epimerlerini içermektedir (Şekil 2.20)¹¹⁵.



Şekil 2.20. Aljinatın kimyasal yapısı¹¹⁰.

Bu monomerlerin nispi miktarı (M/G oranı), bunların homopolimerik (GG veya MM) veya heteropolimerik (GM) bloklar olarak düzenlenmesi ve polimer zincirlerinin moleküler ağırlığı, aljinat kaynağına, elde edilen kaynağın mevsimsel koşullarına ve ekstraksiyon süreçlerine büyük ölçüde bağlıdır. Türe, ekstraksiyona ve saflaştırmaya bağlı olarak, aljinat farklı monomerik bileşime ve düzenine de sahip olabilir (Şekil 2.21). Bu yapısal farklılıklar, iyonlara karşı aljinat afinitesi ve biyomateryal gelişimini koşullandırarak son özelliklerini ve uygulamalarını dikte edecek viskozite gibi farklı malzeme özelliklerine dönüşmektedir¹¹⁶.



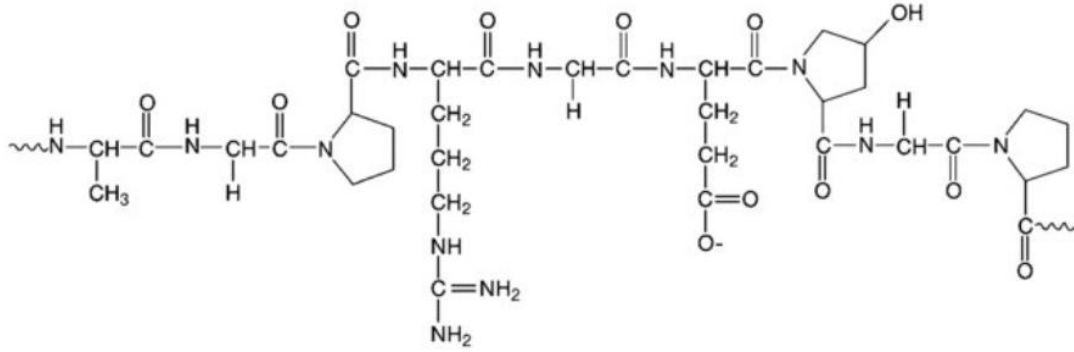
Şekil 2.21. Aljinatın kimyasal ünitelerinin yapısı (G: guluronik asit, M: mannuronik asit)¹¹⁷.

Biyomedikal uygulamalar ve doku mühendisliği için deri, kalp, kemik, kıkırdak ve vasküler doku dahil olmak üzere hem yumuşak hem de sert dokuların onarımında aljinat bazlı biyomalzemeler uygulanmaktadır. Bu alanlarda, polimer bazlı biyomalzemelerin kimyasal modifikasyonu, sadece yapısal ve mekanik özelliklerini değil aynı zamanda biyolojik aktivitelerini de iyileştirmek için sıklıkla kullanılan bir stratejidir. Biyouyumlu olmasına rağmen aljinat, yüksek hidrofilikliği nedeniyle protein adsorpsiyonunu az bir kuvvetle destekler bu nedenle kirlenmeyen bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Bu yüksek hidrofiliklik, hücreyle etkileşimde bulunan alanlarda hücreler, polimerin kendisiyle özgün bağlantı noktaları oluşturamadığından aljinat jellerini yapışkan olmayan bir biyomateryal yapar. Bu özellik sayesinde kontrollü bir şekilde, özgün biyolojik yanıt oluşturmak için kimyasal olarak modifiye edilebilir^{116, 118}.

Aljinatın fiziksel özelliklerini geliştirmek için, aljinat kompoziti oluşturmak üzere kolajen, kitosan ve jelatin gibi doğal polimer ve polilaktit, polipirol gibi yapay polimer ve tetraetilortosilikat (TEOS), hidroksiapatit (HA) gibi inorganik bileşiklerle aljinat kompozitleri oluşturulmakta ve bu kompozitler biyosensörler başta olmak üzere biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır¹¹⁶.

2.4.4. Jelatin

Jelatin, hayvanların kemik ve derilerinde bulunan kolajenden saflaştırılarak elde edilen renksiz bir proteindir. Ticari kolajen kaynaklarının çoğu sığır ve domuz gibi hayvanlar olup son zamanlarda balık, kümes hayvanları ve omurgasızlar da alternatif kaynak olarak kullanılmaktadır. Kolajenin lifli yapısının, asidik veya alkali ön muamele ile parçalanmasının ardından çeşitli polipeptit zincirleri arasında çapraz bağların oluşması ile üretilmektedir. Asit ile muamele sonucu Tip A ve alkali ile muamele sonucu ise Tip B olmak üzere 2 türü bulunmaktadır. Jelatin, ortalama 20–200 kDa molekül ağırlığı ile %50,5 karbon, %25,2 oksijen, %17 nitrojen ve %6,8 hidrojen içerir (Şekil 2.22)¹¹⁹.



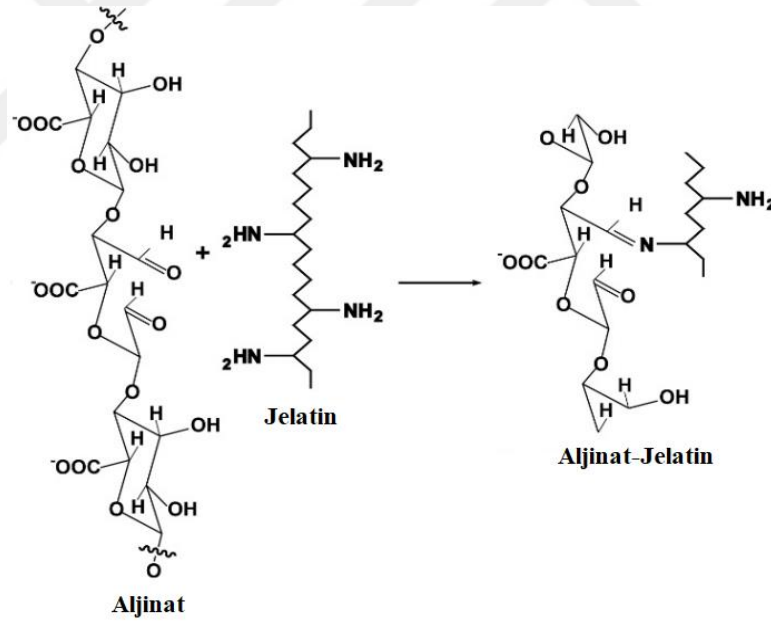
Şekil 2.22. Jelatinin yapısı¹²⁰.

Jelatin lineer polipeptit zincirlerinin heterojen karışımından oluşur: α -zincirleri (tek zincir), β -zincirleri (iki kovalent çapraz bağlı α -zinciri) ve γ -zincirleri (kovalent olarak çapraz bağlanmış üç α -zincir). Jelatin polipeptit zinciri, nispeten düzenli bir şekilde birbirine bağlanan 18 amino asit içermektedir. Glisin, prolin ve hidroksiprolin, jelatin yapısındaki en baskın üç amino asit kalıntısıdır. Prolin ve hidroksiprolin, jelatinin jelleştirici etkisinde kritik bir role sahiptir. Jelatin, lizinin ϵ -amino grubu, aspartik asit ve karboksilik asidin karboksil grupları, histidinin imidazol grubu, arjininin guanidinyum grubu ve terminal α -karboksil ve α -amino grupları gibi bir dizi iyonlaşabilir işlevsel grup sunmaktadır¹²¹.

Yüzey yükü, moleküler ağırlığı, şişme hızı, hidrojen bağlama kapasitesi ve çapraz bağlama derecesi gibi polimerle ilgili faktörler, polimerlerin biyoyapışkan özelliklerinde önemli rol oynamaktadır. Jelatin, yüksek derecede hidrofilikliği ve şişme hızı, elektrostatik etkileşimleri, hidrofilik grupları arasındaki hidrojen bağı ve mekanik bağlanması nedeniyle iyi bir biyoyapışkanlık sunmaktadır. Jelatinin yapışkanlığını kullanarak, sensör sistemlerde biyoaktif tabaka oluşumu sağlanmaktadır. Bu oluşumu güçlendirmek için ise polimer karışımları ile modifikasyonlar yapılmaktadır¹²². Bu modifikasyonlardan biri de aljinat-jelatin kompozitlerdir. Aljinat-jelatin kompozitler son yıllarda, doku mühendisliğinde, gıda endüstrisinde jel ve film olarak, 3D biyobaskı, elektrokimyasal baskıda ve protein kapsüllemeye destek yapı iskelesi olarak kullanılmaktadır¹²³. İyonotropik aljinat-jelatin kompozitlerin, biyosensör mekanizmasındaki işlevi; analitin kompozit tabakaya serbest hacmine difüzyonunu

içermesi ve burada biyomoleküler bağlanma prosesini ölçülebilir bir sinyale dönüştürmesidir. Bunun dışında biyogölgeleme için bu kompozitlerin kullanımındaki çeşitli üstünlükler: (i) prob ve analitin artan yükleme kapasitesi; (ii) özgün olmayan adsorpsiyonun önlenmesi; (iii) jel-ortam arayüzü boyunca kontrollü aktarım ve (iv) biyogölgeleme makinesinin bir parçası olan aktif biyomoleküller için sulu ortamın biyoyumluluğudur¹²⁴.

Orijinal aljinat zincirindeki kimyasal modifikasyonlar ile polimer, Schiff bazı oluşumu yoluyla çeşitli biyomalzemelere kovalent olarak bağlanma yeteneği gibi ek işlevsellikler kazanmaktadır¹²⁵. Örneklerden birisi de lizin ve hidroksilizin ϵ -amino grupları aracılığıyla oksitlenmiş aljinatın jelatin ile çapraz bağlanmasıdır (Şekil 2.24). Jelatinin bağlanması, aljinat matrisini, geliştirilmiş hücre-malzeme etkileşimi ve daha yavaş biyobozunma ile birlikte daha yüksek biyoyumluluk ile bir hidrojele dönüştürerek üç boyutlu (3D) matrislerin üretilmesine izin vermektedir¹²⁶.



Şekil 2.23. Aljinat-Jelatin kompozitin yapısı¹²⁶.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıdaki gibidir.

3.1.1. Cihazlar

- Au Çalışma Elektrodu (MF 2014, Avustralya)
- Palm Sens Biyosensör (Avustralya)
- Platin Tel Yardımcı Elektrot (MW 1032 Avustralya)
- Ag/AgCl Referans Elektrot (MF 2052, Avustralya)
- Tek kullanımlık elektrot (SPE)
- P1000, P200 ve P20 Otomatik Pipetleri (Gilson, Fransa)
- Manyetik Karıştırıcı (Tüv Bayern, Almanya)
- pH Metre (Mettler Toledo)
- Hassas Terazî (Mettler AJ100)
- Sonikatör (Resonik 1016,Türkiye)

3.1.2. Kimyasallar

- Monosodyumhidrojenfosfat NaH_2PO_4 (Merck)
- Disodyumhidrojenfosfat Na_2HPO_4 (Merck)
- Sodyum asetat trihidrat (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- Glisin (Sigma)
- Potasyum ferrosiyaniür trihidrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
- Distile su
- Glutaraldehit (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- HCl (Sigma)
- Alümina çözeltileri (Sigma)
- % 96 Etanol (Sigma)

- Jelatin (Sigma)
- BSA (Sigma)
- Kitosan (Acros)
- Aljinat (Acros)
- Kaspaz-3 antijeni (Enzo life sciences)
- Kaspaz-3 antikoru (St. John's Laboratory)
- Kaspaz-3 ELISA kit (BioVision's)

3.1.3. Kullanılan tamponlar

Fosfat tamponu: 0,1 M, pH 7 Fosfat (Disodyumhidrojen fosfat ve monosodyumhidrojen fosfat) tamponu hazırlandı.

Asetat tamponu: 0,1 M, pH 5,5 Asetat (Sodyumasetat trihidrat ve asetik asit) tamponu hazırlandı.

Glisin tamponu: 0,1 M, pH 8,5 Glisin (Glisin/NaOH) tamponu hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrotların mekanik ve elektrokimyasal temizliği

Elektrot kullanımında önce, güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için çalışma elektrodunun temizliğine dikkat edilmelidir. Yüzeyde elektron aktarımını engelleyebilecek herhangi bir yüzey kirleticisi olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla elektrotlar, kadife yüzeye damlatılan 0,04 M 100 μ L alümina çözeltisi 30 saniye süre ile ∞ işareti şeklinde hareket ettirilerek temizlendi. Bu işlemin ardından elektrot 1 dakika boyunca distile suda sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon uygulama amacı, elektrot yüzeyine adsorbe olan alüminayı uzaklaştırmaktır. Fiziksel temizlik ardından uygulanan elektrokimyasal temizlik aşaması ise -1 ile $+1,5$ V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında ve 0,5 M H_2SO_4 çözeltisi ile 10 kez döngüsel voltametre testi yapılarak pik ayrımının 80 mV'dan düşük olması ile sağlandı.

3.2.2. Çalışma gruplarının belirlenmesi

Çalışma grupları jelatin, BSA, aljinat ve kitosandan oluşan 4 farklı polimerin ikili kombinasyonları hazırlanarak oluşturuldu:

- i. Jelatin/BSA
- ii. Kitosan/Jelatin
- iii. Aljinat/Kitosan
- iv. Aljinat/Jelatin

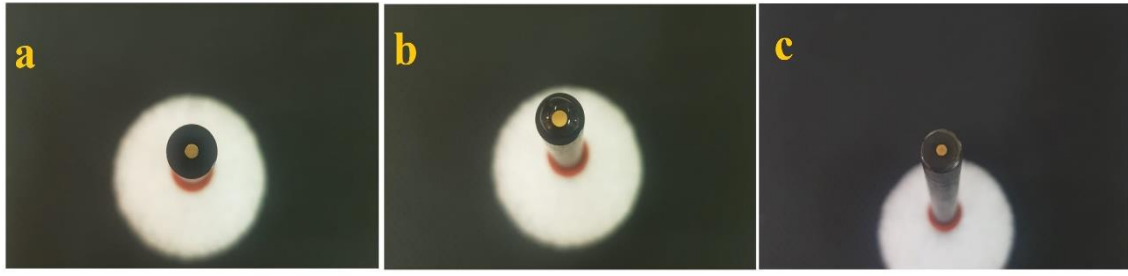
3.2.3. İmmobilizasyon jellerinin ve biyoaktif tabakanın hazırlanması

Jelatin, 0,1 M (pH 7,0) fosfat tamponunda %15'lik olacak şekilde 40 °C'de etüvde bekletilerek hazırlandı ve tam homojenizasyon için vortekslendi. Kitosanın –NH₂ gruplarının pKa'sı 6,5 olduğundan distile su ya da bazik ortamda çözünemeyeceğinden, %1'lik asetik asitte (pH 6,0) çözünerek %0,1'lik kitosan hazırlandı. Aljinatın %1,75'lik çözeltisi saf suda hazırlandı. BSA jelin %2,5'lik çözeltisi ise jelatinle aynı şekilde 0,1 M fosfat tamponunda 40 °C'de etüvde bekletilerek hazırlandı. Her bir jelin hazırlanmasının ardından kitosan-aljinat, aljinat-jelatin, kitosan-jelatin ve jelatin-BSA olmak üzere 4 ayrı jel polimeri 1:1 hacimde oluşturuldu. Hazırlanan stok jeller kullanılabilecek kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Kitosan-jelatin ve Jelatin-BSA polimere 100 ng/mL antikaspa-3 ilave edildikten sonra glutaraldehit ile çapraz bağlanarak, kitosan-aljinat ve aljinat-jelatin polimeri ise 100 ng/mL antikaspa-3 ve EDC/NHS ile çapraz bağlanarak biyoaktif tabaka için gerekli tüm bileşenler tamamlandı.

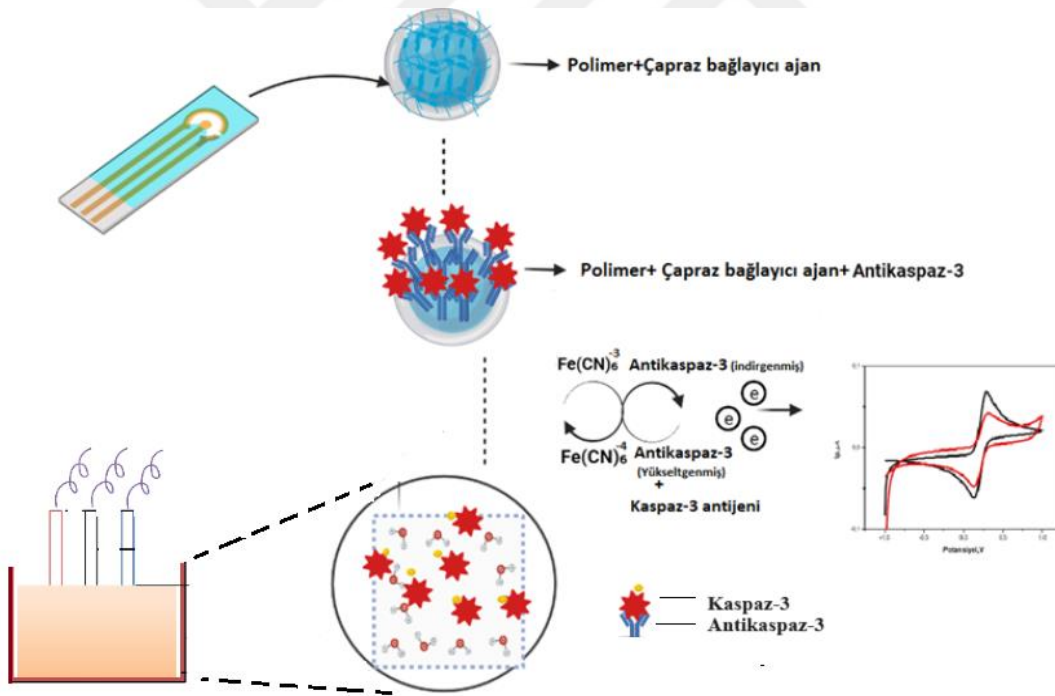
3.2.4. Kaspaz-3 biyosensörünün hazırlanması

İmmobilizasyon işlemi, hazırlanan jel bileşiğinin 6 mm çapa (0,04 cm²'lik alana) sahip elektrot merkezine 10 µL polimer bileşiklerinden, 10 µL (10 ng/mL) antikaspa-3'ten ve 5 µL çapraz bağlayıcı ajanlardan olmak üzere toplam 25 µL hacimde olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu işlemi takiben elektrotlar +4 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Elektrotların immobilizasyondan önceki ve sonraki görüntüleri şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. a) Boş Au elektrot, b) Au elektrotta immobilizasyon jelinin eklendiği durum c) immobilizasyonun gerçekleştiği durum.

Bağlanmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak amacıyla elektrot, 5 dk boyunca pH 7,0 0,1 M fosfat tamponunda bekletilmiştir. Farklı derişimlerde kaspaz-3 antijeni bulunan tepkime hücresine elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için 5 mL’lik tampon içine 5 mM olacak şekilde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çifti mediyatör olarak eklendi. Kaspaz-3 biyosensörüne ait hazırlık aşamaları şekilde verilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kaspaz-3 biyosensörünün şekilsel özeti.

Çalışma elektroduna antikaspaz-3’ün jel bileşikleri ve çapraz bağlayıcı ile immobilizasyonu sonucunda içinde 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ve ferrosiyanür olan tepkime hücresine Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel yardımcı elektrotlar

kendilerine özgül olan bağlantı noktalarına yerleştirildi ve manyetik karıştırıcı 50 rpm hızda çalıştırıldı. Kaspaz-3 ortama ilave edilmeden önce boş ölçüm alınarak sistem kör ayarı yapıldı ve tüm ölçümler körleme yapıldıktan sonra alındı.

3.2.5. Biyoaktif tabakanın görüntülenmesi için yapılan analizler

Biyoaktif tabaka, biyosensörün özgün bir analit ya da hedef molekülle etkileşim kurma yeteneğini sağlar. Bu etkileşim genellikle bir sinyal üretimine neden olur ve sinyal, sensör tarafından ölçülür. Biyoaktif tabakanın seçiciliği ve hassasiyeti, biyosensörün genel performansını belirleyen önemli etkenlerden biridir. Biyoaktif tabakanın görüntülenmesi, biyosensörün tasarımı, performansı ve çalışma mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve en iyi koşulların belirlenmesi için önemli bir adımdır. Görüntülemeye taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscopy, SEM), geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscopy, TEM), X-ışını fotoelektron spektrometresi (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR), atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscopy, AFM), nükleer manyetik rezonans (Nuclear magnetic resonance, NMR) gibi yöntemler kullanılmaktadır.

3.2.5.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin alınması

SEM, malzemelerin yüzeyini yüksek çözünürlükte görüntülemek için kullanılan güçlü bir tekniktir. Bu teknikte ilk olarak incelenmek istenen yüzey için yüksek enerjili bir elektron demeti kullanılır. Yüksek enerjili elektronlar, örneğin yüzeyine çarptığında, çeşitli etkileşimler meydana gelir. Bu etkileşimler arasında ikincil elektronların ve geri saçılan elektronların emisyonu bulunur. SEM, örnek ile etkileşimden kaynaklanan sinyalleri algılar ve ikincil elektronlar numune topoğrafyasını, geri saçılan elektronlar ise örneğin bileşimini yansıtır. Algılanan sinyaller, bilgisayarlar aracılığıyla bir görüntü oluşturmak için kullanılır. Son olarak bu görüntüler, örneğin yüzey morfolojisini ve bileşimini ayrıntılı bir şekilde görselleştirir.

SEM görüntüsü almak için örnekler jel bileşiği, jel bileşiği+çapraz bağlayıcı ve jel bileşiği+çapraz bağlayıcı+antikaspaz-3 olmak üzere 3 grup hazırlandı. Bu gruplar tek kullanımlık elektrotlar üzerinde kurutulup analiz için hazır hale getirildi. SEM analizi; immobilizasyon polimerlerinin elektrot yüzeyindeki morfolojilerini ve antikaspaz-3 ile

çapraz bağlayıcı ile olan etkileşimlerindeki homojenliğin incelenmesi amacıyla kullanıldı. SEM görüntüleri Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndaki (ÇÜMERLAB) FEI marka Quanta 650 Alan Emisyonlu mikroskoptan alındı. İletken özellikte olmayan numunelerimiz, görüntü almak amacıyla önce çok ince (yaklaşık 2Å/saniye) altın ile kaplanarak iletken hale getirildi. Görüntüler polimerlerin yapı ve özelliğine bağlı olarak 10.000-15.000 x büyütme aralığında, 10,5-11,5 mm çalışma mesafesinde ve 5 µm ölçek kullanılarak alınmıştır.

3.2.5.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) spektrumlarının alınması

Fourier dönüşümü, elde edilen zaman alanındaki interferogramı (zaman alandaki sinyali) frekans alanındaki bir spektruma dönüştürmek için genel bir matematiksel işlemdir. Bu işlem, bir sinyali frekans bileşenleri halinde analiz etmek ve işlemek için önemli bir araçtır. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi bir örnek içerisindeki moleküllerin kızılötesi ışımasını ile etkileşimlerini ölçer ve böylece örnekteki polimer ve biyolojik moleküllerin değişimleri hakkında bilgi sağlar. Kızılötesi ışıma, elektromanyetik spektrumun uzun dalga boyu bölgesinde yer alan bir tür elektromanyetik radyasyondur. Bu ışımla, örneğe kızılötesi radyasyon (IR) uygulanarak polimer ve biyolojik malzemenin moleküler bileşimi ve yapısı belirlenir ve çeşitli dalga boylarında kızılötesi ışık emilimi ölçülür. Fourier dönüşüm spektrometresi, geniş bant ışık kaynağından gelen ham verileri, her dalga boyunda soğurma seviyesini elde edecek şekilde dönüştürerek spektrum elde edilir. Kullanılan tüm polimerler ve kaspaz-3 için kullanılan spektrum MIR olarak adlandırılan orta dalga boylu infrared olup 4000-400 cm⁻¹ aralığındaki bölgeyi kapsamaktadır. Spektrumdaki X eksenini (yatay) kızıl ötesi spektrumu belirtmekte ve oluşan tepe noktaları örnekteki atomların çeşitli titreşimlerine karşılık gelmektedir. Y eksenini (dikey) ise örnek tarafından iletilen ya da emilen kızılötesi ışık miktarını belirtmektedir^{127, 128}.

FTIR verisini almak için örnekler sıvı biçimde jel bileşiği, jel bileşiği+çapraz bağlayıcı ve jel bileşiği+çapraz bağlayıcı+antikaspaz-3 olmak üzere 3 grup halinde hazırlandı. FTIR, immobilizasyonda kullanılan 3 grup arasındaki özel işlevsel grupların ve kimyasal bağların kızılötesi absorpsiyon özelliklerini inceleyerek spektrumlarının

taranması amacıyla kullanıldı. ÇÜMERLAB Jasco marka FTIR 6700 model kızılötesi absorpsiyon spektroskopisi ile analiz edildi.

3.2.5.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ölçümlerinin alınması

AFM, yüzey topoğrafyası ve 3 boyutlu görüntülerin alınmasını sağlayan bir mikroskop türüdür. AFM ile örnek üzerindeki atomik ya da moleküler etkileşimler ölçülerek bu bilgilerle yüzeyin ayrıntılı bir haritası oluşturulur. Değiştirilmiş yüzeylerin pürüzlülüğü ve yoğunluğu, biyomolekül ile polimerlerin adsorpsiyonunun doğrudan gözlenmesine ve morfolojik açıdan yüzey üzerindeki moleküllerin immobilizasyon sürecini karakterize etmede yararlıdır. Bir yüzey üzerinde immobilize molekül yoğunluğunun belirlenmesi kaplamaların moleküller arası dağılımlarının yorumlanmasında değerlidir¹²⁹.

AFM görüntüsü almak için örnekler SEM analizindeki gibi hazırlandı. AFM yüzey topografisinin, antijen-antikor etkileşimlerinin, immobilizasyon malzemesi ile biyolojik malzemeler arasındaki değişimin gözlenmesi ve yüzey kaplamasının incelenmesi amacıyla kullanıldı. Analizler ÇÜMERLAB Park Systems marka Park NX10 model mikroskobunda yapıldı. Görüntüler μm boyutunda alındı.

3.2.6. Çalışma koşullarının optimizasyonu

Çalışma koşullarının optimizasyonu; biyosensörlerin daha duyarlı, özgün ve tekrarlanabilir bir şekilde çalışmasını sağlamakla birlikte, sensörün uygulama alanındaki başarıyı da önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu nedenle çalışma koşulları, tasarlanan biyosensörün güvenilirliği ve performansının artması amacıyla optimize edilmiştir.

3.2.6.1. Elektrokimyasal çalışma aralığının optimizasyonu

Biyoaktif tabakanın görüntülenmesi amacıyla yapılan analizlerden elde edilen veriler sonucunda aljinat-jelatin polimeri ile elektrokimyasal çalışmalara devam edildi. Bu polimerleri kullanılarak kaspaz-3'ün saptanmasına yönelik hazırlanan biyosensörde, çalışma aralığının belirlenmesi için -1 ile $+1,5$ V aralığında döngüsel voltamogramlar alındı.

3.2.6.2. Çalışma elektrodunun belirlenmesi

Elektron aktarımı için yüksek aktivasyon enerjisi gösterecek yüzey alanının belirlenmesi amacıyla altın, platin ve karbon elektrotlar kullanılarak elektrokimyasal yanıtlar alınmış ve en iyi akımın olduğu elektrot ile çalışmalara devam edildi.

3.2.6.3. pH-tampon optimizasyonu

Kaspaz-3 biyosensörünün optimum pH'sinin belirlenmesi için pH 5,5, 6,0 ve 6,5'te 0,1 M asetat; 7,0, 7,5 ve 8,0'de 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,5, 9,0 ve 9,5'te 0,1 M glisin tamponu kullanılarak en iyi biyosensör yanıtının en yüksek pik akımına göre hangi pH değerlerinde elde edildiği göre belirlendi.

3.2.6.4. Tampon derişiminin optimizasyonu

Elektrokimyasal olarak en iyi yanıtın görüldüğü tampon derişimini belirlemek için bir önceki çalışmada en yüksek akımı veren pH değerine göre asetat tamponun 0,025, 0,05, 0,1 ve 0,15 M derişimleri kullanılarak deneyler gerçekleştirildi.

3.2.7. İmmobilizasyon parametrelerinin optimizasyonları

3.2.7.1. Jel bileşenlerinin optimizasyonu

Biyoaktif tabakada kullanılan immobilizasyon jellerinin optimizasyon çalışmalarında öncelikle jellerin farklı derişimlerdeki etkileri denendi. Bu amaçla aljinatın %0,25, 0,5, 1, 1,25, 1,5, 1,75 6 farklı derişimiyle, jelatinin ise %2,5, 5,0, 7,5, 10, 12,5, 15 derişimleri, sırasıyla ve birbiriyle 1:1 hacimde karıştırılarak aljinat-jelatin bileşiği elde edildi. Bu bileşiklerin analizi sırasında antikaspaz-3 derişimi (10 ng/mL) ve EDC/NHS (0,75 M:0,25 M) derişimleri literatürdeki verilere göre sabit tutulmuştur¹³⁰. Bileşiğin yapısında jelatin olduğundan dolayı çapraz bağlayıcı ajan olarak aynı deneyler literatürdeki verilere göre sabit glutaraldehit derişimi (%2,5) ile yapıldı¹³¹.

3.2.7.2. Çapraz bağlayıcı optimizasyonu

Kaspaz-3'ün aljinat-jelatin bileşikleri ile immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı olarak 0,3 M: 0,1 M, 0,03 M: 0,01 M, 0,75 M: 0,25 M derişimlerinde EDC/NHS yine

aynı şekilde farklı bir çapraz bağlayıcı olarak %1,25, 2,5, 5, 7,5, 10 glutaraldehit kullanıldı. Bu sistem içinde uygun çapraz bağlayıcı ve derişimleri belirlendi.

3.2.8. Karakterizasyon çalışmaları

Kaspaz-3 biyosensörü için kullanılan immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonu tamamlandıktan sonra karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Biyosensör prototipi oluşturulmadan önce yapılacak olan karakterizasyon çalışmaları, uygulamada doğruluğun, güvenilirliğin ve duyarlılığın belirlenmesi açısından önemlidir.

3.2.8.1. Doğrusal saptama aralığının belirlenmesi

Geliştirilen kaspaz-3 biyosensörünün doğrusal saptama aralığını belirlemek amacıyla optimizasyon sonucu elde ettiğimiz veriler ile hazırlanan koşullar altında ölçümler alındı. Bu aralığı belirlerken altın standart yöntem olmamakla birlikte ELISA ile kıyaslanarak veriler elde edilmiştir.

3.2.8.2. Gün içi tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda hazırlanmış tek bir biyosensörde, tekrar çalışmaları arasında zaman aralığı olmaksızın üstüste yapılmış ölçümleri içermektedir. Her bir derişime karşılık gelen sinyal değerlerinin ortalaması ($\bar{x}$), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayıları (CV) alınarak biyosensörün tekrarlanabilirlik deneyleri tamamlandı.

3.2.8.3. Günler arası tekrarlanabilirlik

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise tamamen aynı koşullarda farklı zamanlarda hazırlanan elektrot ile 20 kez ölçüm alınarak biyosensörün günler arası tekrarlanabilirlik verileri değerlendirildi.

3.2.8.4. Raf ömrü çalışması

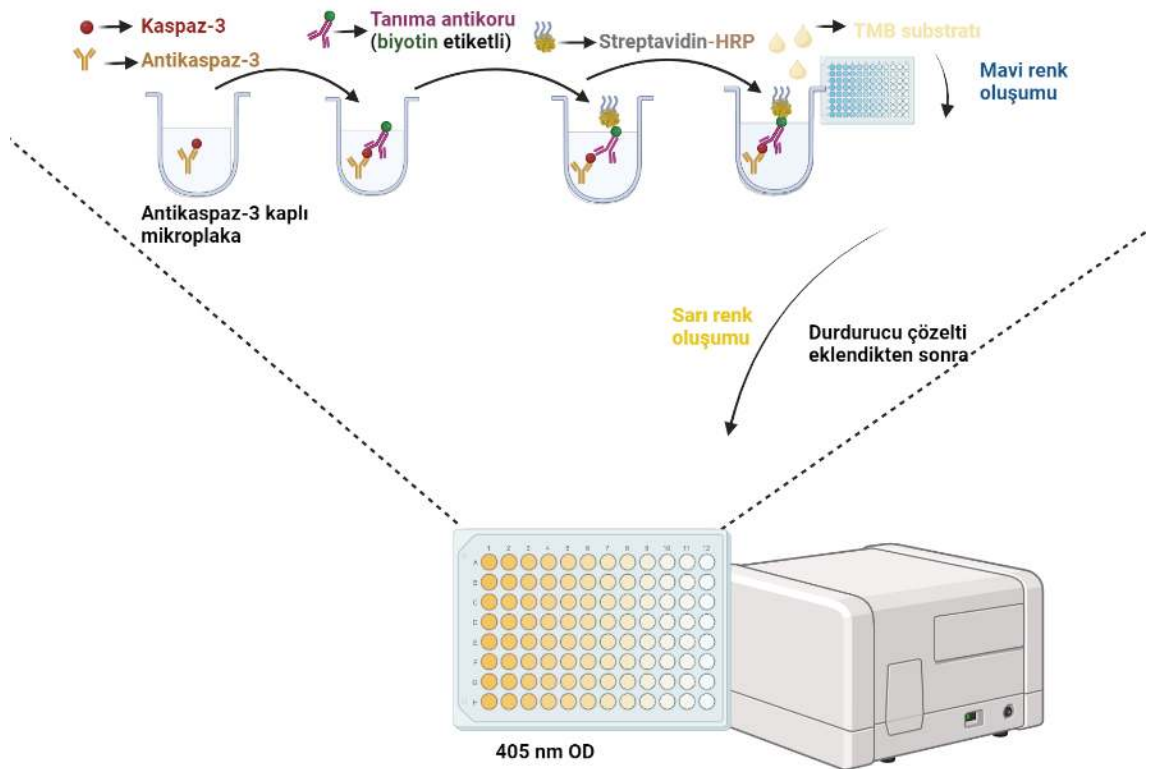
Kaspaz-3 biyosensörünün raf ömrü çalışmaları için 40 günlük periyotta, literatürdeki veriler dahilinde 25 ng/mL kaspaz-3 derişiminde biyosensörün yanıt akımı ölçüldü¹³². Bu ölçümlerden elde edilen akım verileri zamana karşı grafiğe geçirilerek raf

ömrü belirlendi. Bu amaçla kullanılan Au elektrot +4 °C'de biyoaktif tabakayla etkileşime girmeyecek şekilde üstü kapatılarak muhafaza edildi.

3.2.9. ELISA ile kaspaz-3 ölçüm prosedürü

Biovision's Kaspaz-3 ELISA kiti kullanılarak sandviç ELISA tekniği ile kaspaz-3 ölçümleri alındı. Testten 30 dakika önce tüm tepkenler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. Tüm tepken ve standart çözeltileri prosedürde verildiği şekilde hazırlandı. Aşağıdaki işlemler sırayla uygulandı:

1. Standart, örnek ve kontrol kuyucukları deneyden önce 2 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı.
2. Standart ve örnekten 100 µL alınarak uygun kuyucuklara eklendi ve plaka kapatıldı. 37 °C'de 1,5 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra kapak çıkarıldı ve kuyucuk içeriği yıkanmadan ve tamamen kurumasına izin verilmeden boşaltıldı.
4. Kuyucuklara 100 µL biyotinlenmiş tanıma antikoru eklendi ve plaka kapatıldı. 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Çözeltinin fazlası boşaltıldı ve 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. 1-2 dakika ıslanmasına izin verdikten sonra tüm kalan yıkama çözeltisi kuyucuklardan alındı. Son yıkamadan sonra, kalan yıkama tamponunu mikropipetle çekilerek atıldı.
5. Her kuyucuğa 100 µL SABC (StreptAvidin-Biyotin konjugat) çalışma çözeltisi eklendi, plaka kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Çözelti atıldı ve 5 kez yıkama çözeltisi ile tekrar yıkandı.
7. Her kuyucuğa 90 µL TMB (3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidin) substratı eklendi, plaka kapatıldı ve 37 °C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
8. Her kuyucuğa 50 µL durdurucu çözelti eklendi. Sonuçlar 20 dakika içinde 450 nm'de okundu.



Şekil 3.3. Kaspaz-3 ELISA kitinin ölçüm yöntemi.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS-20 programı kullanıldı. Biyosensör ve ELISA yöntem sonuçlarını karşılaştırmak için korelasyon testi yapıldı. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise sinyal değerlerinin ortalaması ($\bar{x}$), standart sapma (SD) ve varyasyon katsayıları (CV) hesaplandı. Her iki yöntemin performanslarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amacıyla ROC (Receiver Operating Characteristic, Alıcı İşlem Karakteristiği) analizi kullanıldı.

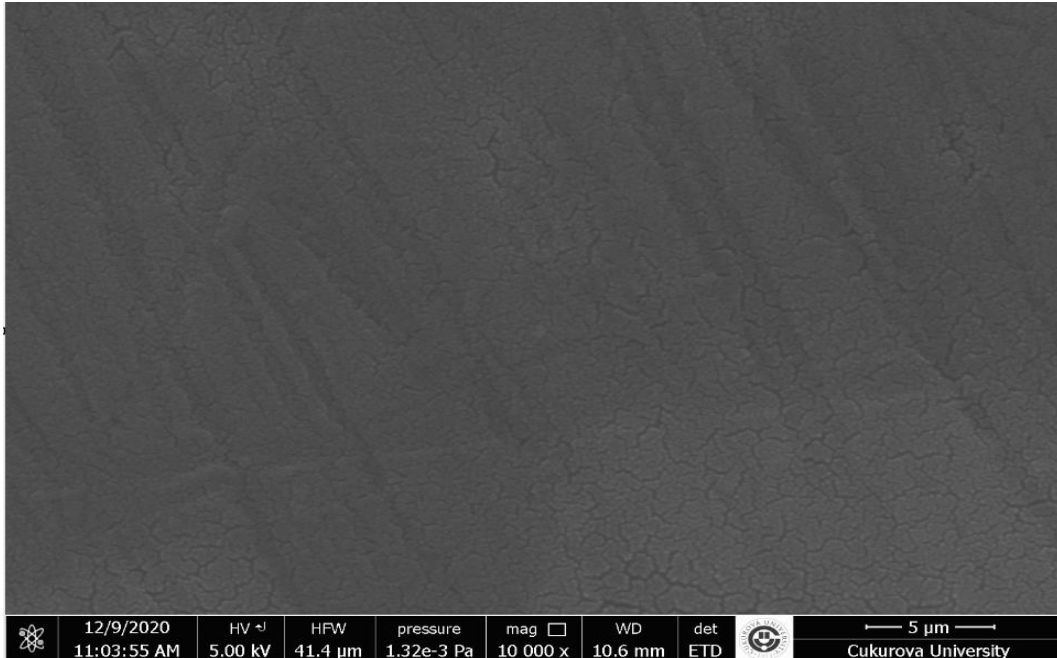
4. BULGULAR

4.1. Biyoaktif tabakanın SEM mikrograflarının incelenmesi

Kaspaz-3 biyosensör tasarımı için algılama performansındaki en önemli parametrelerden biri olan biyoaktif tabakayı ve buna bağlı olarak da en iyi yüzey özelliklerini gösteren polimeri seçmek amacıyla; Jelatin/BSA, Kitosan/Jelatin, Kitosan/Aljinat ve Aljinat/Jelatin kombine jeller kullanıldı. Geliştirilen kaspaz-3 biyosensörünün biyoaktif tabakasını oluşturan polimer sistemi ve immobilize kaspaz-3 antikorunun kaspaz-3 ile olan elektrot üzerindeki etkileşimi, mikroskobik yapıların ve yüzey morfolojisinin görüntülenmesi amacıyla, her oluşturulan tabaka için SEM analizi yapıldı.

4.1.1. Boş Au elektrodun SEM mikrografı

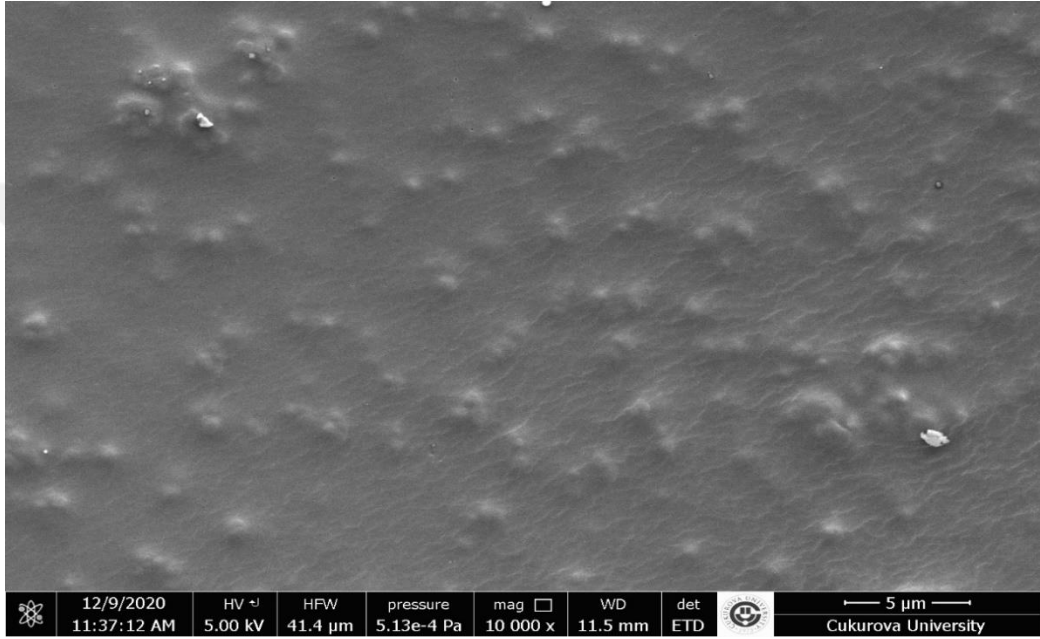
Kullanılan polimerler ile antikor-antijen etkileşimlerinin görüntülerinden önce boş Au elektrodun yüzey morfolojisini değerlendirmek amacıyla SEM mikrografı alındı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Boş Au elektrodun SEM mikrografı

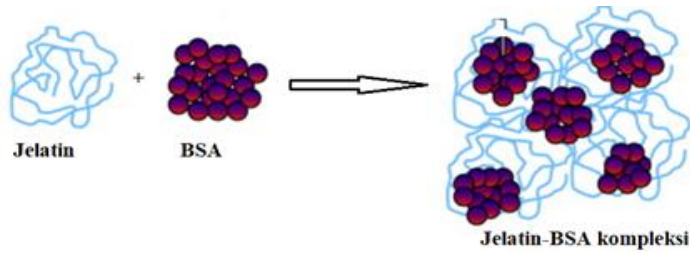
Şekil 4.1’de görülen boş Au elektrodun SEM mikrografi homojen ve pürüzsüz görünümündedir. İmmobilize edilmemiş Au elektrodun görüntüsü, sonraki basamaklarda kullanılacak olan jellerin ve biyolojik materyallerin etkileşimlerinin ve SEM görüntülerinin değerlendirilmesinde kolaylık sağlamıştır.

4.1.2. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA jeline ait SEM mikrografi



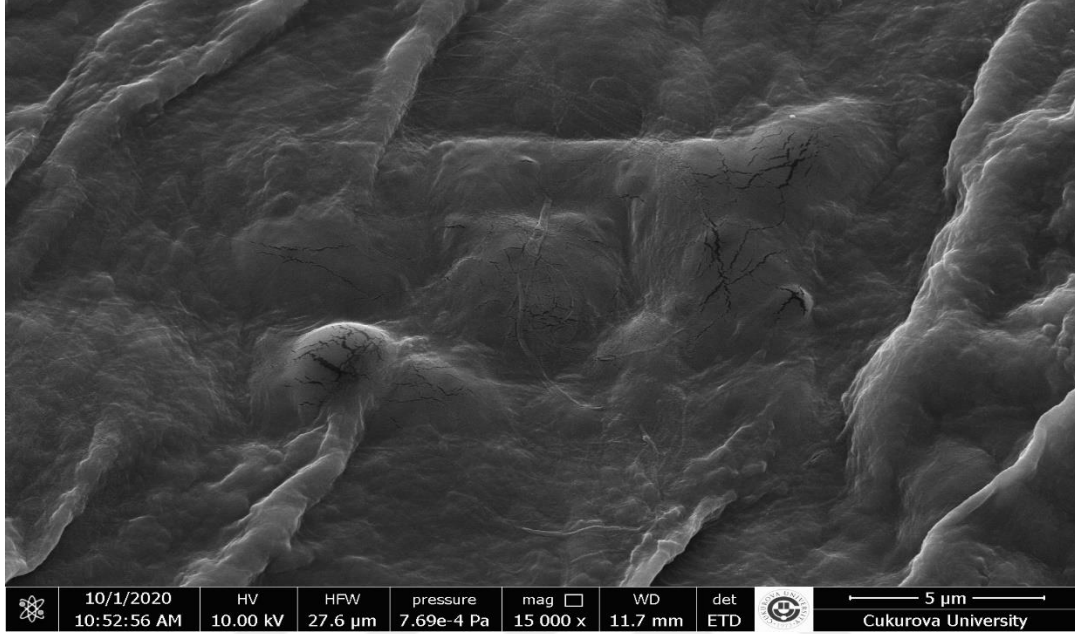
Şekil 4.2. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA jeline ait SEM mikrografi

Şekil 4.2’de görülen %7,5 Jelatin +%2,5 BSA jelinin Au elektrot üzerinde oluşturduğu görüntü, heterojen ve pürüzlü olup yoğun yüzey yapısına sahiptir. Bu oluşum Şekil 4.3’de görüldüğü gibi jelatin ve BSA arasında gözlemlenen yapısal (bobin konformasyon gibi) değişime benzer bir bileşik oluşumu ile sonuçlanmıştır.



Şekil 4.3. Jelatin ile BSA arasındaki etkileşim sırasında gözlemlenen yapısal değişikliklerin şekilsel gösterimi

4.1.3. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit tabakaya ait SEM mikrografi

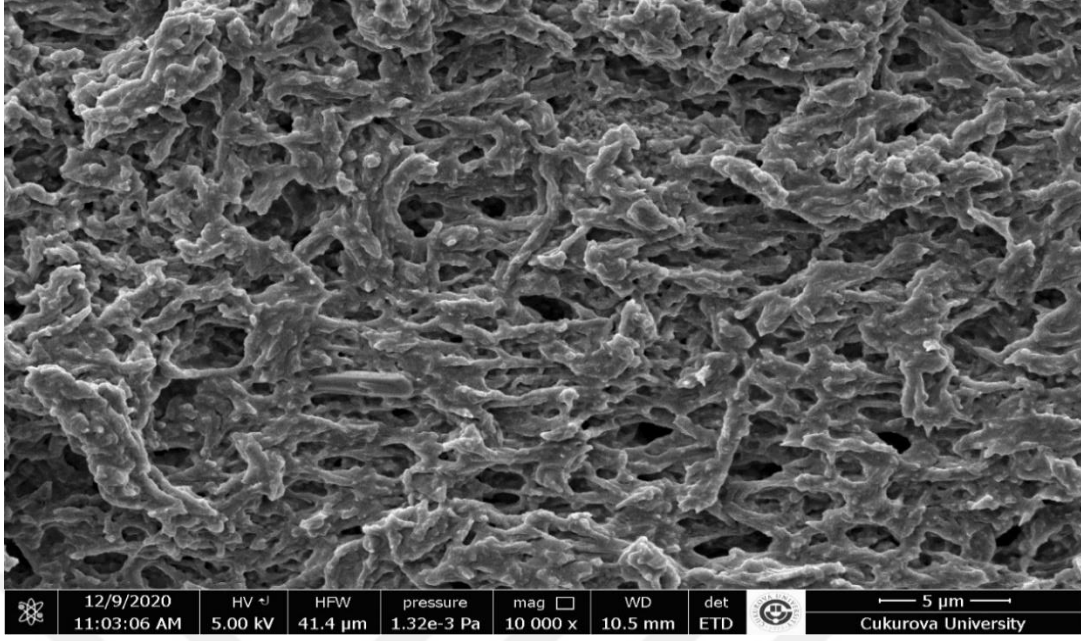


Şekil 4.4. %7,5 Jelatin +%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit tabakaya ait SEM mikrografi

Şekil 4.4'te elde edilen %7,5 Jelatin +%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit tabakaya ait SEM mikrografında sadece polimere ait tomurcuk benzeri yapıdan daha düzensiz, çıkıntılı yapının oluştuğu gözlemlenmektedir. Bu çıkıntılar, antikor ve çapraz bağlayıcı ile olan etkileşimler sonucu ortaya çıkmaktadır.

4.1.4. %7,5 Jelatin+%2,5 BSA+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3'e ait SEM mikrografi

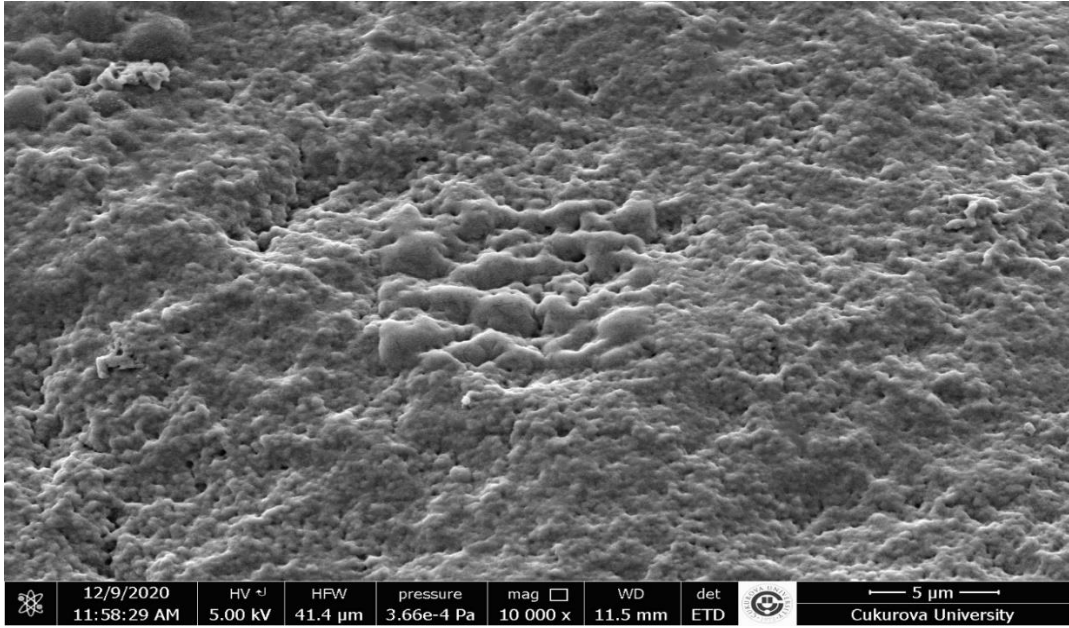
Şekil 4.5'te Jelatin-BSA polimer jele 10µg/mL antikaspaz-3'ün glutaraldehit ile immobilize edilmesinin ardından kaspaz-3 ile gerçekleştiği etkileşimin mikrografında daha kompakt ve lifsi bir yüzey oluştuğu görülmektedir. Jelatin/BSA karışımı, tepkime hücrelerinde tamponla karıştırıldığında tekrar jel oluşturma özelliğinden dolayı kararlılığını koruyamadığı gözlemlendi.



Şekil 4.5. %7,5 Jelatin+%2,5 BSA+10µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3 ait ait SEM mikrografi

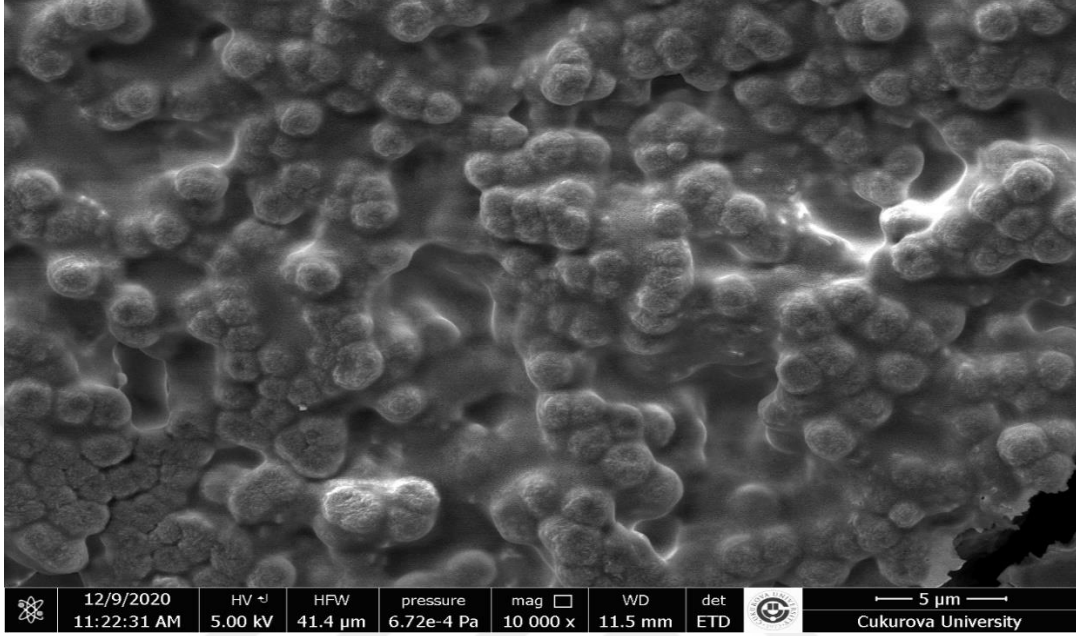
4.1.5. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatine ait SEM mikrografi

Şekil 4.6'da verilen %2,5 Kitosan+%7,5 Jelatine ait SEM mikrografında heterojen, az sayıda mikropor ve mezopor benzeri yapıların oluştuğu gözlenmektedir.



Şekil 4.6. %2,5 Kitosan+%7,5 Jelatine ait SEM mikrografi

4.1.6. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit'e ait SEM mikrografi

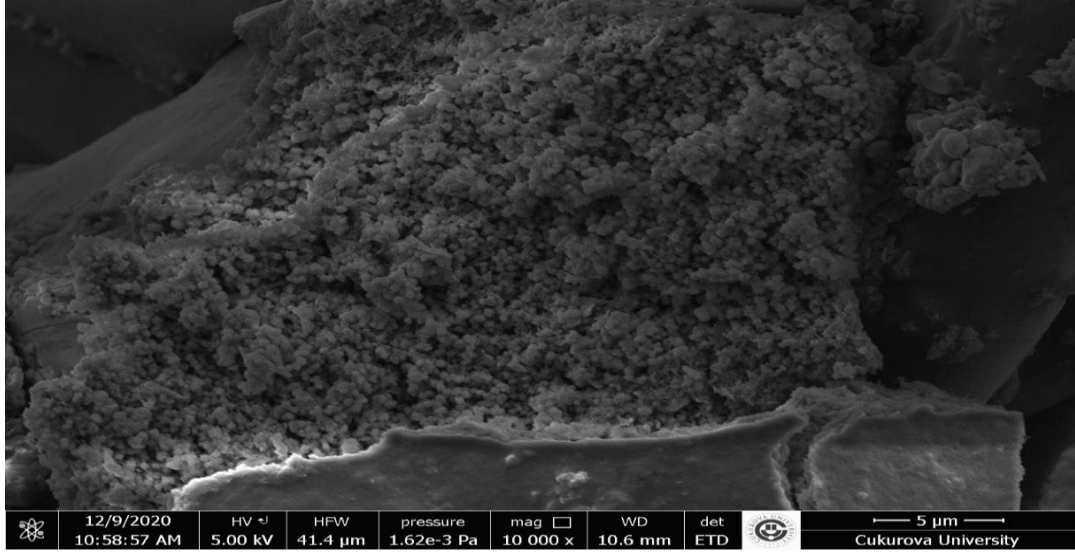


Şekil 4.7. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit'e ait SEM mikrografi

Şekil 4.7.'deki %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit'e ait SEM mikrografında ise elde edilen partiküllerin daha düzensiz ve homojen olmayan küresel morfolojilere (düzensiz partikül oluşumuna) sahip olduğu görülmektedir.

4.1.7. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3 ait SEM mikrografi

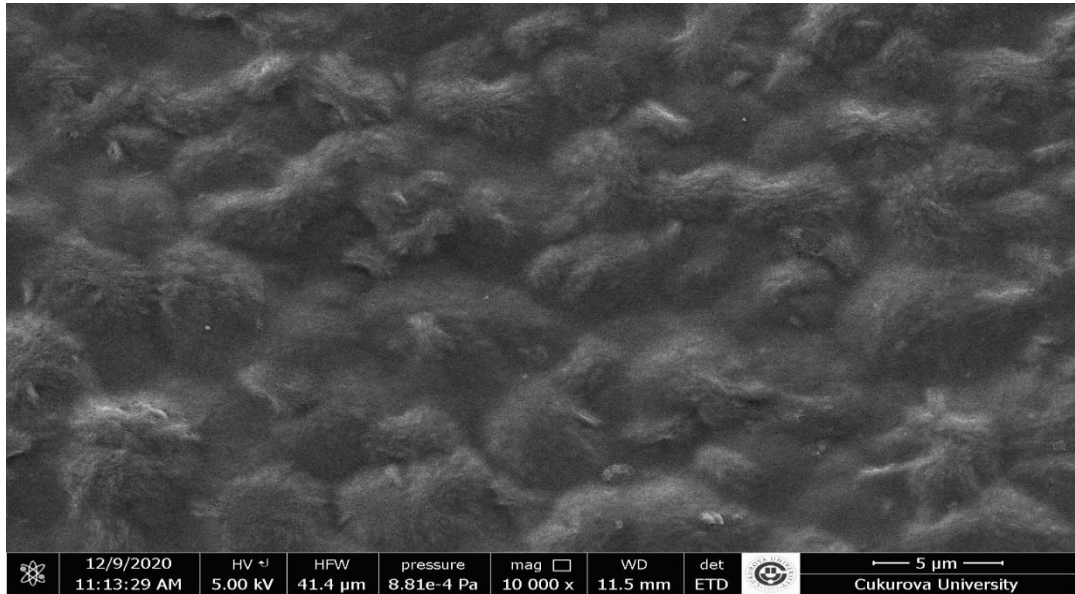
Şekil 4.8'deki %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3'e ait SEM mikrografında elde edilen yüzeyin farklı uygulama noktalarında benzer yapıların oluşmadığı heterojenite mevcuttur.



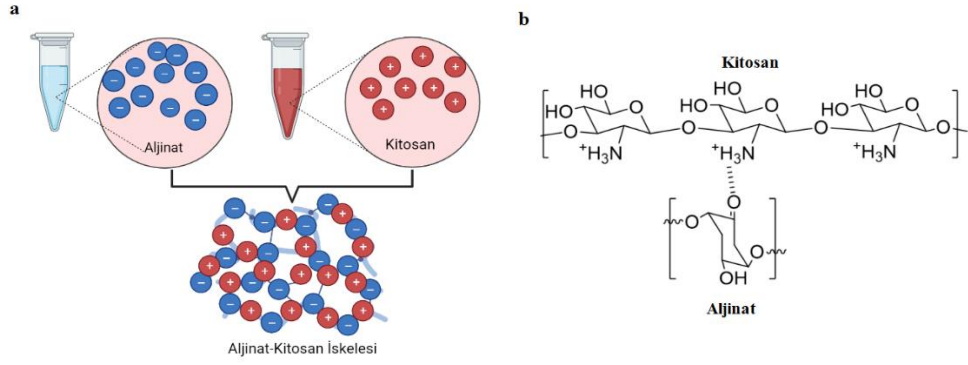
Şekil 4.8. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin+10 µg/mL Antikaspaz-3 +%2,5 Glutaraldehit+10 µg/mL Kaspaz-3'ün SEM mikrografi

4.1.8. %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan'a ait SEM mikrografi

Şekil 4.9'da elde edilmiş %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan'a ait SEM mikrografında aljinat heterojen partikül formunun kitosan ile etkileşimi sonucu Şekil 4.10'dakine benzer aljinat-kitosan iskelesine benzer düzensiz yapılar oluşturduğu görülmektedir.



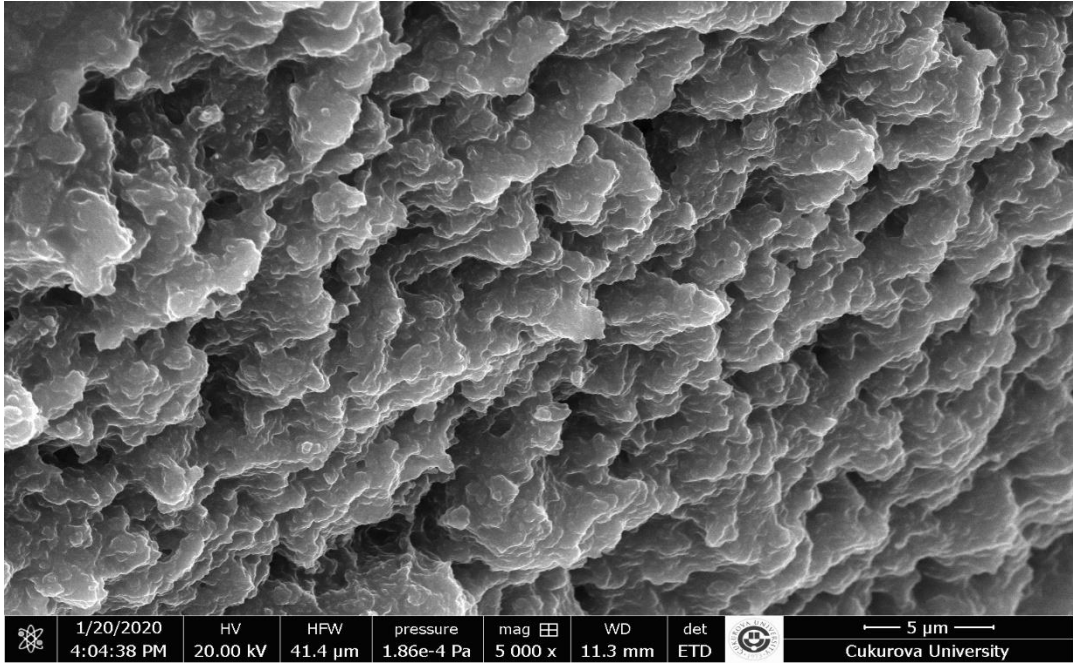
Şekil 4.9. %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan'a ait SEM mikrografi



Şekil 4.10. (a) Aljinat-Kitosan iskelesinin şematik gösterimi. (b) İskelenin kimyasal yapısı.

4.1.9. %1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10 µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS'e ait SEM mikrografı

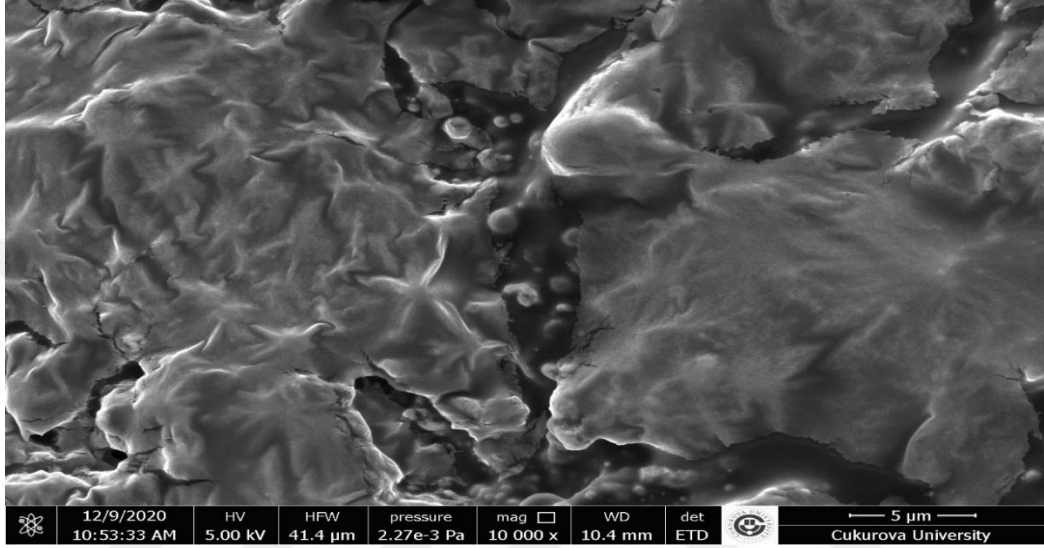
%1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10 µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS'ye ait SEM mikrografı Şekil 4.11'de verilmiştir. Sadece aljinat ve kitosandan oluşan polimerin yapısına göre yüzeyin tepe noktaları ve çukur derinliklerinin arttığı görülmektedir.



Şekil 4.11. %1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10 µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS'e ait SEM mikrografı

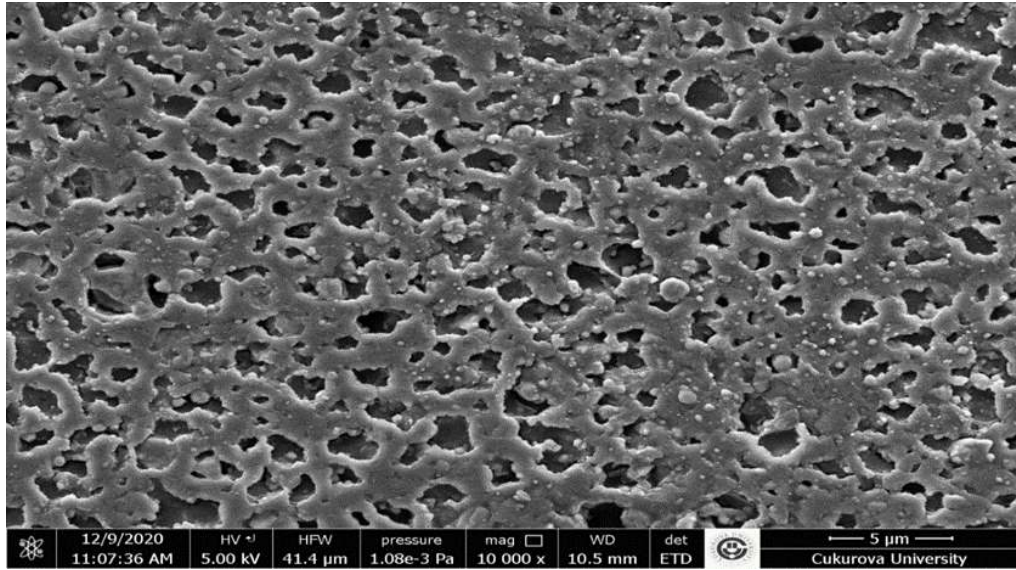
4.1.10. %1 Aljinat +%2,5 Kitosan +10µg/mL kaspaz-3 antikor +EDC/NHS+10µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografi

Şekil 4.12'de %2,5 Kitosan + %1 Aljinat + 10 µg/mL kaspaz-3 antikor + EDC/NHS +10 µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografında ise tüm etkileşimler sonucunda 3 boyutlu yapıda konformasyonel değişimler geçirdiği görülmektedir.



Şekil 4.12. %2,5 Kitosan+%1 Aljinat+10 µg/mL kaspaz-3 antikor+EDC/NHS+10 µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografi

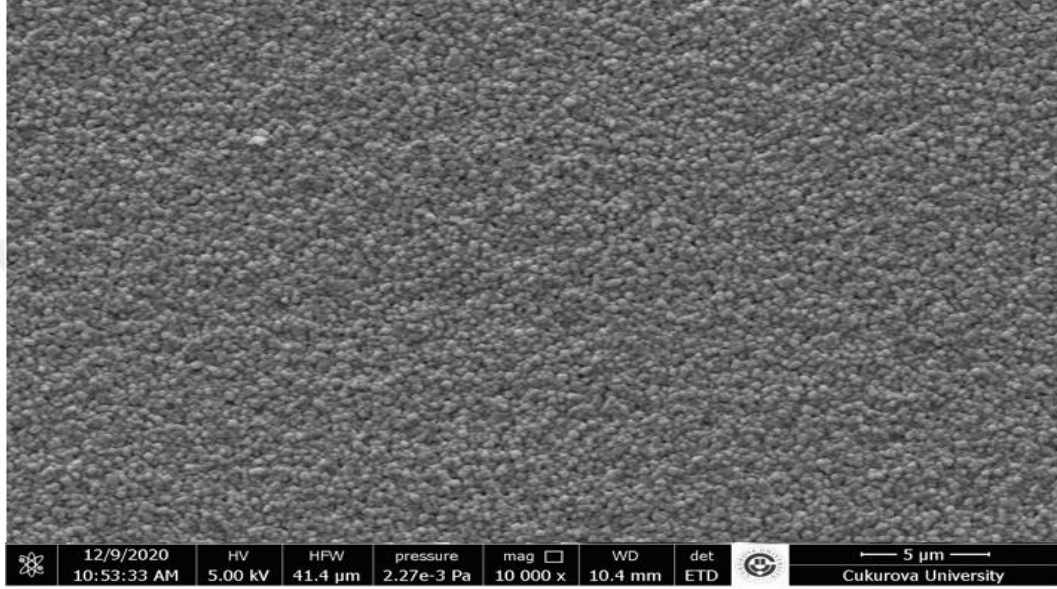
4.1.11. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin' e ait SEM mikrografi



Şekil 4.13. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin' e ait SEM mikrografi

Şekil 4.13’de görülen %1 Aljinat-%7,5 Jelatin’ e ait SEM mikrografında yüzeyde yoğun olarak farklı çap ve geometride porlara sahip, köpük benzeri bir morfoloji görülmektedir.

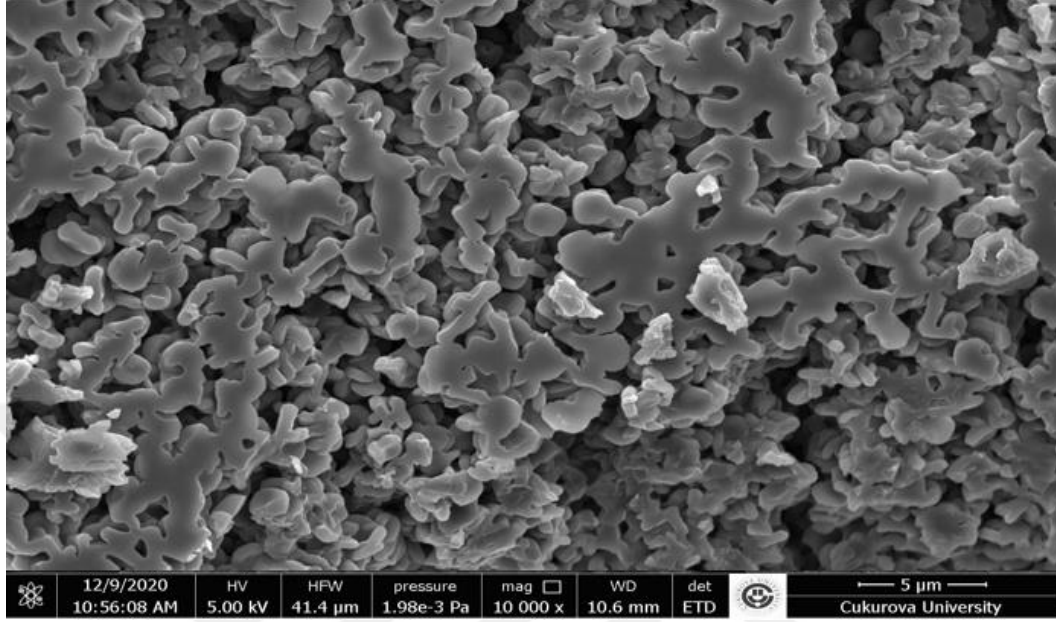
4.1.12. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin+EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3’e ait SEM mikrografı



Şekil 4.14. %1 Aljinat+ %7,5 Jelatin+ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3’e ait SEM mikrografı

Şekil 4.13’de görülen aljinat-jelatin yapısındaki porların bir sonraki aşamada biyoaktif tabaka sistemine dahil edilen kaspaz-3 antikor ve EDC/NHS ile bileşik oluşturabileceği uygun çukur benzeri formasyonlar gözlemlenmişti. Şekil 4.14’de %1 Aljinat-%7,5 Jelatin polimer yapının üzerine tek tabaka olacak şekilde hazırlanmış yüzeye antikor ile çapraz bağlayıcı varlığında yapıdaki değişim SEM mikrografında görülmektedir. Mikrografta elde edilen por ve genel yüzey alanının tamamen kaplanmış durumda olduğu net bir şekilde görülmektedir.

4.1.13. %1 Aljinat-%7,5 Jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3+10 µg/mL kaspaz-3'e ait SEM mikrografi



Şekil 4.15. %1 Aljinat-%7,5 jelatin/EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3+ 10 µg/mL kaspaz-3'ün SEM mikrografi

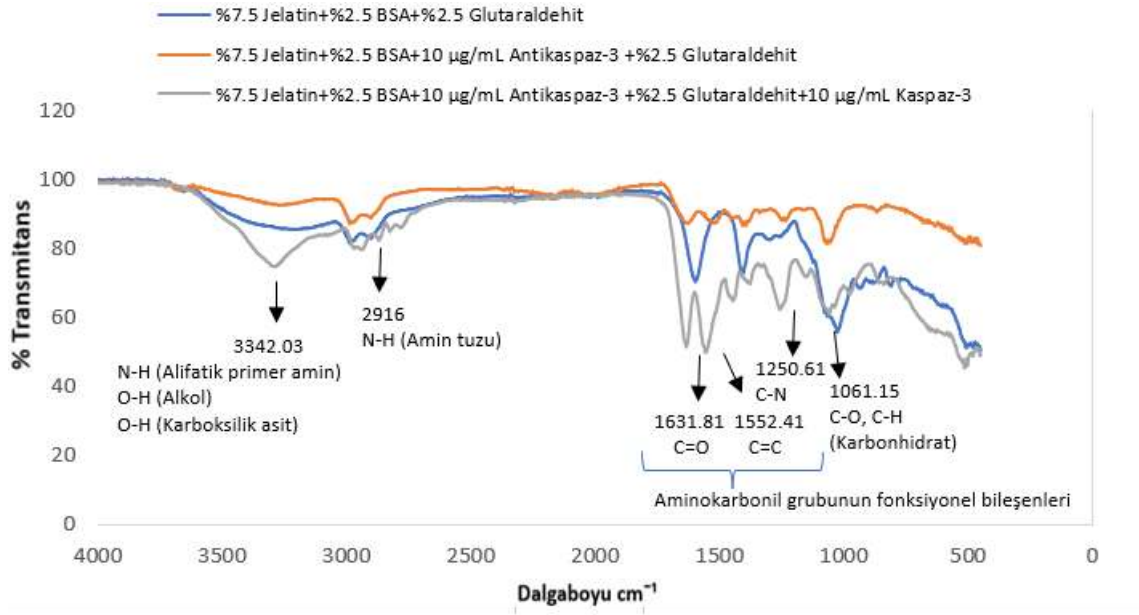
Şekil 4.15'de görülen mikrografa ise %1 Aljinat-%7,5 jelatin/EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)/10 µg/mL Antikaspaz-3 ile kaplı yüzeye kaspaz-3'ün de immobilize edilmesiyle 3 boyutlu farklı derinliğe sahip amorf bir yapı oluştuğu görülmektedir.

4.2. FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi

4000-400 cm^{-1} spektrum aralığındaki (Orta kızılötesi spektroskopi, MIR), bölgede elektromanyetik radyasyon ile moleküllerin etkileşimine dayalı olarak polimer ve antijen-antikor etkileşimlerini tanımlamak için FTIR kullanıldı. FTIR spektroskopisi moleküler titreşimlerin bağ kuvvetlerine ve konfigürasyonlarına duyarlılığı nedeniyle, yüzey modifikasyonunda ve işlevselleştirmede kimyasal bileşim karakterizasyonları hakkında önemli değerlendirmeler ve bilgiler elde etmek için güçlü yöntemlerden biridir.

4.2.1. %7,5 Jelatin+%2,5 BSA polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrum karşılaştırması

Şekil 4.16'da %7,5 Jelatin ve %2,5 BSA polimerinin oluşturduğu biyoaktif tabakanın antikaspaz-3 ve kaspaz-3 antijeninin etkileşimi sonucundaki kıyaslamalar aynı grafik üzerinde gösterilmektedir.

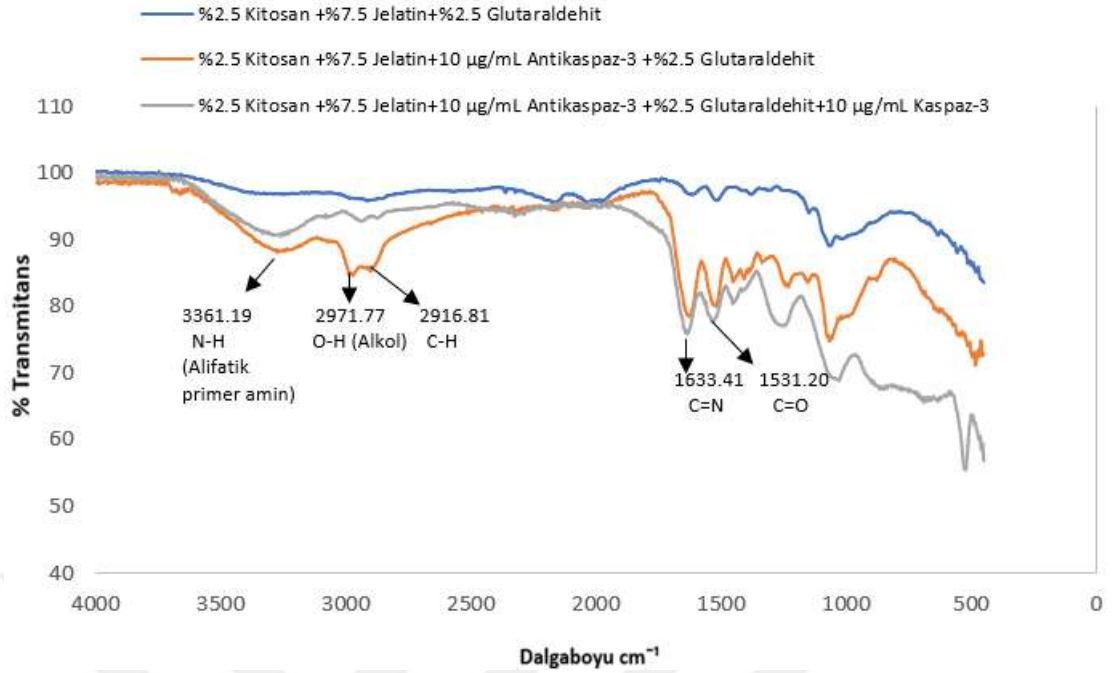


Şekil 4.16. %7,5 Jelatin+%2,5 BSA polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumları

3342,03 cm⁻¹ dalga boyu Amit-A bölgesinde olup hidrojen bağı ve serbest –OH ile birleştirilmiş –NH gerilmesini göstermektedir. 2916 cm⁻¹ dalga boyunda ise yine polimerlere ait amin gruplarına özgün pik olarak ortaya çıkmaktadır. 2000-500 cm⁻¹ bölgesindeki 1631,81 (C=O), 1552,41 (C=C) ve 1250,61 (C–N) ve 1061,15 (C–O, C–H) gerilme pikleri görülmektedir.

4.2.2. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrum karşılaştırması

Şekil 4.17'de %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumu, immobilize edilen antikaspaz-3 içeren spektrum ve kaspaz-3 ile etkileşimin olduğu son tabakanın da analizi yapılarak aynı grafik üzerindeki değişimler gösterilmektedir.

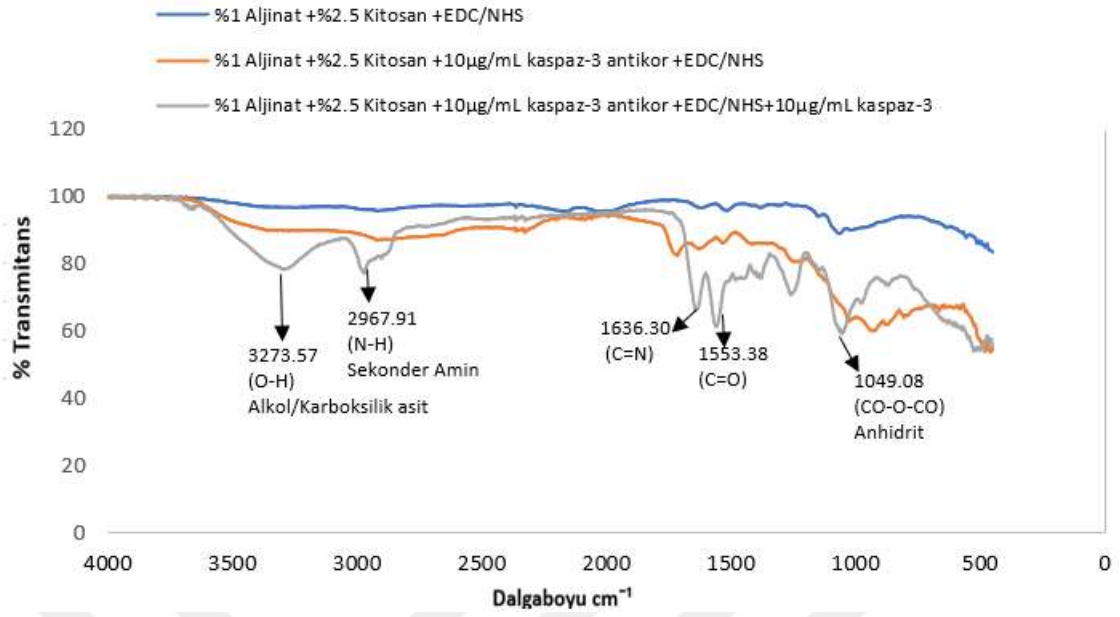


Şekil 4.17. %2,5 Kitosan +%7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumları

2916 cm^{-1} 'deki pik, C–H simetrik gerilmeye bağlı olarak tanımlanmıştır. Bu pik, polisakkaritin tipik özelliğidir ve ksilan, glukanlar ve karragenanlar gibi diğer polisakkarit spektrumlarında bulunur. 3361 cm^{-1} bölgesindeki geniş bant, kitosanın molekül içi hidrojen bağlarının yanı sıra N–H ve O–H gerilmesine karşılık gelmektedir. 2916 cm^{-1} piki ise jelatine özgün olup, 1633 cm^{-1} deki kitosan, jelatin ve glutaraldehitin de oluşturduğu C=N bağı görülmektedir. Yine kitosanın serbest kalan C=O ve C–H bağları da (1633,41 ve 1531,20 cm^{-1}) görülmektedir.

4.2.3. %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrum karşılaştırması

Şekil 4.18'de %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan polimerinden oluşan biyoaktif tabaka ve bu tabaka üzerindeki antikaspaz-3 ve kaspaz-3 etkileşiminin kıyaslandığı FTIR spektrumları görülmektedir.

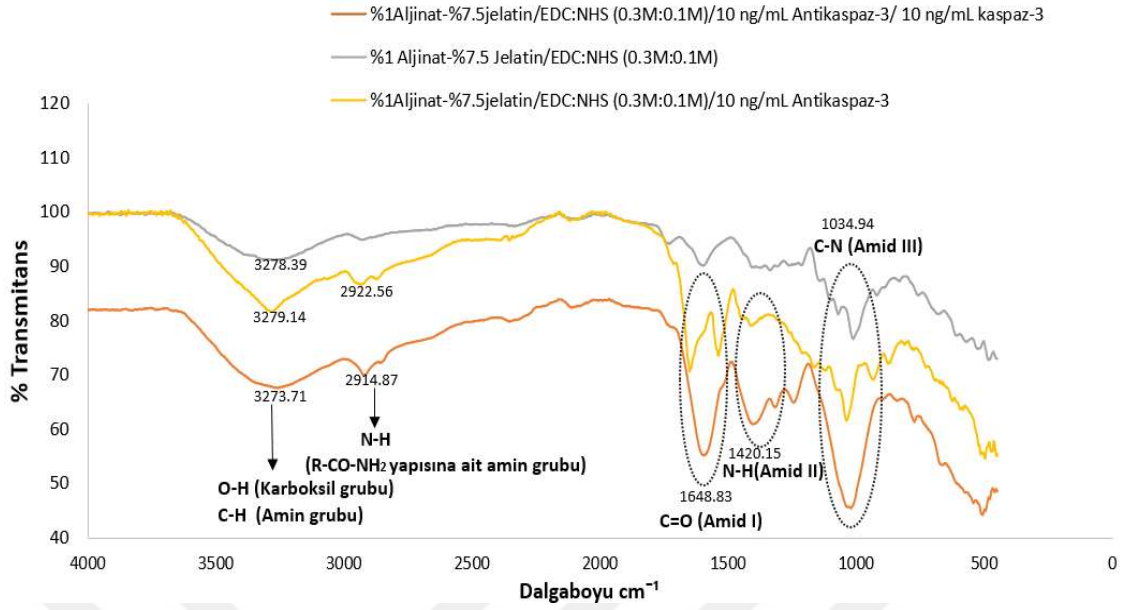


Şekil 4.18. %1 Aljinat+ %2,5 Kitosan polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumları

Şekil 4.18’de aljinat/kitosanın $3273,57\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{OH}$ esneme), 2967 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$ esneme), $1636,30\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{N}$ esneme) ve $1553,38\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$ esneme) olmak üzere dört pik değerinde kayma olduğu görülmektedir.

4.2.4. %1 Aljinat- %7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabakanın FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

Şekil 4.19’da %1 Aljinat+ %7,5 Jelatin polimerinden oluşan biyoaktif tabaka ve bu tabaka üzerindeki antikaspaz-3 ve kaspaz-3 etkileşiminin kıyaslandığı FTIR spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.19. %1 Aljinat- %7,5 jelatin polimerlerin kullanıldığı biyoaktif tabakanın FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

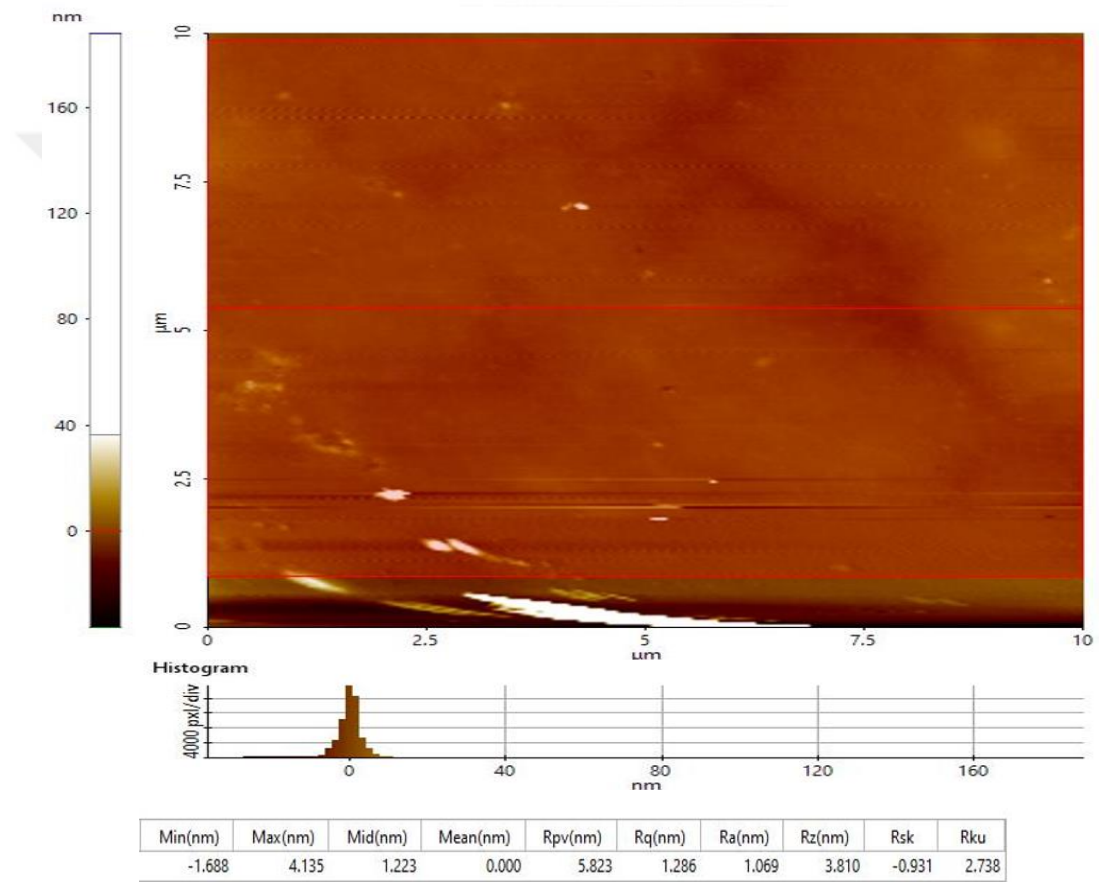
Biyoaktif tabaka oluşumun her 3 basamağının kıyaslandığı spektrum grafiğinde 3273,71, 3279,14 ve 3278,39 cm^{-1} bölgesindeki karboksil grubuna ait O–H titreşim pikleri ve amin grubuna ait C–H pikleri görülmektedir (Şekil 4.19). 2914,87 ve 2922,56 cm^{-1} pikleri ise aljinatın negatif gruplarının jelatinin pozitif grupları ile etkileşimi sonucu oluşan polielektrolit bileşiklerdeki (PEC) R–CO–NH₂ grubuna ait N–H titreşim pikidir. 1648,83 cm^{-1} Amit I bağına ait C=O gerilme titreşiminden, 1420,15 cm^{-1} Amit II bağına ait N–H bükülmesinden, 1034,94 cm^{-1} Amit III bağına ait C–N gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Etkinleştirilmiş biyoaktif tabakadaki moleküllerin Amit I, Amit II ve Amit III bağlarına ait transmittans değişimleri antijen-antikor etkileşimleri nedeniyle % transmittansdaki azalma olarak görülmektedir. Ayrıca 1034 cm^{-1} bölgesindeki Schiff bazının C=N değerine karşılık gelen soğurma bantı polimerler arasındaki kovalent çapraz bağlanmayı kanıtlamaktadır. 1000-500 cm^{-1} bölgesindeki oluşan farklı küçük pikler, aljinat halkasındaki piranoz gruplarının C–H ve O–H titreşimlerine aittir.

Tüm işlevsel gruplar için sadece polimere ait spektrumdaki transmittans yüzdesi, antikaspaz-3 ve kaspaz-3 etkileşimini içeren forma göre ~ %20 oranında azalarak güçlü absorbands artışı ile yapısal değişimin gerçekleştiği görülmektedir.

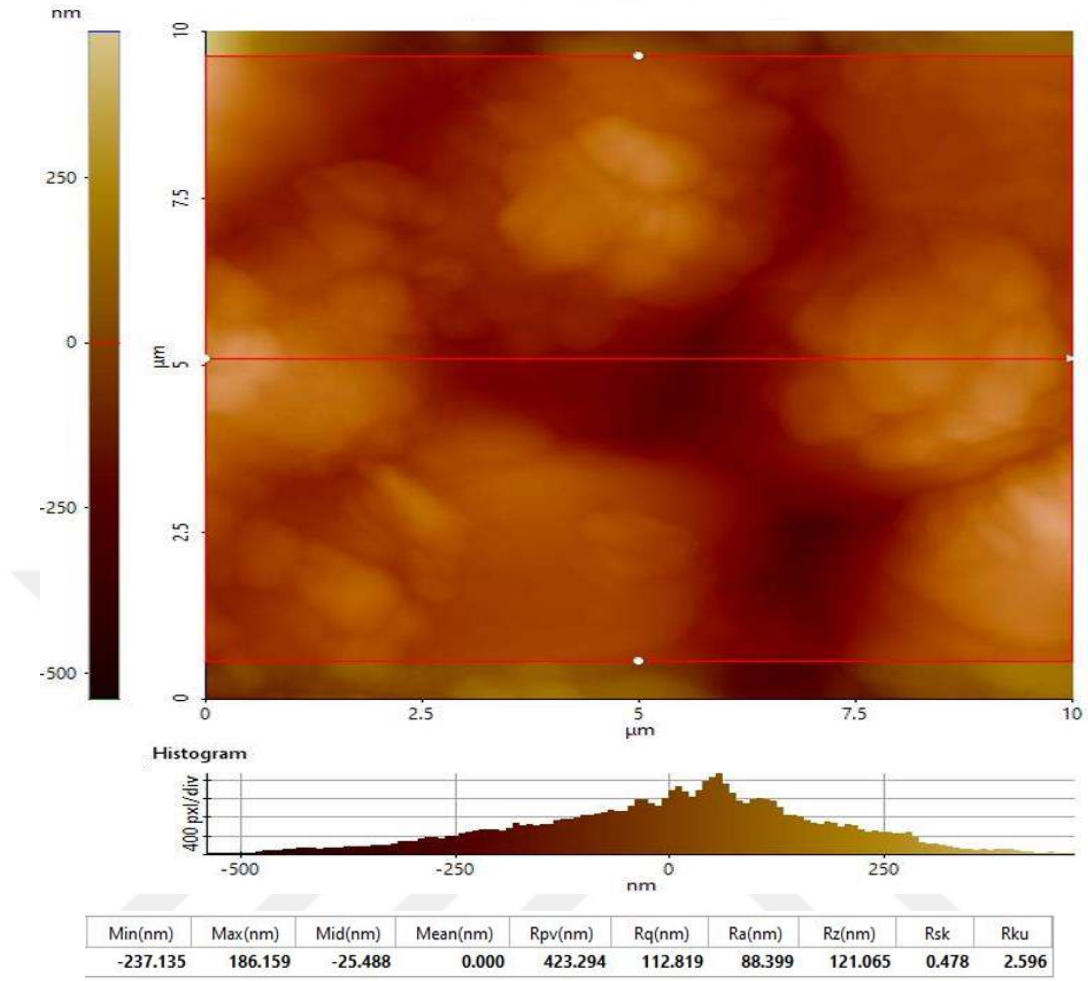
FTIR spektrumundan elde edilen veriler, SEM sonuçlarından elde edilen jel polimer verileri ile paralellik gösterdiğinden çalışmalara aljinat-jelatin ile devam edildi.

4.3. AFM analizlerinin değerlendirilmesi

Kaspaz-3 antijeninin polimerlerle ve antikaspaz-3 ile olan etkileşiminin topolojik görüntüsünü değerlendirmek için yüzey pürüzlülük ölçümlerinden AFM analizini kullanıldı.



Şekil 4.20. %1 Aljinat-%7,5 jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M) polimerine ait AFM görüntüsü, histogramı ve istatistiği



Şekil 4.21. %1 Aljinat-%7,5 jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M)+ 10 ng/mL Antikaspaz-3-Kaspaz-3 etkileşimine ait AFM görüntüsü, histogramı ve istatistiği

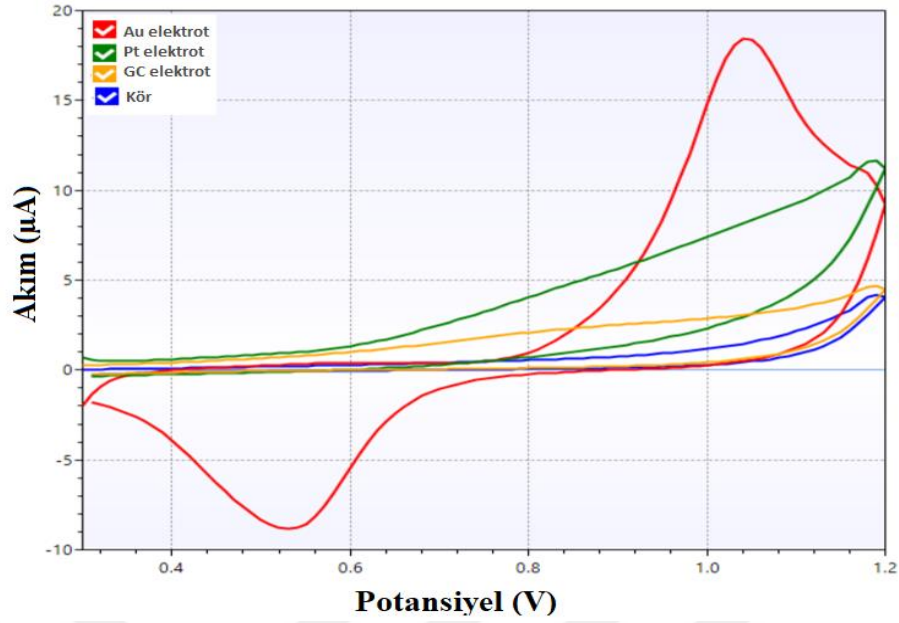
AFM görüntülerini elde etmek amacıyla ilk olarak %1 Aljinat-%7,5 jelatin/ EDC/NHS (0,3 M:0,1 M) polimer ve EDC/NHS, Au elektrot üzerinde yüzeye tutunması sağlanarak kurutuldu (Şekil 4.20). Bu polimer üzerindeki antijen-antikor etkileşimini görmek amacıyla 10 ng/mL Antikaspaz-3-Kaspaz-3 karışımı eklenerek yüzey üzerindeki değişime ait görüntülerin yanı sıra histogram ve istatistikleri de elde edildi (Şekil 4.21). Biyoaktif tabakanın yapısal analizi için kullanılan AFM’de yüzeyin aritmetik ortalama pürüzlülüğüne (Ra değeri, nm cinsi) ya da ortalama pürüzlülük değerin kareköküne (Rq, nm cinsi) bakılmaktadır. Ra, yüzey profilinin üzerindeki yükseklik dalgalanmalarının mutlak değerinin aritmetik ortalamasını ifade eder. Daha yüksek Ra değerleri, yüzeyin daha pürüzlü olduğunu gösterir. Rq, yüzeydeki dalgalanmaların genel dağılımını dikkate alarak hesaplanan bir değerdir. Ra’ya benzer

şekilde, yüksek Rq değerleri de daha pürüzlü bir yüzeyi gösterir¹³³. Buradaki pürüzlülük, elde edilen tabaka üzerindeki immobilizasyon başarısı hakkında da bilgi verecektir. Bu görüntülerde yüksek noktalar açık renk (sarıya yakın tonlar), alçak noktalar ise daha koyu renkler (kahverengi ve siyaha yakın tonlar) ile belirtilmektedir. Şekil 4.21'deki antikaspaz 3 ve kaspaz 3 etkileşimine ait AFM görüntüsünde Ra ve Rq değerleri sırasıyla 88,399 nm ve 112,819 nm iken, Şekil 4.20'deki görüntüsünde verilen polimer yüzeye ait Ra ve Rq değerleri ise 1,069 nm ve 1,286 nm'dir. Bu değerler kaspaz 3 ve antikaspaz 3 etkileşimi sonucunda yüzey pürüzlülüğünün polimer yüzeye göre çok daha fazla arttığını ve biyomoleküllerin aktif tabakaya başarılı immobilizasyonunu kanıtlamaktadır. Örneklerdeki taranan tüm alan üzerindeki yüzey yükseklikleri dağılımı Gauss tipi olup histogramlarda asimetri gözlenmemiştir.

4.4. Çalışma koşullarının optimizasyonu

4.4.1. Çalışma elektrodunun belirlenmesi

Çalışma elektrodu, biyokimyasal tepkimelerde dönüştürücü öge olarak görev yaparken, karşı elektrot çalışma elektrotuna bir akım uygulanabilmesi için elektrolitik çözeltiyle bir bağlantı kurar. Bu elektrotlar hem iletken hem de kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Çözeltideki türler ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron aktarım mekanizmasını incelemek için 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ varlığında gerçekleştirilen CV deneylerinde kullanılmamış (boş) Au (altın, 1,6 mm çap), GC (camsı karbon, 3,0 mm çap) ve Pt (platin, 1,6 mm çap) elektrotlarla analiz gerçekleştirildi. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi yükseltgenme piki 18 μA ve indirgenme piki -9 μA olan altın çalışma elektrodu, platin ve karbon elektrotlara göre daha yüksek akım değerleri ile sonuç verdiği için en uygun elektrot olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Au, Pt ve GC çalışma elektrotlarının karşılaştırılması

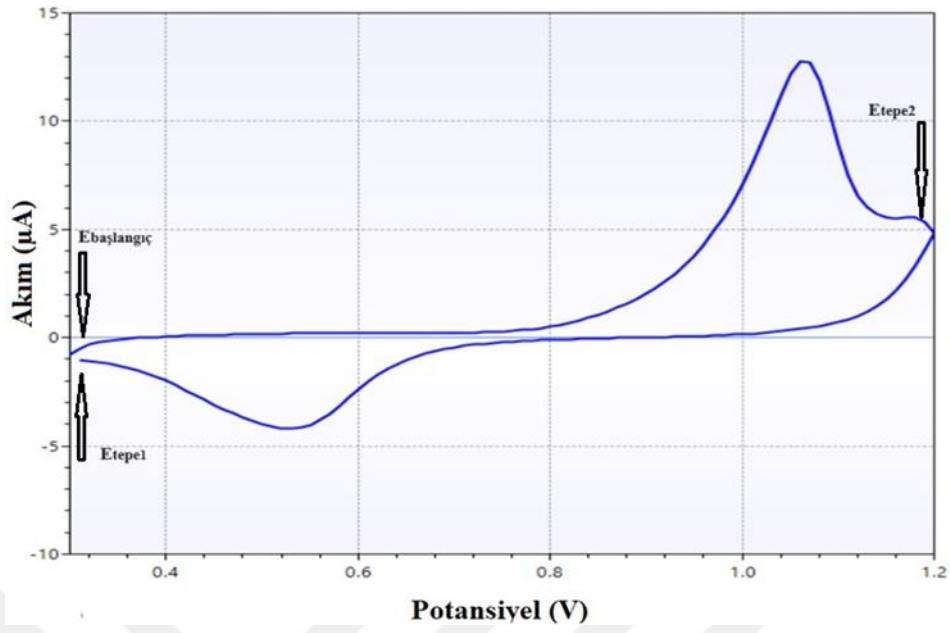
4.4.2. Elektrokimyasal çalışma aralığının optimizasyonu

Çalışma aralığı, bir sinyalin analitin derişiminin ölçülmesine izin verdiği aralığı tanımlar. Bu çalışmada da kaspaz-3 ölçümüne izin veren potansiyel aralığı belirlemek için farklı başlangıç ve bitiş potansiyelleri uygulanmıştır. Uygulanan akıma karşı oluşan potansiyel eğri, döngüsel voltametrinin tamamlandığı görülen net aralık 0,3-1,2 V olarak belirlendi (Şekil 4.23). Döngüsel voltametride, iki tepe potansiyeli $E_{tepe 1}$ ve $E_{tepe 2}$ arasında bir döngüsel potansiyel taraması gerçekleştirilir. Tarama, bu tepe potansiyellerinden birinde veya aralarında herhangi bir yerde başlayabilir. Sisteme ait çalışma parametreleri ise şu şekildedir;

Çizelge 4.1. Biyosensöre ait çalışma parametreleri

Değişken	Voltaaj
$E_{başlangıç}$	0,3 V
$E_{tepe 1}$	0,3 V
$E_{tepe 2}$	1,2 V
$E_{adım}$	0,01 V
Uygulanan tarama hızı	0,05 V/s

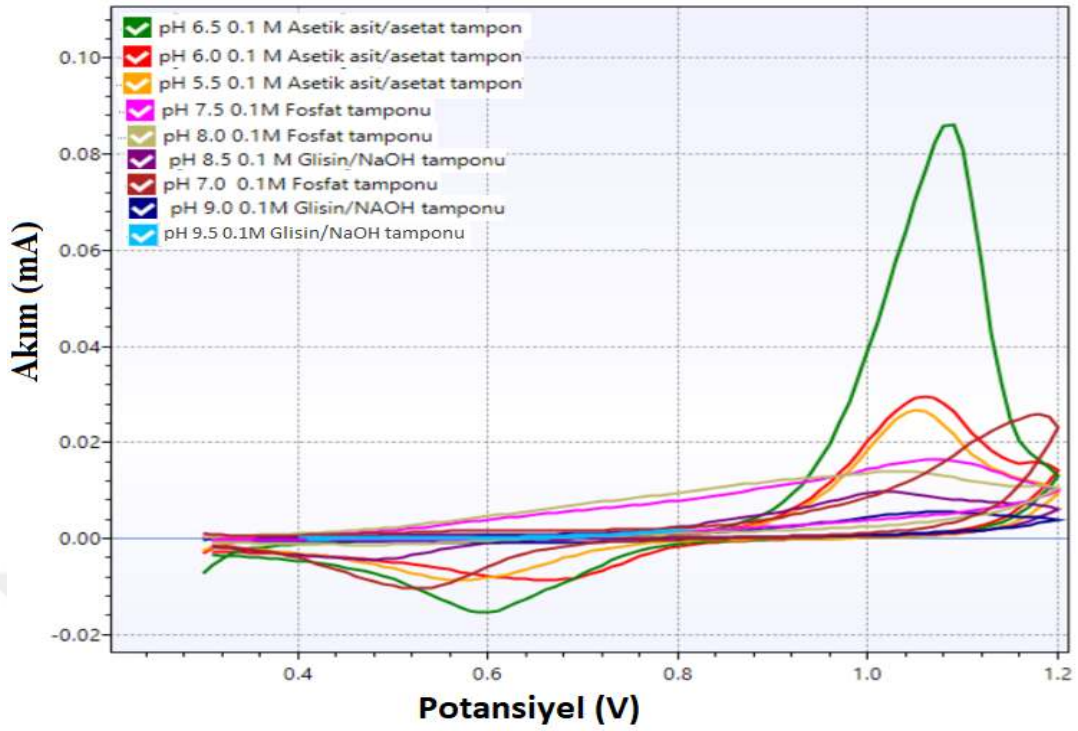
* Not: $E_{başlangıç}$: Taramanın başladığı ve durduğu potansiyel; $E_{tepe 1}$: Tarama yönünün tersine döndüğü ilk potansiyel; $E_{tepe 2}$: Tarama yönünün tersine döndüğü ikinci potansiyel; $E_{adım}$: Potansiyel adım büyüklüğü



Şekil 4.23. Çalışma aralığının belirlenmesi

4.4.3. pH-Tampon optimizasyonu

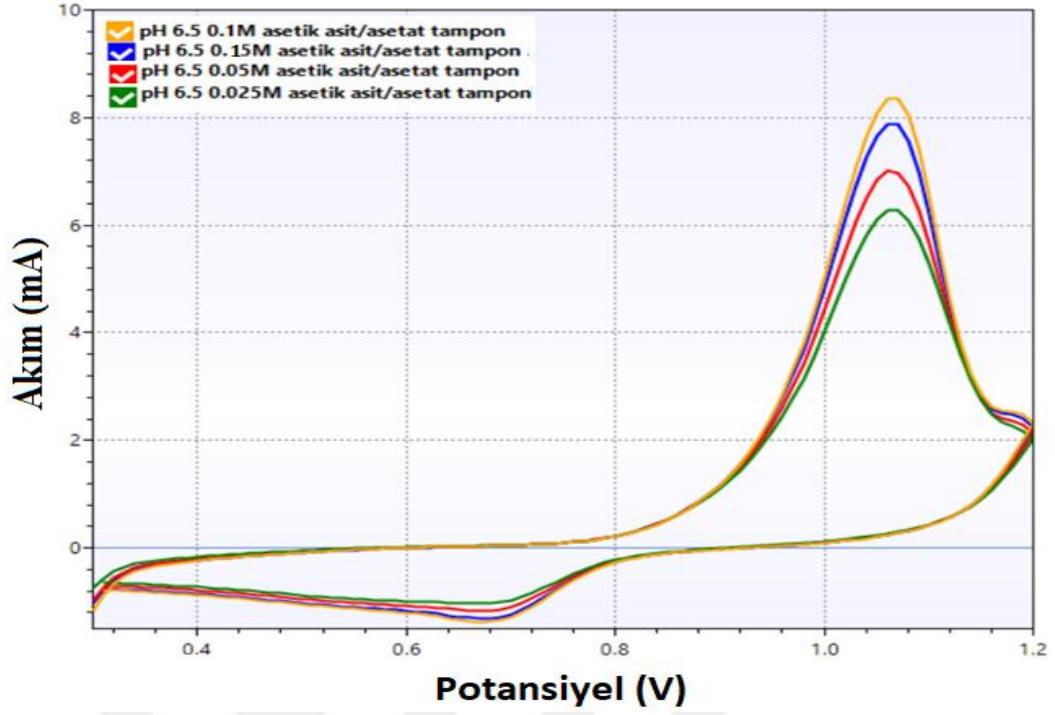
Optimum pH değerini belirlemek için deney ortamının pH'si; asetat tamponu ile pH 5, 5,5, 6, 6,5, fosfat tamponu ile pH 7, 7,5, 8 ve glisin tamponu ile pH 8,5, 9, 9,5 olacak şekilde değiştirilerek ölçümler alındı. Yapılan ölçümler sonucunda anodik-katodik piklerdeki maksimum akım değerleri 0,085 mA ile -0,005 mA ile en fazla direnç, pH 6,5'de 0,1 M asetat tamponu ile gözlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Optimum tampon-pH grafiği

4.4.4. Tampon derişiminin optimizasyonu

Elektrokimyasal olarak en iyi yanıtın görüldüğü tampon derişimini belirlemek için bir önceki çalışma ile belirlenen pH 6,5 asetat tamponunun farklı derişimleri (0,1 M, 0,15 M, 0,05 M ve 0,025 M) ile yanıt üzerindeki etki değerlendirilmiştir. Tampon derişimleri arasında 0,8 mA'lık akım farkları oluştu ve en yüksek akım (8,8 mA) asetat tamponunu 0,1 M olduğu derişimde gözlenmiştir (Şekil 4.25)

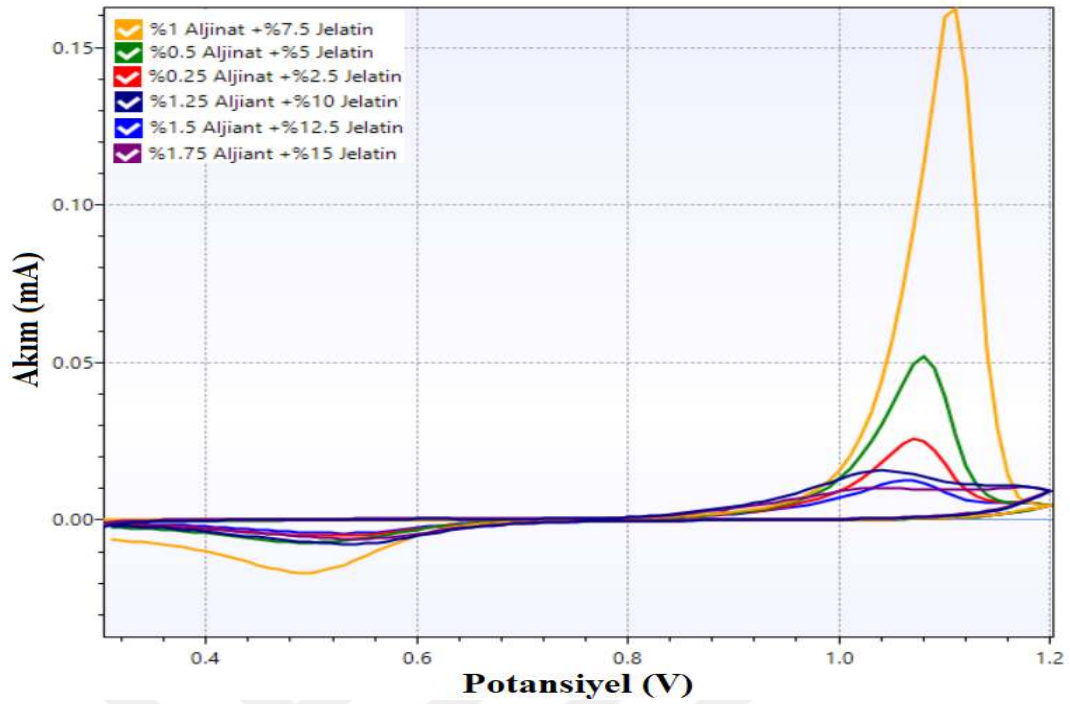


Şekil 4.25. Optimum tampon derişim grafiğı

4.5. İmmobilizasyon parametrelerinin optimizasyonları

4.5.1. Jel bileşenlerinin optimizasyonu

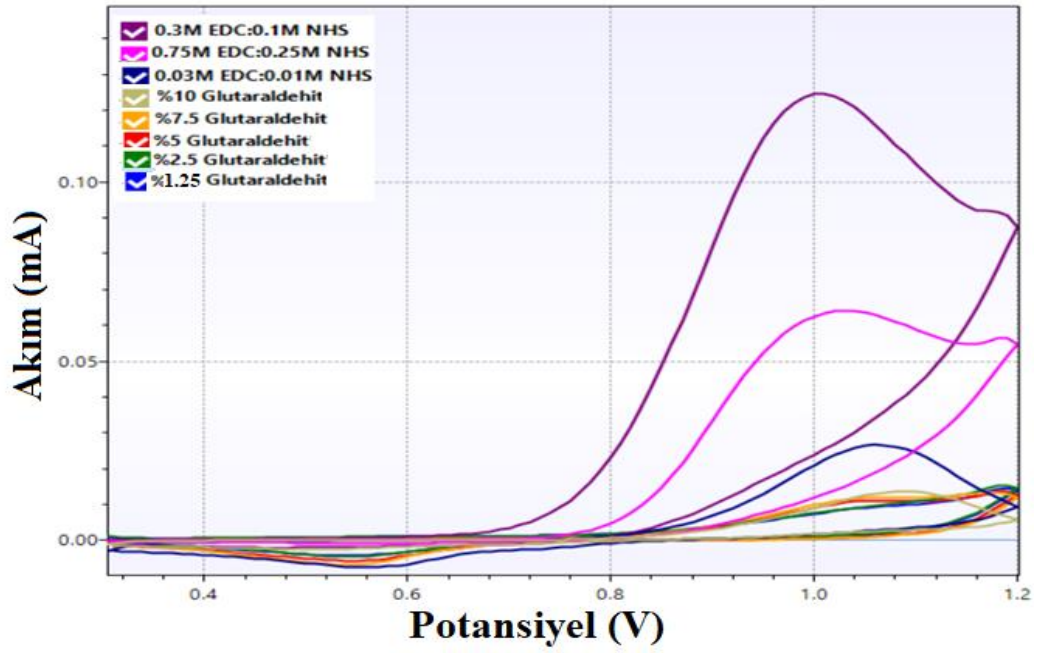
İmmobilizasyon jel bileşenleri farklı derişimlerde hazırlanarak biyosensör yanıtına olan etkileri değeriendirilmiştir. Bu amaçla SEM, FTIR ve AFM analizlerinden optimum yanıtları aldığımız immobilizasyon polimerleri; aljinat (%0,25, 0,5, 1, 1,25, 1,5, 1,75) ve jelatin (%2,5, 5,0, 7,5, 10, 12,5, 15) jel derişimlerinden elde edilen grafikler şekil 4.26’da verilmiştir. En yüksek akımın (0,16 mA) alındığı immobilizasyon jel bileşenlerinin derişimi %1 Aljinat ve %7,5 Jelatinden oluşan karışım olarak bulunmuştur.



Şekil 4.26. Aljinat ve jelatin karışımının farklı derişimlerdeki yanıt grafiğı

4.5.2. Çapraz bağlayıcı optimizasyonu

Kaspaz-3'ün aljinat-jelatin bileşikleri ile immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı olarak farklı derişimlerdeki EDC/NHS (0,3M/0,1M; 0,03M/0,01M; 0,7M/0,25 M) ve farklı derişimlerdeki glutaraldehit (%1,25, 2,5, 5, 7,5, 10) kullanılarak sensör yanıtı üzerine etkileri incelenmiş ve deneysel sonuçlar şekil 4.27'de verilmiştir. Polimer ve antikaspaz-3'ün bağlandığı en uygun çapraz bağlayıcı ajan EDC/NHS olup 0,3 M/0,1 M olarak belirlenmiştir. EDC/NHS'nin diğer derişimlerinde ve glutaraldehitin tüm derişimlerinde görülen pik akımları, yüzeydeki çapraz bağlanma alanının elektron transferini engellemesi sebebiyle azalmaktadır.

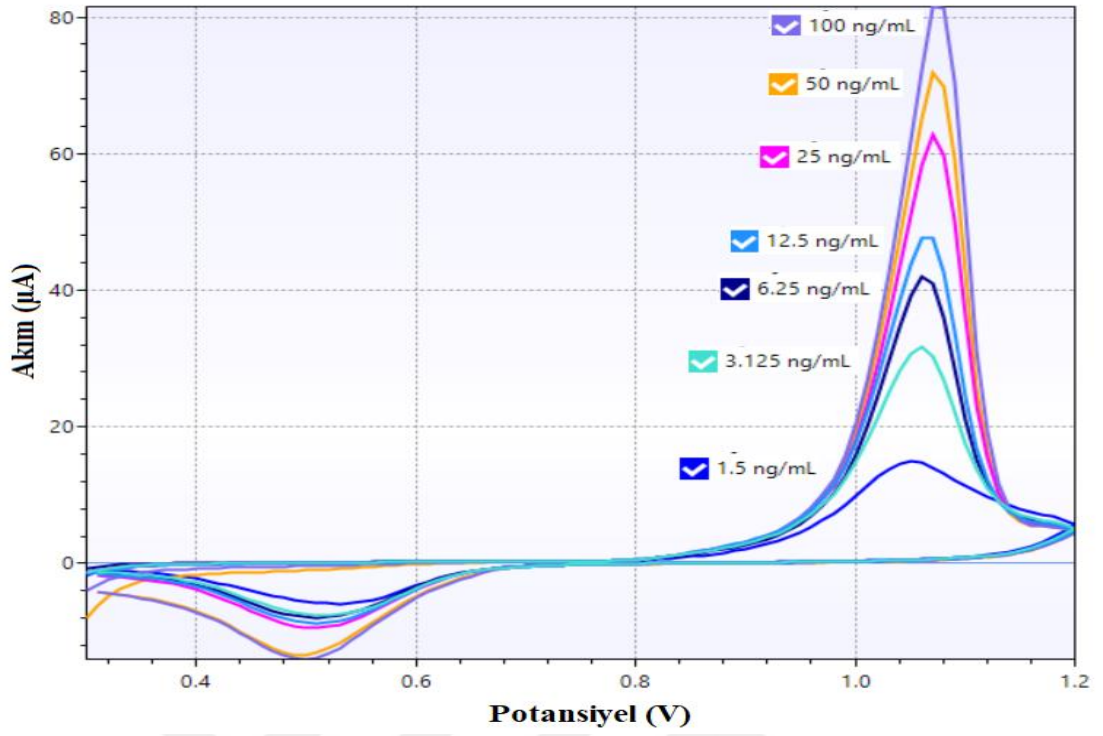


Şekil 4.27. Farklı glutaraldehit ve EDC/NHS çapraz bağlayıcı derişimlerinin kaspaz-3 biyosensör yanıtı üzerine etkisi

4.6. Karakterizasyon çalışmaları

4.6.1. Doğrusal saptama aralığının belirlenmesi

Tasarlanan biyosensörde, kaspaz-3 için doğrusal saptama aralığının belirlenmesi amacıyla derişimi 1,5, 3,1, 6,3, 12,5, 25, 50, 100, 150 ve 250 ng/mL olacak şekilde hazırlanan kaspaz-3 çözeltileri kullanılarak döngüsel voltamogramlar alındı (Şekil 4.28). Döngüsel voltamogramlardan elde edilen akım değerlerinin sunulduğu çizelge 4.2’de derişime bağlı olarak akım değerlerindeki artış da görülmektedir. 100 ng/mL üzerindeki değerlerde sistem aşırı yük (overload) uyarısı vererek ölçüm gerçekleşmemektedir. Bu nedenle 100 ng/mL üzerindeki kaspaz-3 derişimlerinde örnek seyreltilerek ölçümler alınmalı ve seyreltme katsayısı ile çarpılarak gerçek sonuca ulaşılmalıdır.



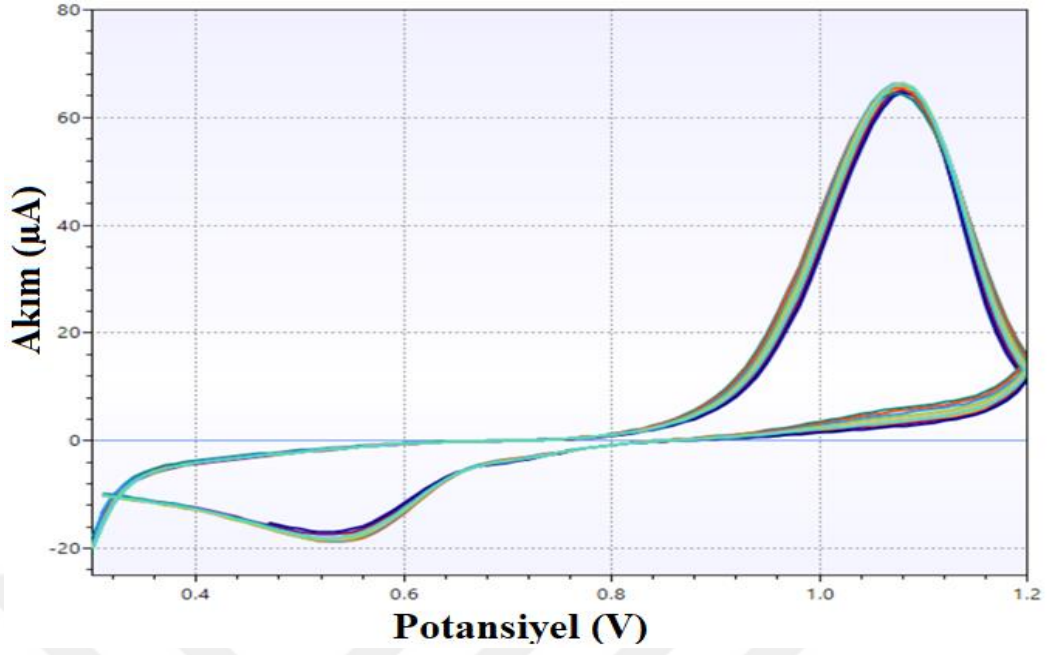
Şekil 4.28. Kaspaz-3 biyosensörünün doğrusal saptama aralığının CV grafiği

Çizelge 4.2. Kaspaz-3 derişimlerine karşılık gelen akım değerleri

Derişim (ng/mL)	Akım değeri (µA)
1,5	17,4
3,1	35,9
6,3	42,5
12,5	55,4
25	61,6
50	75,4
100	83,2

4.6.2. Gün içi tekrarlanabilirlik

%1 Aljinat-%7,5 Jelatinden-0,3M/0,1M EDC/NHS aktif tabaka ile kaspaz-3 için yapılan tekrar çalışmaları, ölçümler arasında zaman aralığı olmadan üstüste ölçümler alınarak gerçekleştirildi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Kaspaz-3 biyosensörünün gün içi tekrarlanabilirlik grafiği (n=15)

Her bir derişime karşılık gelen sinyal değerlerinin sonuçları Çizelge 4.3’de gösterilmektedir.

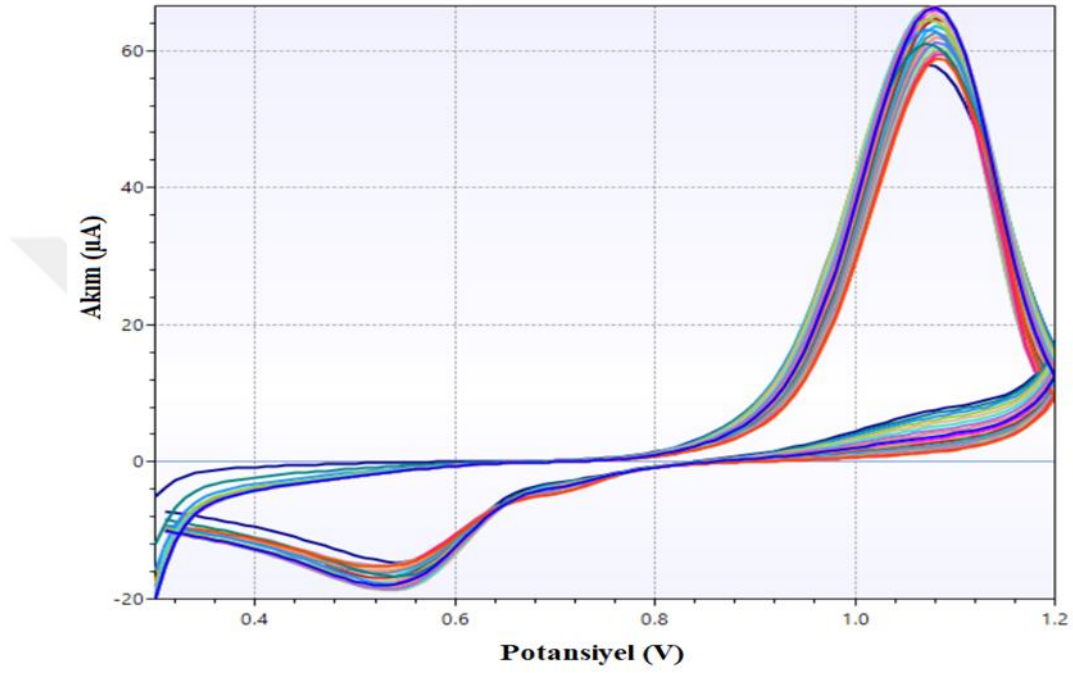
Çizelge 4.3. 10 ng/mL kaspaz-3 için tekrarlanabilirlik (n=15) sonuçları

Ölçüm Sayısı	Derişim (ng/mL)
1	10
2	10,2
3	10,3
4	10,1
5	10
6	10
7	9,8
8	10,2
9	10,2
10	10,1
11	9,8
12	9,7
13	9,9
14	10
15	10

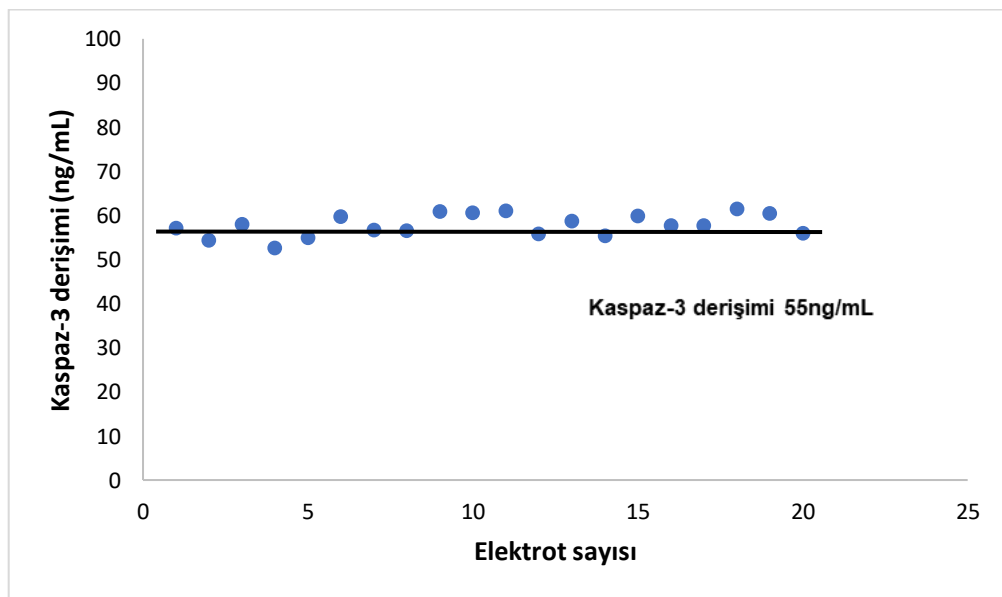
n=15 ölçümlerin ortalaması ($\bar{x}$)=10,02, standart sapma değeri (SD)=0,18 ve varyasyon katsayısı (CV)=%1,8’dir.

4.6.3. Günler arası tekrarlanabilirlik

Aynı koşullarda hazırlanan 55 ng/mL kaspaz-3 biyosensörüyle ayrı zamanlarda ölçümler alınarak oluşturulmuş günler arası tekrarlanabilirliğe ait CV grafiği şekil 4.30'da, verilerin excel formu ise Şekil 4.31'de verilmiş olup standart sapma değeri 2,5 olarak bulunmuştur.



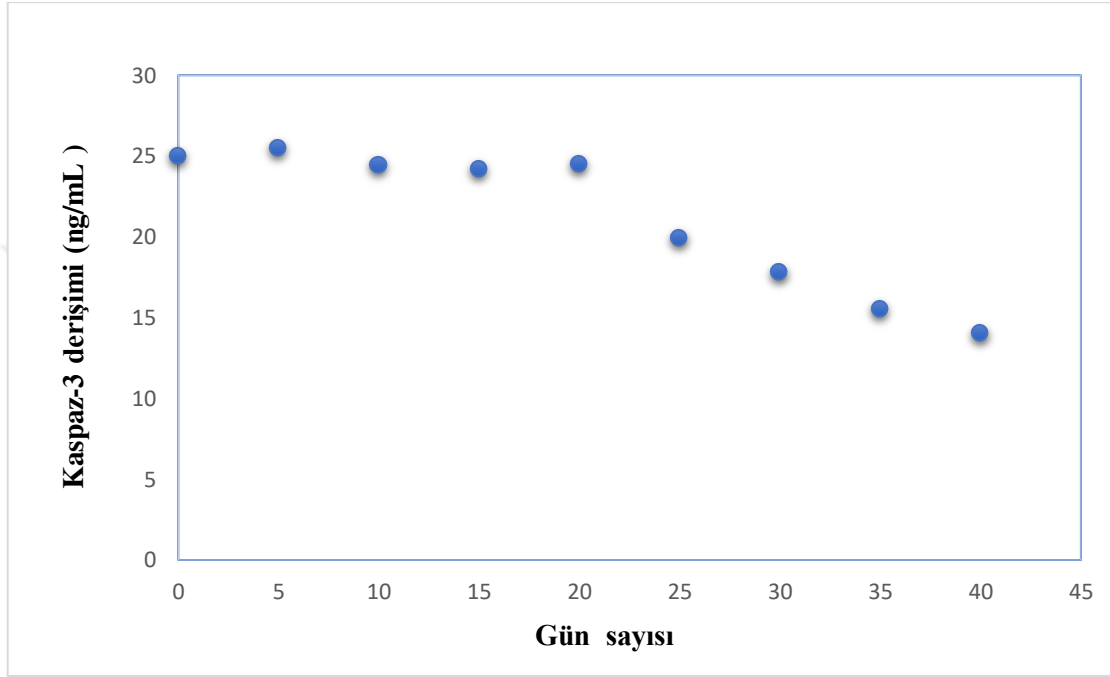
Şekil 4.30. Kaspaz-3 biyosensörünün günler arası tekrarlanabilirlik voltamogramı (n=20).



Şekil 4.31. Günler arası tekrarlanabilirlik grafiği.

4.6.4. Elektrot raf ömrünün belirlenmesi

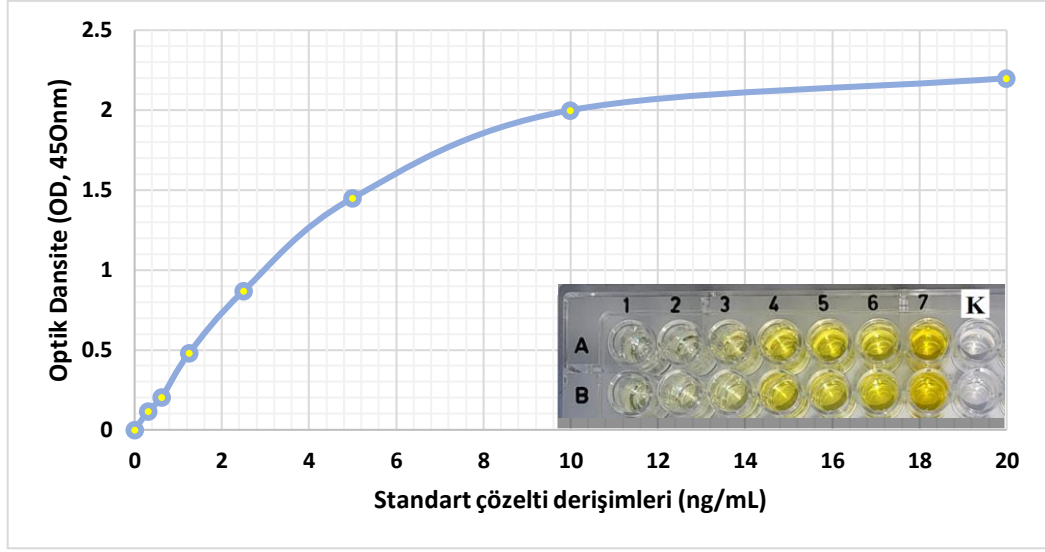
Kaspaz-3 biyosensörünün raf ömrü çalışmaları için 40 günlük periyotta 25 ng/mL kaspaz-3 derişiminde biyosensörün yanıt akımı ölçüldü. Bu ölçümlerden elde edilen akım verilerinin zamana karşı grafiğinden raf ömrünün %40 aktivite kaybının görüldüğü 30 güne kadar kullanılabilir olduğu belirlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Elektrot raf ömrü grafiği.

4.7. ELISA ve Biyosensör Sonuçları

Kaspaz-3'ün saptanması için kullandığımız ELISA kitine ait standart derişimleri 0,3, 0,6, 1,3, 2,5, 5, 10, 20 ng/mL'dir. Standart çözeltileri 2 kez çalışıldı ve ortalamaları alınarak oluşturulan standart grafiği aşağıdaki gibidir (Şekil 4.32).



Şekil 4.33. Kaspaz-3 ELISA kitinin standart grafiği.

Şekil 4.33'de standart için sıralanmış olan 1-2-3-4-5-6-7-K kuyucuk numaralarını ifade ederken, A ve B ise 2'li tekrarı göstermektedir. Çizelge 4.4'te ise kaspaz-3 derişimlerindeki artışa paralel olarak ortalama optik dansite (OD) değerlerinin arttığı görülmektedir. Aynı şekilde kuyucuklarda 1'den 7'e doğru derişimin artmasına bağlı olarak rengin yoğunluğunun yani absorbans değerlerinin de arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.4. Kaspaz-3 ELISA kitinin kaspaz-3 derişimlerine karşılık gelen ortalama OD değerleri

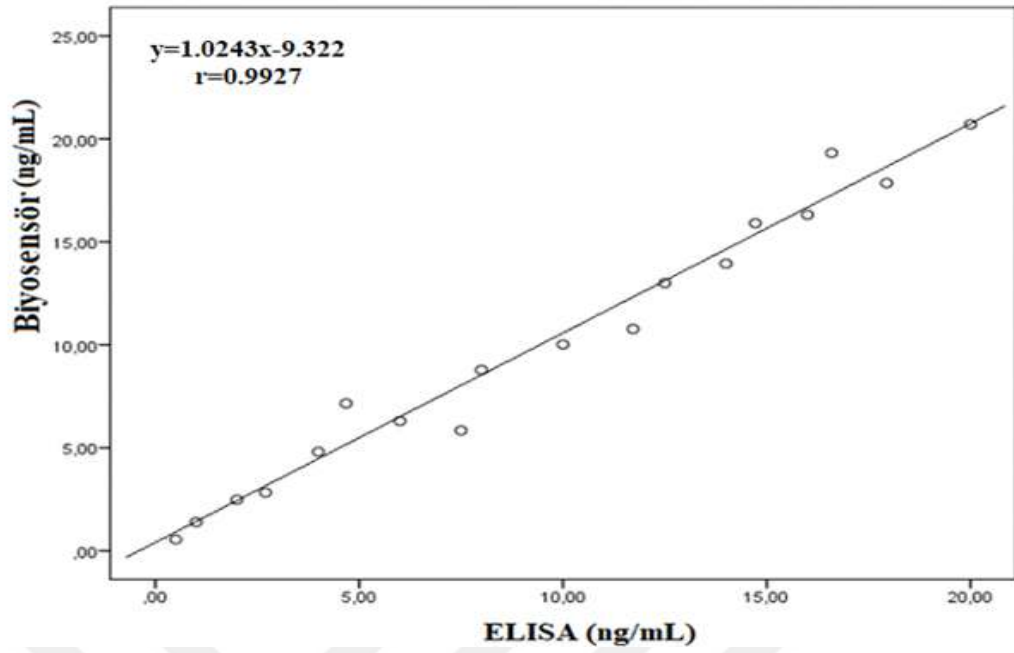
Kaspaz-3	A ve B
Derişimi	Kuyucuklarındaki
(ng/mL)	Ortalama OD Değeri
0,3	0,12
0,6	0,2
1,3	0,5
2,5	0,8
5	1,5
10	2
20	2,2

4.8. İstatiksel analiz sonuçları

Hazırlanan 18 farklı kaspaz derişimi içeren örnek, biyosensör ve ELISA yöntemi kullanılarak ölçüm alındı. Çizelge 4.5'te Kaspaz-3 derişimlerinin ELISA ve biyosensör sonuçları ve Şekil 4.34'te korelasyon grafiğı verilmiştir.

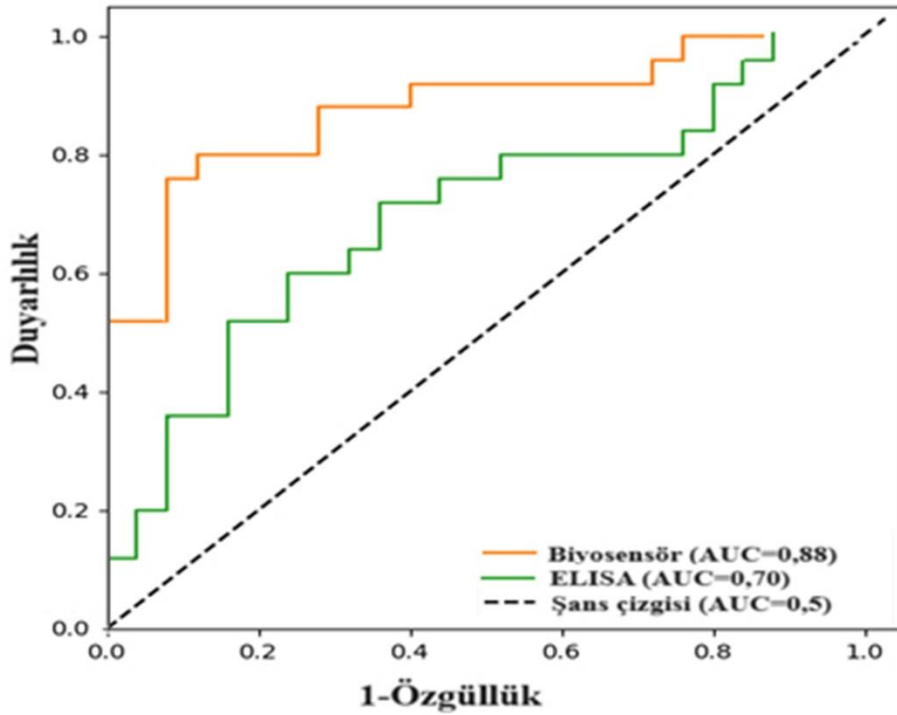
Çizelge 4.5. Kaspaz-3 derişimlerinin ELISA ve biyosensör sonuçları

ELISA (ng/mL)	Biyosensör (ng/mL)
0,5	0,3
1	1,1
2	2,1
2,5	2
4	3,7
5	5,4
6	7,8
7,5	5,6
8	8,2
10	9,8
12	11,1
12,5	12
14	13,5
15	15,6
16	15,7
17,5	19
18	17,25
20	20



Şekil 4.34. ELISA-Biyosensör sonuçları ve korelasyon grafiği.

Her iki yöntem arasındaki korelasyon karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı 0,9927 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz korelasyon katsayısının 1'e olan yakınlığı, iki yöntem arasındaki doğrusal bağlantının gücünü ve pozitif yönlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Ayrıca elde ettiğimiz $R^2 > 0,985$ olduğu için biyoanalitik yöntem geliştirme ölçütlerine uymaktadır¹³⁴.



Şekil 4.35. Biyosensör ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ROC eğrisi (Biyosensörde AUC değeri: 0,88, ELISA’da AUC değeri:0,70)

Kaspaz-3 biyosensörü ve ELISA kiti ile yapılan ölçümlerin performans değerlendirmesi ve karşılaştırmasının yapılması amacıyla ROC analizi yapıldı. ROC eğrisi testin duyarlılığının (doğru pozitifliğinin), 1-özgüllüğe (yanlış pozitifliğe) karşı grafiklenmesiyle oluşturulur. ROC eğrisinde testin her karar noktası için elde edilen 1-özgüllük eksenine karşılık gelen y ekseninde doğruluğa karşı (duyarlılık) ROC eğrisi çizilir. Yanlış pozitiflik oranı matematiksel olarak 1-özgüllüğe eşittir. Grafiğin her noktası bir değişik karar noktasıdır ve o noktada elde edilen değerler grafiklenmektedir. Tüm grafik testin performansını sergiler. ROC eğrisinde yöntemin doğru karar vermede gücünü değerlendirmede kullanılan ölçütlerden biri “ROC eğrisi altında kalan alan”dır. Eğri altında kalan alan (area under the curve=AUC) en büyük “1” değerini alabilir. Pratik olarak alabileceği en küçük değer olan şans çizgisinin AUC değeri ise 0,50’dir¹³⁵. Şekil 4.35’te görülen grafikte ELISA yöntemi için ROC eğrisi altında kalan alan 0,70 iken tasarladığımız kaspaz-3 biyosensörü için elde edilen AUC değeri 0,88’dir.

5. TARTIŞMA

Apoptoz, bir organizmanın yaşam döngüsü boyunca birçok fayda sağlayan iyi düzenlenmiş ve kontrollü bir süreçtir. Bununla birlikte apoptozun düzensizliği, kanser, nörolojik, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığa doğrudan yol açabilir. Bu nedenle hücrenin apoptotik ölümü biyokimya, histoloji, patoloji, farmakoloji ve toksikoloji bilim alanlarında yoğun ilgi uyandırmıştır¹³⁶. Kaspazlar, apoptozda önemli roller oynayan sisteinil aspartat spesifik proteazlardır. Kaspaz türleri arasında kaspaz-3, iç ve dış apoptoz yollarına aracılık etmede merkezi rol almaktadır. Pek çok kaspaz türü keşfedilmiş olmasına rağmen kaspaz-3, kapsamlı bir şekilde incelenen ve apoptozu görüntüleme için çekici ve net bir hedef haline gelen tek kaspazdır. Kaspaz-3 aktive olduktan sonra hücredeki ilgili substratları parçalayarak geri dönüşü olmayan apoptotik sürece yol açar. Apoptozda yeri doldurulamaz bir yönetici protein olan kaspaz-3, bu sürecin devamında DNA hasarına ve apoptotik cisimciklerin oluşumuna yol açar. Kaspaz-3 sadece bir tedavi belirteci olarak değil aynı zamanda terapötik bir hedef olarak da kabul edilmiştir. Bu nedenle Kaspaz-3'ün saptanması, hücre apoptozunun dinamik sürecini zamanında izlemeyi yansıtabilen ve gerçek zamanlı olarak gerçekleştirebilen apoptoz için benzersiz bir biyobelirteç olarak kullanılabilir¹³⁷.

Apoptoza bağlı hastalıkların tanı, tedavi ve prognozu sırasında apoptoz değerlendirme yöntemlerine gereksinim vardır. Bugüne kadar, apoptozun saptanması için kullanılan geleneksel yöntemler arasında hücre morfolojisi değişikliklerinin gözlemlenmesi, DNA fragmentasyonu, anneksin-V boyaması ve mitokondriden sitokrom c salınımının saptanması yer alır. Bununla birlikte bu yöntemler düşük hassasiyetleri, karmaşık işlemleri ve/veya yüksek maliyetleri nedeniyle kısıtlıdır¹³⁸. Biyosensörlerin klinik teşhis ve tedavi izlemindeki kullanımı, literatürde tanımlanan geleneksel yöntemlerden farklı bir biçimde “alternatif teknoloji” olarak bildirilmiştir¹³⁹. İmmünosensörler, vücut sıvılarında antikor-antijen arasındaki etkileşimlerde üretilen sinyallerin (elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik kaynaklı) iletilmesine dayanır¹⁴⁰. Düşük maliyet, tam otomasyon, taşınabilirlik, hızlı yanıt, yüksek duyarlılık ve doğruluğa sahip biyosensör teknolojisinin farklı bir biçimi olan immünosensörler, analitlerin niceliksel ve niteliksel belirlenmesi için geliştirilmektedir. İmmünoanalizler,

bir maddenin bir antikora bağlanma yeteneğine (immün tepkimeye) dayalı olarak ölçülmesine yönelik biyokimyasal testlerdir; ancak bunlar pahalı ekipman, örnek ön işleme protokolleri, zahmetli çalışma ve katı operasyonel prosedürler gerektirir. Ayrıca, optik transdüksiyona dayalı olduklarından ve tepkenleri etiketleme bakımından zaman alıcıdır. Bu nedenle immünosensörler, hızlı tarama sonuçları sağlayabildikleri, küçük, yarı otomatik ve giderek taşınabilir oldukları için geleneksel analitik tekniklere göre birçok üstünlüğe sahiptir¹⁴⁰. Elektrokimyasal immünosensörler, taşınabilir, basit, kullanımı kolay, uygun maliyetli ve çoğu durumda tek kullanımlık olduklarından klinik teşhiste hastabaşı cihazları olarak en çok kullanılan biyosensör sınıfıdır. Biyobelirteçler için elektrokimyasal immünosensörlerle ilgili çalışmalar, bu yaklaşımların halk sağlığı uygulamalarında potansiyel yararlılığını göstermiştir¹⁴¹. Bu bilgiler çerçevesinde apoptotik yolağın önemli bir belirteci olan kaspaz-3'ün saptanmasına yönelik bir immünosensör geliştirmeyi hedefledik.

Bu çalışmada antijen-antikor bağlanmasına yönelik antikor temelli amperometrik immünosensör, bir biyosensörde bulunması gereken optimizasyon ve standardizasyon özellikleri dikkate alınarak kaspaz-3 biyosensörü tasarladık. Öncelikle antikaspaz-3'ün bağlanacağı ve dolaylı olarak kaspaz-3 ölçümünün gerçekleştirildiği biyoaktif tabaka tasarımında, boş elektrodun modifikasyon öncesi ve sonrası yüzey morfolojileri, yapısal değişiklikleri ve yüzey üzerindeki kaplamaların değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amacıyla SEM analizi yapıldı. Çalışmamızda boş elektrottan alınan SEM görüntüsünde (Şekil 4.1) yüzeyin düz ve pürüzsüz biçimde görüntülenmesi beklenen bir kanıt olmakla birlikte Barman ve Jasimuddin'in yaptıkları çalışmayla uyumluydu¹⁴². Antikaspaz-3'ü elektroda immobilize etmek amacıyla Jelatin/BSA (%7,5/%2,5), Kitosan/Jelatin (%2,5/%7,5), Aljinat/Kitosan (%1/%7,5) ve Aljinat/Jelatin (%1/%7,5) olmak üzere 4 farklı biyoaktif tabaka kullanıldı. Biyoaktif tabakada kullanılan jellerin derişimleri sonraki aşamada optimizasyonları bahsedilecek olan yüzdece derişimlerdir. Jelatin/BSA'nın kullanıldığı biyoaktif tabakanın SEM mikrografında (Şekil 4.2) heterojen yoğun pürüzlü ve bobin benzeri şekillerin oluşumu gözlemlendi. Elde ettiğimiz SEM görüntü verileri, Antonov ve Zhuravleva'nın jelatin/BSA bağlanmasından elde ettikleri veriler ile benzer olduğu (Şekil 4.3) saptandı¹⁴³. Şekil 4.6'da verilen Kitosan/Jelatin'e ait SEM mikrografında ise az sayıda mikropor ve mezopor benzeri yapılar görüldü. Şekil 4.9'da verilen Aljinat/Kitosan'a ait SEM

mikrografında, aljinatın heterojen partikül formunun kitosan ile etkileşimi sonucu oluşan aljinat-kitosan iskelesine (Şekil 4.10) benzer düzensiz yapılar oluştuğu gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu yapılar Florowska ve ark. yaptıkları Aljinat/Jelatin hidrojelinin yapısıyla uyumluydu¹⁴⁴. Şekil 4.13’de verilen Aljinat/Jelatin’e ait SEM mikrografında yüzeyde yoğun biçimde benzer boyut ve geometride porlara sahip köpük benzeri morfolojik yapılar görüldü. Elde ettiğimiz morfolojik görüntülerin Gong ve ark.’larının Aljinat/Jelatinle yaptıkları çalışmadaki porsal görüntülere benzer olduğu gözlemlendi¹⁴⁵. Jelatin/BSA, Kitosan/Jelatin ve Aljinat/Kitosan’a ait SEM görüntülerinde yüzeyi tamamen kaplayan heterojen ve düzensiz yapıların, antikorun biyoaktif tabaka içerisindeki immobilizasyonuna uygun yüzey ortamını sağlayamayacağı nedeniyle çalışma için kısıtlılık olduğu düşünüldü. Aljinat/Jelatinde ise oluşan porların antikorun girişimine olanak sağlayan bir yapı oluşturmaması nedeniyle çalışmamızdaki diğer biyoaktif tabakalara göre üstünlük sağladığı belirlendi.

Kaspaz-3’ün saptanması, antikaspaz-3’ün biyoaktif tabakaya immobilizasyonunu gerektirir. Bu amaçla antikaspaz-3, biyoaktif tabakayı oluşturan jel gruplarına göre 2 farklı çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehit ve EDC/NHS ile immobilize edildi. Amin ve hidroksil gruplarından dolayı kitosan ve jelatin için glutaraldehit; karboksil grubu içeren aljinat için EDC/NHS kullanıldı. Jelatin/BSA jelinin kullanıldığı biyoaktif tabakada glutaraldehit ile antikaspaz-3’ün immobilizasyonu sonrası lif benzeri yapıların (Şekil 4.4) oluştuğu gözlemlendi. Şekil 4.5’te Kaspaz-3 ile etkileşim sonucunda ise yüzey daha kompakt ve lifsi görünüme sahipti. Mevcut yüzeyde kaspaz-3 ve antikaspaz-3 etkileşimi, yüzeydeki lifsi görüntü gelişimini artırırken heterojen çukurların da oluşumuna neden oldu. Ayrıca Jelatin/BSA karışımı, tepkime hücrelerinde tamponla karıştırıldığında tekrar jel oluşturma özelliğinden dolayı kararlılığını koruyamadığı gözlemlendi. Literatüre baktığımızda Baydin ve arkadaşlarının Jelatin/BSA polimerlerin kararlılığı üzerinde yaptıkları çalışmada asidik ortam koşullarının peptit bağlarını hidroliz etmesi nedeniyle polimer yapısını bozduğu, düşük jelleşme-erime noktası ve azalmış jel gücüne neden olduğu bildirilmiştir¹⁴⁶. Bu nedenle Jelatin/BSA karışımı çalışmada kullanılamadı. Kitosan/Jelatin’in kullanıldığı biyoaktif tabakada görülen mikropor ve mezopor yapıların, antikaspaz-3’ün glutaraldehit ile immobilizasyonu sonucu düzensiz ve homojen olmayan küresel morfolojilere (Şekil 4.7) dönüştüğü görüldü. Şekil 4.8’de kaspaz-3 ile etkileşim

sonucunda oluşan SEM mikrografında elde edilen yüzeyin farklı uygulama noktalarında benzer yapıların oluşmaması ve kitosan ile hazırlanan biyoaktif tabaka gruplarında homojen karışmama ve çökelti oluşmasından dolayı tercih edilmedi. Shen ve arkadaşları kıkırdak dokusu mühendisliği için Kitosan/Jelatin hidrojellerin glutaraldehit ile *in situ* çökeldiğini bildirmişlerdir¹⁴⁷. Glutaraldehitin, kitosandaki birincil amin gruplarına reaktif olan iki karbonil grubuna sahip olmasının bir sonucu olarak kitosandaki amino grupları, glutaraldehitin çift bağına saldırarak bir çapraz bağ oluşturur. Bu tepkime genellikle Schiff bazı adı verilen bir ara ürün oluşumu ile başlar ve ardından bu ara ürünler daha kararlı çapraz bağlara dönüşür. Sonuç olarak oluşan çapraz bağların kitosan ve glutaraldehit arasında ağ yapısı oluşturarak moleküller arasında çekim kuvvetlerini arttırması ve özgül yapıyı değiştirmesi nedeniyle çökelti oluşturduğunu düşünüyoruz. Aljinat/Kitosan'ın kullanıldığı biyoaktif tabakada antikaspaz-3'ün EDC/NHS ile immobilizasyonu sonucu yüzeydeki tepe noktaları ve çukur derinliklerinin artışı (Şekil 4.11) ile birlikte Şekil 4.12'de kaspaz-3 ile etkileşim sonucunda oluşan SEM mikrografında 3 boyutlu düzensiz yapısal değişimler geçirmesi bu biyoaktif tabakanın tercih edilmemesindeki nedenlerden biriydi. Diğer neden ise kitosan/jelatin grubunda olduğu gibi aljinat/kitosan karışımı da hazırlanırken çökelti oluştuğundan dolayı tercih edilmedi. Aljinat/Jelatin ile hazırlanan karışımda ise immobilizasyondan önce oluşan porların, bir sonraki aşamada biyoaktif tabaka sistemine dahil edilecek antikaspaz-3'ün yerleşebileceği, uygun çukur benzeri yapılar olduğu gözlemlendi. EDC/NHS'yi içinde bulunduran polimer karışımının üzerine tek tabaka olacak şekilde eklenen antikaspaz-3'ün mikrografında ise por ve genel yüzey alanında küresel küçük tanecikler şeklinde olan homojen bir dağılım sergiledi (Şekil 4.14). Antikor eklenmeden önce yüzey görüntüsündeki porların, antikorun immobilize edilmesiyle dolduğu görüldü. Aljinat/jelatin/ EDC/NHS/ Antikaspaz-3 ile kaplı yüzeye kaspaz-3'ün de etkileşimi sonucu meydana gelen 3 boyutlu, farklı derinliğe sahip, amorf bir yapı görüldü (Şekil 4.15). Son tabakadaki bu değişim antijen-antikor etkileşiminin polimer ve çapraz bağlayıcı ile gerçekleştirdiği tepkimenin bir sonucu olarak gerçekleşti. Tüm bu görüntülerin incelenmesi ve değerlendirilmesinin ardından polimer ve biyolojik etkileşim sonuçlarındaki değişiklikler en net Aljinat/Jelatin'e ait tasarımda görülmesi, çalışmalara bu biyoaktif tabaka ile devam edilmesi için önemli bir gerekçeydi. Kaspaz-3'ün saptanması için yapılan biyosensör çalışmalarında floresan

problar, moleküler problar ve nanoparçacıklar kullanılmış olup jel polimerler ile daha önce hiç çalışma yapılmamıştır¹⁴⁸. Kaspaz-3 saptanmasında Aljinat/jelatin polimerinin çalışmamızda ilk defa kullanılması artı değer olarak kabul edilebilir.

FTIR spektroskopisi, biyosensör çalışmalarında elektrot yüzeyindeki kimyasal değişimleri izleme yeteneğiyle biyosensör tasarımı ve performans değerlendirmesi için önemli bir tekniktir. Jelatin/BSA (%7,5/%2,5) polimerinin kullanıldığı biyoaktif tabakaya ait FTIR spektrumlarının karşılaştırıldığı Şekil 4.16'da, 3342,03 cm⁻¹ dalga boyu Amit-A bölgesinde olup hidrojen bağı ve serbest -OH ile birlikte -NH gerilmesini temsil eder. 2916 cm⁻¹ dalga boyunda ise yine polimerlere ait amin gruplarına özgün bir piktir. Jelatin/BSA polimeri, antijen-antikor etkileşimine dair 2000-500 cm⁻¹ bölgesindeki 1631,81 (C=O), 1552,41 (C=C) ve 1250,61 (C-N) gerilme bantlarında pik vermesine rağmen polimere ait spektrumlar birbiriyle çakıştığından dolayı net bilgi vermede zorluk oluşturduğu için tasarladığımız kaspaz-3 biyosensöründe kullanıma uygun değildir. Kitosan/Jelatin (%2,5/%7,5) polimerinin kullanıldığı biyoaktif tabakaya ait FTIR spektrumlarının karşılaştırıldığı Şekil 4.17'de 2916 cm⁻¹'deki pik, C-H simetrik gerilmeye bağlı olarak tanımlandı. Bu pik, polisakkaritin tipik özelliğidir ve ksilan, glukanlar ve karragenanlar gibi diğer polisakkarit spektrumlarında bulunur. 3361 cm⁻¹ bölgesindeki geniş bant, kitosanın molekül içi hidrojen bağlarının yanı sıra N-H ve O-H gerilmesine karşılık gelmekteydi. 2916 cm⁻¹ piki ise jelatine özgün olup, 1633 cm⁻¹'deki kitosan, jelatin ve glutaraldehitin de oluşturduğu C=N bağı görüldü. Yine kitosanın serbest kalan C=O ve C-H bağları da oluştu. Ama antijen-antikor etkileşimi sonucu beklediğimiz amit bölgesi değişimleri gerçekleşmediğinden dolayı kitosan/jelatin polimeri de tasarladığımız kaspaz-3 biyosensörü için uygun değildi. Aljinat/Kitosan (%1/%2,5) polimerinin kullanıldığı biyoaktif tabakaya ait FTIR spektrumlarının karşılaştırıldığı Şekil 4.18'de 3273,57 cm⁻¹ (-OH esneme), 2967 cm⁻¹ (-NH₂ esneme), 1636,30 cm⁻¹ (C=N esneme) ve 1553,38 cm⁻¹ (C=O esneme) olmak üzere dört pikte kayma olduğu görüldü. Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de olduğu gibi Aljinat-Kitosan polimerinin oluşturduğu biyoaktif tabakaya ait FTIR spektrumlarında birbiri üzerinde çakışma olduğu için net bilgi vermekte güçlük çekildi. Aljinat/jelatin (%1/%7,5) polimerin, sulu ortamda bulunması ve jel yapıda olması nedeniyle biyoaktif tabaka oluşumun her üç basamağında da 3273,71, 3279,14 ve 3278,39 cm⁻¹ bölgesindeki karboksil grubuna ait O-H titreşim pikleri ve amin grubuna ait N-H

pikleri görüldü (Şekil 4.18). 2914,87 ve 2922,56 cm^{-1} pikleri ise Dragan ve arkadaşlarının aljinat/jelatinle yaptıkları çalışmadakine benzer şekilde görülen, aljinate negatif gruplarının jelatinin pozitif grupları ile etkileşimi sonucu oluşan polielektrolit bileşiklerdeki (PEC) R-CO-NH₂ grubuna ait N-H titreşim pikidir¹⁴⁹. Antikaspaz-3 ile kaspaz-3 bağlanmasının belirleyici etmenlerden birisi de 1648,83 cm^{-1} bölgesindeki Amit I bağına ait C=O gerilme titreşimi ve protein yapısal bileşenlerine karşı en hassas spektral bölgede (1700-1600 cm^{-1}) pik vermesidir. 1420,15 cm^{-1} bölgesinde Amit II bağına ait N-H bükülmesi ve 1034,94 cm^{-1} Amit III bağına ait C-N gerilme titreşimi de Şekil 4.19'da görülmektedir. Etkinleştirilmiş biyoaktif tabakadaki moleküllerin Amit I, Amit II ve Amit III bağlarına ait transmitans değişimleri antijen-antikor etkileşimleri nedeniyle % transmitansdaki azalma olarak görüldü. Ayrıca 1034 cm^{-1} bölgesindeki Schiff bazının C=N değerine karşılık gelen soğurma bantı polimerler arasındaki kovalent çapraz bağlanmayı gösterdi. Elbayomi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadakine benzer şekilde, 1000-500 cm^{-1} bölgesinde oluşan küçük piklerin, aljinat halkasındaki piranoz gruplarının C-H ve O-H titreşimlerine ait olduğu düşünüldü¹⁵⁰. Aljinat-Jelatin/ EDC/NHS polimeri, antikaspaz-3'ün immobilize ve en son kaspaz-3 etkileşimini de içeren yapının FTIR spektrumları Şekil 4.19'da karşılaştırılmalı olarak görülmektedir. Tüm işlevsel gruplar için sadece polimere ait spektrumdaki transmitans yüzdesi, antikaspaz-3 ve kaspaz-3 etkileşimini içeren forma göre %20 azalarak yapısal değişimin gerçekleştiği görüldü. Ayrıca Lin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada IgG-antijen etkileşimine ait FTIR spektrumunda oluşan kompleks 3200-3400 cm^{-1} bölgesindedir ve bu bölgede oluşan piklerdeki farklılıkların antijen-antikor etkileşimi ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir¹⁵¹. 3200-3400 cm^{-1} aralığında jelatin/BSA ve aljinat/jelatin polimerleriyle hazırlanan biyoaktif tabakada antijen-antikor etkileşiminde transmitans piklerinde %10 düşüş görüldü. Kitosan/jelatin polimerinde bu etkileşime ait piklerdeki farklılığın yok denecek kadar az olduğu gözlemlendi. Aljinat/jelatin polimerinde ise bu piklerdeki transmitans %20 düşmekte ve diğer biyoaktif tabakalardaki spektrumlara göre pikler daha net ayrılmaktaydı. FTIR spektrumundan elde edilen veriler Aljinat/jelatin polimerinin SEM analizi sonuçları ile de paralellik göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak Aljinat/jelatin polimeri ile çalışmalara devam edildi.

Biyoaktif tabakanın yapısal analizi için kullanılan AFM’de yüzeyin aritmetik ortalama pürüzlülüğüne (Ra) ya da ortalama pürüzlülük değerin kareköküne (Rq) bakılmaktadır. Bu değerler aynı zamanda elde edilen tabaka üzerindeki immobilizasyon başarısı hakkında da bilgi verecektir. Yüzey pürüzlülüğü, hem histogramı hem de her iki grup arası karşılaştırma yapılarak değerlendirilebilir¹²⁹. Şekil 4.20’deki aljinat/jelatin/ EDC/NHS polimerine ait AFM görüntüsünde yüzeye ait Ra ve Rq değerleri ise 1,069 nm ve 1,286 nm iken antikaspaz-3 ve kaspaz-3 etkileşimiyle birlikte Ra ve Rq değerleri sırasıyla 88,399 nm ve 112,819 nm değerlerine ulaştığı görüldü (Şekil 4.21). Bu değerler, kaspaz-3 ve antikaspaz-3 etkileşimi sonucunda yüzey pürüzlülüğünün polimer yüzeye göre çok daha fazla arttığını ve biyomoleküllerin aktif tabakaya başarılı immobilizasyonunu kanıtladığı düşünüldü. Örneklerdeki taranan tüm alan üzerindeki yüzey yükseklikleri dağılımı Gauss tipi olup histogramlarda asimetri gözlenmedi. AFM analizlerinde görülen yapısal değişimler SEM ve FTIR analizlerinden elde edilen sonuçları desteklediğinden dolayı elektrokimyasal çalışmalara aljinat/jelatin polimeriyle devam edildi.

Elektrokimyasal biyosensörler için, iyi bir katalitik yeteneğe ve yüksek yüzey alanına sahip elektrotlar, elektron aktarımını kolaylaştırabilir böylece elektrokimyasal sinyali yükseltebilir. Yüksek yüzey alanına sahip bir elektrot, kovalent olmayan tepkimeler yoluyla problemlerin bağlanmasını kolaylaştırabilir. Tepkimeler genellikle yalnızca elektrot yüzeyinde algılandığından elektrotlar, elektrokimyasal biyosensörlerin performansında çok önemli bir rol oynar¹⁵². Belirli bir elektrodun seçilen işlevine bağlı olarak elektrot malzemesi, yüzey modifikasyonu veya boyutları; algılama kabiliyetini büyük ölçüde etkiler. Elektrokimyasal algılama genellikle bir referans elektrot, yardımcı elektrot ve algılama veya redoks elektrotu olarak da bilinen bir çalışma elektrotu gerektirir. Yaygın olarak Ag/AgCl’den yapılan referans elektrot, potansiyeli korumak için tepkime bölgesine yakında tutulur. Çalışma elektrodu biyokimyasal tepkimede transdüksiyon elemanı görevi görürken, karşıt elektrot çalışma elektroduna bir akım uygulanabilmesi için elektrolitik çözeltiyle bağlantıyı kurmaktadır. Çalışma elektrodu hem iletken hem de kararlı olmalıdır. Bu nedenle, analite bağlı olarak platin, altın, karbon ve silikon malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁵³. Şekil 4.22’de görüldüğü üzere platin, karbon ve altın elektrotlar kullanılarak elektrokimyasal ölçümler alındı. Literatürde altın yüzey, jelatin ve aljinat polimerlerinin yükseltgenme-

indirgenme tepkimelerinin gerçekleşebildiği uygun bağlanmaları sağlayan zengin amino ve karboksil gruplarına sahip olduğu için sıklıkla kullanılır¹⁵⁴. Bununla birlikte aljinat ve jelatin yapısındaki serbest $-NH_2$ gruplarının ve aynı zamanda jelatindeki sisteine ait $-SH$ gruplarının elektrostatik etkileşimler yoluyla Au yüzeye immobilize olmaktadır. $-SH$ grupları Au yüzeye kovalent, $-NH_2$ grupları ise H bağı ile bağlandı. Özellikle tiyoller gibi kükürt türevleri altın yüzey üzerinde kendiliğinden birleşen tek tabakaların oluşumunu sağlayan en etkili bileşenlerden biridir. Bu nedenle aljinat ve jelatin polimerlerin Au elektrot yüzeyiyle etkileşimi optimum akım yanıtını (18 μA) oluşturdu. Platin ve karbon elektrotlar hem altın elektrotlara göre iletkenliğinin daha düşük olması hem de Aljinat/jelatin polimeri için elektrokimyasal tepkimelere girecek uygun tepken gruplarının olmamasından dolayı düşük yükseltgenme piki ile sonuçlandığından çalışmada tercih edilmedi.

Protein yapısındaki antikorların etkinliğini gerçekleştirmek üzere belli biyofiziksel özelliklere sahip olması gerekir ve bunu belirleyen en önemli deneysel koşullardan birisi ortamın karakteristik pH değeridir¹⁵⁵. Bundan dolayı immobilizasyon sonrasında pH-akım ilişkisindeki değişimler; tampon ve biyoaktif yüzey ile olan elektrostatik etkileşimleri desteklemesinin yanı sıra antikorun bağlanma sürecini ve biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından önemlidir¹⁵⁶. Bu amaçla asetat tamponu (pH 5,5;6,0;6,5), fosfat tamponu (pH 7,0;7,5;8,0) ve glisin tamponu (pH 8,5;9,0;9,5) 0,1 M sabit derişimde çalışıldı ve farklı pH değerlerinde kaspaz-3 ölçümlerindeki optimum pH-akım yanıtı Şekil 4.24'de değerlendirilmiştir. pH 6,5 asetat tamponu (Şekil 4.24, yeşil pik) deneysel ortamda kaspaz-3 için en yüksek akım yanıtını oluşturmaya ek olarak pH 6,0 (Şekil 4.24, kırmızı pik) ve 5,5 (Şekil 4.24, sarı pik) daha düşük akımlı pikler literatürle uyuşmaktadır. Yapılan çalışmalarda da kaspaz-3'ün yapısındaki birden fazla grubun protonlanması pH 6,0–7,5 arasında gerçekleşmektedir^{157, 158}. Çalışmamızda en yüksek akım değerini (0,085 mA) pH 6,5 asetat tamponunda elde ederken literatürde yüksek akım değerlerinin pH 6,8 HEPES ((4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit), pH 6,1 PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-etansülfonik asit) ve pH 7,0 fosfat tamponunda elde edildiği gözlemlendi¹⁴⁸.

İyonik kuvvet, çözeltideki yük derişiminin bir ölçüsüdür. İyonik kuvvet, antijen ve antikorun kararlılığını ve çözünürlüğünü değiştirerek aktiviteyi de etkileyebilir¹⁵⁹. Optimum pH ve tampon (pH 6,5 Asetat tamponu) elde edildikten sonra iyonik derişime

katkı sağlamada önemli parametrelerden biri olan tampon derişimi de farklı derişimleri (0,025 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M) kullanılarak uygulandı. Kaspaz-3 için optimum iyonik kuvvet 0,1 M asetat tamponunda (Şekil 4.25) gözlemlenirken farklı kaspaz türlerinin optimum iyonik güçlerinin araştırıldığı bir çalışmada kaspaz-3 için 0-1 M derişim aralığında çalışılmış olup optimum derişimi 0,1-0,2 M aralığında elde edilmiştir¹⁵⁸.

Son yıllarda biyosensör aktif tabakasının kararlılığı hakkında yapılan çalışmalar, biyoaktif tabaka (arayüz) tasarımına odaklanmıştır. Bu odaklanma, kararlılık, hassasiyet ve doğrusalılık gibi algılama performansının kalitesiyle doğrudan ilişkili olması nedeniyle biyosensör geliştirmenin yaşamsal bir parçasıdır. İşlevsel bir biyoaktif tabaka oluşturmadaki en önemli adım, biyomoleküllerin sensör yüzeyindeki immobilizasyonudur. Bununla birlikte biyomoleküller, çevrelerine ve bu ortamdaki değişikliklere duyarlı olduklarından dolayı bozunma riski içerirler. Bu risk, biyomoleküllerin katı yüzeye doğrudan immobilizasyonunu engellemektedir¹⁶⁰. Biyosensörlerin normal çalışması için gerekli moleküllerin biyolojik aktivitesini korumak amacıyla algılama elemanları ile elektrot yüzeyi arasında biyoyumlu bir biyoaktif tabaka olmalıdır. Biyoaktif tabakanın kararlılığı, analitlerin üzerindeki etkileşimini ve ardından biyosensörün algılama performansını etkileyeceğinden kararlı bir arayüz tasarlamak sürecin olmazsa olmazlarından⁴⁹. Bu amaçla SEM, FTIR ve AFM analizleri ile uygun yanıtı elde ettiğimiz polimer bileşenlerinden olan aljinat ve jelatinin optimizasyonunda en yüksek tepe akımının %1 Aljinat-%7,5 Jelatin'den oluştuğu görüldü (Şekil 4.26). Bu derişim kaspaz-3 için bağlanmanın en yüksek olduğu orandı ve sinyal artışı ile sonuçlandı. Aljinatın %1,25, 1,5 ve %1,75 olduğu, jelatinin ise %10, 12,5 ve %15 olduğu yüksek polimer derişimleri kaspaz-3'ün etkileşime gireceği alanların küçülmesine ve antijen-antikor etkileşimlerinin kısıtlamasına neden oldu. Bu kısıtlama difüzyon direncinin artmasıyla birlikte sinyalde düşüş olarak gözlemlendi. Aljinatın %0,25 ve %0,5 jelatinin ise %2,5 ve %5 olduğu düşük derişimlerde ise polimerin, biyotanıma elemanına yeterli desteği sağlamaması, immobilizasyon etkinliğinin ve aktif tabakanın kararlılığının azalmasına yol açması sebebiyle sinyalde düşüş ile sonuçlandı.

Çapraz bağlayıcılar, biyosensörlerde kullanılan biyolojik bileşiklerin özelliklerini değiştirmeden onları polimerlerle aktif tabakaya bağlayabilmesi

bakımından önemlidir. Bu ajanlar aynı zamanda aktif tabakadaki biyolojik bileşiklerin kararlılığını artırarak biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini ve ömrünü de artırabilir. Bu nedenle, biyosensör tasarımında doğru çapraz bağlayıcıların seçilmesi ve kullanılması çok önemlidir¹⁶¹. Kaspaz-3 sensörü için glutaraldehit ve EDC/NHS olmak üzere iki farklı çapraz bağlayıcı ajan kullanıldı. Şekil 4.27’de görüldüğü gibi tasarladığımız biyosensör için optimum çapraz bağlayıcı EDC/NHS olup en uygun derişim oranı 0,3 M/0,1 M olarak belirlendi. Çapraz bağlayıcının glutaraldehit olarak kullanımı düşük sinyal akımı ile sonuçlandı. Bu durumun olası sebepleri; aktif tabakanın yeterli doygunluğu aşması ve buna bağlı olarak kalınlaşması olabilir. Aktif tabakanın doygunluğu, çapraz bağlayıcıların yüzeyde birikmesi nedeniyle ölçüm sinyalinde düşüşe neden olabilir. Aynı durum aktif tabakanın kalınlaşması ve buna bağlı olarak biyosensör duyarlılığının azalması sonucuyla da sinyal düşüşüne neden olabilir. Kaspaz-3’le yapılan bir *in vitro* çalışmada 1-etil-3-(dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC), etilenglikol bis-süksinimidilsüksinat (EGS), dimetilpimelimidat (DMP), ditiyobis-süksinimidil propiyonat (DPS) çapraz bağlayıcıları kullanılmış ve EDC dışındaki diğer çapraz bağlayıcıların, inhibitör etki göstererek enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı görülmüştür¹⁶². Başka bir çalışmada ise kaspaz-3, glutaraldehit ile çapraz bağlanma tepkimesinde kullanılmış ve glutaraldehitin antikör tarafından tanınan epitopların aşırı çapraz bağlanma yoluyla maskelediği, alfa sarmal yapıyı bozduğu ve sinyali azalttığı görülmüştür¹⁶³. Bu nedenle, tasarladığımız biyosensörde çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin kullanıldığı deney koşullarında akım değerlerinin azaldığı (0,01 mA) ve EDC/NHS’nin kullanıldığı deney koşullarında ise optimum akım değerine (0,13 mA) ulaştığı görüldü.

Doğrusal saptama aralığı, bir biyosensörün ölçebileceği minimum ve maksimum ölçüm değerleri arasındaki aralığı ifade eder. Bir biyosensörün doğrusal saptama aralığının geniş olması tercih edilir¹⁶⁴. Öte yandan, doğrusal saptama aralığının altında veya üstünde kalan değerler yani ölçüm aralığının dışındaki değerler yanlış sonuçlar üretebilir. Bu nedenle, bir biyosensörün doğrusal saptama aralığının doğru şekilde belirlenmesi, ölçülen değerlerin güvenilirliği açısından önemlidir. Bu amaçla 1,5-250 ng/mL kaspaz-3 derişimlerinde CV değerleri alınmış ve doğrusal saptama aralığı 1,5-100 ng/mL olarak belirlenmiştir. 100 ng/mL üstündeki değerler için sistem aşırı yük (overload) ve 1,5 ng/mL altındaki değerler için ise eksik yük (underload) olarak uyarı

vermektedir. Literatürde bildirilen kaspaz-3 biyosensörleri için diferansiyel puls voltametri (DPV), doğrusal tarama voltametri (LSV), kare dalga voltametri (SWV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri (CV) olmak üzere farklı elektrokimyasal yöntemler uygulanmış olup farklı sinyal taşıyıcılar ile farklı polimer yüzeyler kullanılarak doğrusal saptama aralığı çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda saptama aralığı için minimum değer 0,1 pg/mL iken maksimum ölçüm alabildikleri değer 10 ng/mL olarak bildirilmiştir¹⁶⁵. Çalışmamızda 100 ng/mL'ye kadar lineer ölçümler alınabilmekte ve bu özelliği ile elektrokimyasal ölçümler açısından literatüre daha geniş saptama limitiyle üstünlüğü ortaya konulmuştur.

Gün içi tekrarlanabilirlik aynı laboratuvarında, aynı cihazla, aynı kişi tarafından kısa zaman aralığında elde edilen verilerin birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Biyosensörlerin birbiriyle tutarlı sonuçlar vermesi açısından tekrarlanabilirlik çalışmaları önemlidir¹⁶⁶. Tekrarlanabilirlik için derişimi 10 ng/mL olan örneğin 15 kez artarda ölçülerek siklik voltamogramda (Şekil 4.29) elde edilen sonuçlar için ortalama değer ($\bar{x}$) = 10,02, standart sapma değeri (SD) = 0,18 ve varyasyon katsayısı (CV) = %1,8'dir (Çizelge 4.3). Shabir ve arkadaşlarının yaptıkları yöntem validasyon çalışmasında standart sapma değerinin %3'ten küçük olması kabul edilebilir değer olarak tanımlamaktadır¹⁶⁷. Varyasyon katsayısı ise genellikle %15'in altında kabul edilir¹⁶⁸. Elde edilen sonuçlar gün içi tekrarlanabilirlik için yöntemin uygun ve kabul edilebilir nitelikte olduğunu göstermektedir.

Günler arası tekrarlanabilirlik deneyinde kullanılan derişimden farklı olarak 55 ng/mL'lik örnek kullanılarak, sonuçların doğruluğunu ve tek bir örneğe özgü olmadığını göstermek amacıyla günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış olup voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.30). Ölçümler her gün 1 kere, 20 gün boyunca aynı deneysel koşullarda alınmıştır. Şekil 4.31'de ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı görülmekte olup standart sapma değeri 2,5 olarak bulunmuştur. Günler arası tekrarlanabilirlik deneyleri açısından başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Elektrotların raf ömrü, tepkimenin biyoaktif tabakada gerçekleşmesi sebebiyle biyosensörün kalitesi ve performansı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir¹⁶⁹. Kaspaz-3 biyosensörünün raf ömrü çalışmaları için 40 günlük periyotta 25 ng/mL kaspaz-3 derişiminde biyosensörün yanıt akımı ölçüldü. Bu ölçümlerden elde edilen akım verilerinin zamana karşı grafiğinden raf ömrünün %40 aktivite kaybının görüldüğü 30

güne kadar kullanılabilir olduğu belirlendi (Şekil 4.32). Sonuç olarak 30 günden sonra alınacak ölçümler için elektrot temizlenmeli aktif tabaka tekrar hazırlanarak ölçüm alınmalıdır.

Enzim bağlı immünosorbent ölçüm (Enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) araştırma ve klinik analizlerde biyomolekülleri saptamak için en özgün ve basit testlerden biridir¹⁷⁰. Kaspaz-3 ölçümleri için kullanılan ELISA yöntemi ve tasarlanan biyosensör sonuçları karşılaştırıldı. Yöntem karşılaştırmaları için “CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) Yöntem Karşılaştırma Kılavuzu” esas alınmakta ve iki yöntem arasındaki korelasyon katsayısının $r > 0,975$ olması durumunda elde edilen verilerin tutarlı ve güçlü pozitif ilişkili olduğu anlamına gelmektedir^{171, 172}. Elde edilen korelasyon katsayısı 0,9927 olup bu değer tasarlanan kaspaz-3 biyosensörünün pratikte kullanımı için uygun olduğu anlamına gelmektedir. Kaspaz-3’ün saptanması için kullanılan yöntemler başlıca akım sitometri, kolorimetrik, immünohistokimyasal, florometrik ve elektrokimyasal analizlerdir. Bu yöntemler yüksek hassasiyet ve hızlı sonuç alma gibi benzer avantajlara ve pahalı ekipman, tek kullanımlık malzemeler ve örnekleme yöntemindeki zorluklardan dolayı da benzer kısıtlılıklara sahiptir¹⁷³. Karşılaştırma için kullandığımız ELISA yönteminde ölçüm hassasiyeti 0,3-20 ng/mL iken tasarladığımız kaspaz-3 biyosensöründe ise 1,5-100 ng/mL olarak belirlenmiştir. 1,5 ng/mL’den daha az olan derişimlerinde sistem ölçüm kapasitesinin altında bir yük olarak uyarı vermekte olup ELISA yöntemine göre bir kısıtlılıktır. Fakat ELISA yönteminde ölçüm üst sınırı 20 ng/mL iken tasarladığımız biyosensördeki ölçüm üst sınırının 100 ng/mL olması ise yöntemin üstünlüğüdür.

Sonuç alma süreleri bakımından ELISA yönteminde örneğin çalışılmaya başlanması ve sonuç elde etme olmak üzere toplam süre ortalama 3,5 saat iken biyosensör sisteminde elektrot hazırlığı ve sonuç elde etme süresi toplam 1 saattir. Hızlı yanıt alma süresi bu nedenle biyosensörde daha yararlıdır. Maliyet açısından ise kaspaz-3 ELISA kiti markaya, örnek sayısına ve kaynağa bağlı olarak birkaç yüz dolardan başlayıp fiyatı farklı özelliklere göre artmaktadır. Tasarladığımız biyosensörde elektrodun immobilizasyonundan sonra yaklaşık 1 ay kadar süre ile her gün ölçüm alınabilmektedir.

Kaspaz-3 saptanmasına yönelik tasarladığımız biyosensör ile güncel kullanımda olan ELISA kiti arasındaki performans değerlendirme ve yöntem karşılaştırma analizi için ROC eğrisi kullanıldı. AUC değerinin ELISA analizinde olduğu gibi 0,7–0,8 aralığında olduğu durumlarda “tanı testi kabul edilebilir bir ayırım gücüne sahip” olarak bildirilmiştir. Tasarladığımız biyosensörde olduğu gibi AUC değerinin 0,8–0,9 aralığında olduğu durumda ise “tanı testi mükemmel bir ayırım gücüne sahip” olarak bildirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar biyosensör verilerinin mevcut kullanılan ELISA yönteminden daha iyi ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elektrokimyasal immünosensörler bir elektrot yüzeyinde immobilize edilmiş antikor ile özgün antijen arasındaki etkileşimlere dayanan bir tür afinite biyosensörüdür. İmmünosensörler, antikor ve karşılık gelen antijen arasındaki özgün bağlanma nedeniyle yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahiptir bu da onları özellikle tıbbi ve biyoanaliz alanlarında çeşitli uygulamalar için uygun bir platform haline getirir. Elektrokimyasal immünosensörler, bir elektrokimyasal dönüştürücü tarafından kaydedilen bir elektrik sinyalinin ölçümlerine dayanır ve sinyal tipine bağlı olarak amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik veya impedimetrik olarak sınıflandırılabilir. İmmünosensörler arasında, elektrokimyasal immünosensörler, basitlikleri, taşınabilir olmaları ve otomatik saptama yetenekleri nedeniyle daha mükemmel hale getirilmiştir¹⁷⁴.

Bu tez projesi kapsamında kaspaz-3 belirlenmesine yönelik bir biyosensör geliştirildi. Elektrot üzerindeki biyoaktif tabakaya ait optimizasyon çalışmalarının her aşaması döngüsel voltametri ölçümleri alınarak değerlendirildi ve yüzey karakterizasyonundaki her değişim hassas ölçümlerle saptandı.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, altın elektrot üzerinde kaspaz-3'e özgün biyoaktif tabaka tasarlanmıştır. Bu amaçla kitosan, aljinat, jelatin ve BSA'nın farklı kombinasyonları kullanılarak immobilizasyon jelleri hazırlanmıştır. SEM analizinde optimum polimer jel ve derişimleri %1 Aljinat ve %7,5 Jelatin olduğu görülmüştür. Biyoaktif tabakanın duyarlılığı çalışmamızdaki en önemli parametrelerden biri olduğu için SEM mikrograflarının yanı sıra FTIR ve AFM analizleri de yapılmıştır. Bu analizlerin sonucunda FTIR'da %1 Aljinat ve %7,5 Jelatin kullanılan yüzeyde kaspaz-3 antijen ve antikoru arasındaki etkileşimin absorbands ile doğru orantılı olarak arttığını ve yapısal değişimlerin gerçekleştiği belirlenmiştir. AFM analizinde de yüzey topoğrafyasının her aşamasında girinti-çıkıntıların artması kaspaz-3'ün antikorla etkileşimine izin veren alanların oluşumuyla sonuçlanmıştır. SEM, FTIR ve AFM analizlerinden elde edilen veriler birbirini desteklediğinden dolayı optimum immobilizasyon jeli ve derişimi %1 Aljinat ve %7,5 Jelatin olarak değerlendirilmiştir.

Çapraz bağlayıcı ajanlar, biyoaktif tabakadaki antikapaz-3'ün yapısını değiştirmeden polimerlerle aktif tabakaya bağlayabilmesi için önemlidir. Bu kapsamda glutaraldehit ve EDC/NHS olmak üzere iki farklı çapraz bağlayıcı ajan kullanıldı. Tasarladığımız biyosensör için optimum çapraz bağlayıcı EDC/NHS olup en uygun derişim oranı 0,3 M/0,1 M olarak belirlenmiştir.

Deneyisel ortamın optimizasyonunu belirlemek amacıyla farklı tampon (asetat, fosfat ve glisin), pH (5,0-9,5) ve iyonik kuvvetlerin (0,025 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M) olduğu ortamda alınan döngüsel voltamogramlar incelenmiştir. Bu sonuçlardan elde edilen optimum yanıtlar; pH 6,5, ve 0,1 M asetat tamponu olarak belirlenmiştir.

Karakterizasyona çalışmalarımızda ise doğrusal saptama aralığı, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik ve raf ömrü deneyleri yapılmıştır. Tasarladığımız kaspaz-3 biyosensörünün doğrusal saptama aralığı 1,5–100 ng/mL olarak belirlenmiştir. Literatürde Deng ve arkadaşları tarafından tasarlanan elektrokimyasal yöntemin kullanıldığı kaspaz-3 biyosensörünün doğrusal saptama aralığı 0,5–2000 pg/mL aralığında tayini yapabilmektedir¹⁷⁵. Fotoelektrokimyasal yöntemi kullanan Chen ve arkadaşlarının saptadığı doğrusal saptama aralığı ise 0,2–20 ng/mL'dir. Tasarladığımız kaspaz-3 biyosensörüne ait doğrusal saptama aralığı daha geniş aralıkta olup diğer yöntemlere göre üstünlük göstermektedir.

10 ng/mL olan örneğin 15 tekrarlı çalışmasında elde edilen ortalama değer ($\bar{x}$)=10,02, standart sapma değeri (SD) $\pm$ 0,18 ve varyasyon katsayısı (CV) = %1,8'dir. Sonuçlarımız kaspaz-3 biyosensörünün tekrarlanabilirlik açısından uygun olduğunu göstermektedir. Tekrarlanabilirlik deneyinde kullanılan derişimden farklı olarak 55 ng/mL'lik örnek kullanılarak, sonuçların doğruluğunu ve tek bir örneğe özgü olmadığını göstermek amacıyla günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış olup voltamogramları alınmıştır. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen standart sapma değeri 2,5 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen biyosensörün raf ömrü çalışmaları için 40 günlük periyotta 25 ng/mL kaspaz-3 derişiminde biyosensörün yanıt akımı ölçüldü ve raf ömrünün %40 aktivite kaybının görüldüğü 30 güne kadar kullanılabilir olduğu belirlendi. ELISA yöntemi ve tasarlanan biyosensör sonuçlarından elde edilen korelasyon katsayısı 0,9927 olup birbiriyle tutarlı sonuçlar elde edildi. Fakat sonuç alma süresinin kısa olması ve daha az maliyetli olması nedeniyle tasarladığımız biyosensör kullanıma daha uygundur. ELISA

ve biyosensör yöntem karşılaştırılmasında biyosensörün ROC eğrisi AUC değeri 0,88 olarak elde edilmiş olup biyosensörün ELISA yöntemiyle “mükemmel uyum” göstermektedir.

Bu tezden edinilen bilgilerden sonra bir sonraki adımda insan plazma-serum örneklerindeki kaspaz-3 ile çalışılabilir. Kaspaz-3 çalışmalarındaki girişim etkisi incelenebilir. Plazma ya da serum örneklerindeki kaspaz-3’e ait biyosensör verileri test edilerek örneklem büyüklüğü, test gücü değerlendirildikten sonra farklı karşılaştırma testleri uygulanabilir. Ayrıca kabul kriterlerinin kabul edilmesi amacıyla validasyon parametreleri için daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir. Tüm bu uygulamalardan sonra biyomedikal mühendisliği ve elektrik-elektronik mühendisliği ile birlikte birçok disiplinin birlikte çalışması sonrası cihaz portatif olarak kullanıma hazır hale getirilebilir.

Kaspaz-3, apoptotik sürecin izlenmesinde ve antikanser ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesinde çok önemli bir rol oynar. Elektrokimya tabanlı biyosensörler büyük potansiyel göstermekte ve kaspaz-3’ün saptanması için yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır. Bu tez kapsamında tasarlanan kaspaz-3 biyosensörü gelecekteki biyolojik algılama süreci ve pratik uygulamalar için gelecek vadetmektedir. İlerleyen süreçlerde apoptozla ilgili biyobelirteçlerin çoklu ve eş zamanlı olarak algılanması için kapsamlı çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

1. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke E, Blagosklonny M, El-Deiry W, Golstein P, Green D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, **2009**; 16(1):3-11.
2. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell biology and toxicology*, **2020**; 36:145-164.
3. Riegman M, Bradbury MS, Overholtzer M. Population dynamics in cell death: mechanisms of propagation. *Trends in cancer*, **2019**; 5(9):558-568.
4. Arya R, White K. Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms. in *Seminars in cell & developmental biology*. **2015**. Elsevier.
5. Zeng W, Wang X, Xu P, Liu G, Eden HS, Chen X. Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro. *Theranostics*, **2015**; 5(6):559.
6. Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, **2005**; 37(11):719-727.
7. Kesavardhana S, Malireddi RS, Kanneganti T-D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annual review of immunology*, **2020**; 38:567-595.
8. Lossi L, Castagna C, Merighi A. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum. *International journal of molecular sciences*, **2018**; 19(12):3999.
9. Khalilzadeh B, Shadjou N, Kanberoglu GS, Afsharan H, De La Guardia M, Charoudeh HN, Ostadrahimi A, Rashidi M-R. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via caspase-3 activity: a review. *Microchimica Acta*, **2018**; 185:1-19.
10. Takata T, Tanaka F, Yamada T, Yanagihara K, Otake Y, Kawano Y, Nakagawa T, Miyahara R, Oyanagi H, Inui K. Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer. *International journal of cancer*, **2001**; 96(S1):54-60.
11. Huang H, Zhang XF, Zhou HJ, Xue YH, Dong QZ, Ye QH, Qin LX. Expression and prognostic significance of osteopontin and caspase-3 in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Cancer science*, **2010**; 101(5):1314-1319.
12. Sun D-B, Xu M-J, Chen Q-M, Hu H-T. Significant elevation of serum caspase-3 levels in patients with intracerebral hemorrhage. *Clinica Chimica Acta*, **2017**; 471:62-67.
13. Cakir E, Yilmaz A, Demirag F, Oguztuzun S, Sahin S, Yazici UE, Aydin M. Prognostic significance of micropapillary pattern in lung adenocarcinoma and expression of apoptosis-related markers: caspase-3, bcl-2, and p53. *Apmis*, **2011**; 119(9):574-580.
14. Kaya C, Alay I, Guraslan H, Gedikbasi A, Ekin M, Ertaş Kaya S, Oral E, Yasar L. The role of serum caspase 3 levels in prediction of endometriosis severity. *Gynecologic and obstetric investigation*, **2018**; 83(6):576-585.
15. Shen H-W, Yi L, Wang X-M, Yao M-J, Deng J-W, Fang J-Z, Li M-N. Expression of Caspase-3 and Bcl-2 in bladder transitional carcinoma and their significance. *Ai Zheng= Aizheng= Chinese Journal of Cancer*, **2004**; 23(2):181-184.
16. Lei Q, Huang X, Zheng L, Zheng F, Dong J, Chen F, Zeng W. Biosensors for Caspase-3: From chemical methodologies to biomedical applications. *Talanta*, **2022**:123198.
17. Chadha U, Bhardwaj P, Agarwal R, Rawat P, Agarwal R, Gupta I, Panjwani M, Singh S, Ahuja C, Selvaraj SK. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **2022**; 109:21-51.

18. **Haleem A, Javaid M, Singh RP, Suman R, Rab S.** Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors International*, **2021**; 2:100100.
19. **Singh A, Sharma A, Ahmed A, Sundramoorthy AK, Furukawa H, Arya S, Khosla A.** Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope. *Biosensors*, **2021**; 11(9):336.
20. **Alhamoud Y, Yang D, Kenston SSF, Liu G, Liu L, Zhou H, Ahmed F, Zhao J.** Advances in biosensors for the detection of ochratoxin A: Bio-receptors, nanomaterials, and their applications. *Biosensors and Bioelectronics*, **2019**; 141:111418.
21. **Zhang X, Ju H, Wang J.** *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. **2011**: Academic Press.
22. **Wen W, Yan X, Zhu C, Du D, Lin Y.** Recent advances in electrochemical immunosensors. *Analytical chemistry*, **2017**; 89(1):138-156.
23. **Aydin EB, Aydin M, Sezgintürk MK.** Advances in electrochemical immunosensors. *Advances in clinical chemistry*, **2019**; 92:1-57.
24. **Mansuriya BD Altintas Z.** Graphene quantum dot-based electrochemical immunosensors for biomedical applications. *Materials*, **2019**; 13(1):96.
25. **Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK.** Caspases—an update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **2008**; 151(1):10-27.
26. **Julien O Wells JA.** Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*, **2017**; 24(8):1380-1389.
27. **McIlwain DR, Berger T, Mak TW.** Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2013**; 5(4):a008656.
28. **Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S.** Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, **2015**; 22(4):526-539.
29. **Creagh EM, Conroy H, Martin SJ.** Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological reviews*, **2003**; 193(1):10-21.
30. **BAŞOĞLU-ÜNAL F Meltem U.** Exploring the anticancer activity and active mechanism of turkish propolis against hl-60 myeloid cancer cells: insights from molecular docking studies. **2023**.
31. **Nagarajan K, Soundarapandian K, Thorne RF, Li D, Li D.** Activation of pyroptotic cell death pathways in cancer: an alternative therapeutic approach. *Translational oncology*, **2019**; 12(7):925-931.
32. **Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S.** Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2013**; 5(6):a008672.
33. **Li J Yuan J.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **2008**; 27(48):6194-6206.
34. **Slee EA, Adrain C, Martin SJ.** Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry*, **2001**; 276(10):7320-7326.
35. **Miller DK.** The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. in *Seminars in immunology*. **1997**. Elsevier.
36. **D'amelio M, Cavallucci V, Cecconi F.** Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*, **2010**; 17(7):1104-1114.
37. **Rozanova N Zhang JZ.** Metal and magnetic nanostructures for cancer detection, imaging, and therapy. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **2008**; 4(4):377-399.

38. Wang P, Yang H, Liu C, Qiu M, Ma X, Mao Z, Sun Y, Liu Z. Recent advances in the development of activatable multifunctional probes for in vivo imaging of caspase-3. *Chinese Chemical Letters*, **2021**; 32(1):168-178.
39. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Berghe TV, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death & Differentiation*, **2007**; 14(1):44-55.
40. Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International journal of cancer*, **2018**; 143(4):921-930.
41. Huang J-S, Yang C-M, Wang J-S, Liou H-H, Hsieh I-C, Li G-C, Huang S-J, Shu C-W, Fu T-Y, Lin Y-C. Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, **2017**; 8(48):84237.
42. Chen H, Yang X, Feng Z, Tang R, Ren F, Wei K, Chen G. Prognostic value of Caspase-3 expression in cancers of digestive tract: a meta-analysis and systematic review. *International journal of clinical and experimental medicine*, **2015**; 8(7):10225.
43. Jellinger K Stadelmann C. *Mechanisms of cell death in neurodegenerative disorders*. **2000**: Springer.
44. Mejia ROS Friedlander RM. Caspases in Huntington's disease. *The Neuroscientist*, **2001**; 7(6):480-489.
45. Yang B, Ye D, Wang Y. Caspase-3 as a therapeutic target for heart failure. *Expert opinion on therapeutic targets*, **2013**; 17(3):255-263.
46. Sunaga T, Oh N, Hosoya K, Takagi S, Okumura M. Pro-apoptotic effects of tepoxalin, a cyclooxygenase/lipoxygenase dual inhibitor, on canine synovial fibroblasts. *Journal of Veterinary Medical Science*, **2012**; 74(6):745-750.
47. Kuo W-T, Shen L, Zuo L, Shashikanth N, Ong MLDM, Wu L, Zha J, Edelblum KL, Wang Y, Wang Y. Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression. *Gastroenterology*, **2019**; 157(5):1323-1337.
48. Qazi S Raza K. *Smart biosensors for an efficient point of care (PoC) health management*, in *Smart biosensors in medical care*. **2020**, Elsevier. p. 65-85.
49. Naresh V Lee N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors*, **2021**; 21(4):1109.
50. Newman JD Setford SJ. Enzymatic biosensors. *Molecular biotechnology*, **2006**; 32:249-268.
51. Metkar SK Girigoswami K. Diagnostic biosensors in medicine—a review. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, **2019**; 17:271-283.
52. Zhang JX Hoshino K. *Molecular sensors and nanodevices: principles, designs and applications in biomedical engineering*. **2018**: Academic Press.
53. Arora N. Recent advances in biosensors technology: a review. *Octa Journal of Biosciences*, **2013**; 1(2).
54. Corrie SR, Coffey J, Islam J, Markey K, Kendall M. Blood, sweat, and tears: developing clinically relevant protein biosensors for integrated body fluid analysis. *Analyst*, **2015**; 140(13):4350-4364.
55. Martinkova P, Kostelnik A, Válek T, Pohanka M. Main streams in the construction of biosensors and their applications. *International Journal of Electrochemical Science, volume 12, issue: 8*, **2017**.
56. Fu Z, Lu Y-C, Lai JJ. Recent advances in biosensors for nucleic acid and exosome detection. *Chonnam medical journal*, **2019**; 55(2):86-98.
57. Karunakaran C, Rajkumar R, Bhargava K. *Introduction to biosensors*, in *Biosensors and bioelectronics*. **2015**, Elsevier. p. 1-68.

58. **Bernstein H.** *Measuring electronics and sensors: basics of measurement technology, sensors, analog and digital signal processing.* **2021**; Springer Nature.
59. **Pumera M, Sanchez S, Ichinose I, Tang J.** Electrochemical nanobiosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2007**; 123(2):1195-1205.
60. **Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS.** Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and applied chemistry*, **1999**; 71(12):2333-2348.
61. **Koncki R.** Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica chimica acta*, **2007**; 599(1):7-15.
62. **Guan J-G, Miao Y-Q, Zhang Q-J.** Impedimetric biosensors. *Journal of bioscience and bioengineering*, **2004**; 97(4):219-226.
63. **Jaffrezic-Renault N Dzyadevych SV.** Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors*, **2008**; 8(4):2569-2588.
64. **Stobiecka A, Radecka H, Radecki J.** Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**; 22(9-10):2165-2170.
65. **Bollella P Gorton L.** Enzyme based amperometric biosensors. *Current opinion in Electrochemistry*, **2018**; 10:157-173.
66. **Ferreira CE, Guerra JC, Shlessarenko N, Scartezini M, Franca CN, Colombini MP, Berlitz F, Machado AM, Campana GA, Faulhaber AC.** Point-of-Care Testing: General Aspects. *Clinical laboratory*, **2018**; 64.
67. **Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA.** Glycosylation and the immune system. *Science*, **2001**; 291(5512):2370-2376.
68. **Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ.** *The structure of a typical antibody molecule*, in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.* **2001**, Garland Science.
69. **Schroeder Jr HW Cavacini L.** Structure and function of immunoglobulins. *Journal of allergy and clinical immunology*, **2010**; 125(2):S41-S52.
70. **Mahato K, Kumar S, Srivastava A, Maurya PK, Singh R, Chandra P.** *Electrochemical immunosensors: fundamentals and applications in clinical diagnostics*, in *Handbook of immunoassay technologies.* **2018**, Elsevier. p. 359-414.
71. **Moina C Ybarra G.** Fundamentals and applications of immunosensors. *Advances in immunoassay technology*, **2012**:65-80.
72. **Meldrum F.** Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry. *International Materials Reviews*, **2003**; 48(3):187-224.
73. **Li Z.** *Self-Assembled N-Heterocyclic Carbene Monolayers on Gold as a Tunable Platform for Designing Biosensor Surfaces.* **2017**, Queen's University (Canada).
74. **Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, Latte G, Madeddu G, Galleri G, Nuvoli S, Bagella P, Demartis MI, Fiore V.** Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors*, **2016**; 16(6):780.
75. **Ghindilis AL, Atanasov P, Wilkins E.** Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis*, **1997**; 9(9):661-674.
76. **Cahn TM.** *Biosensors.* Vol. 1. **2007**; Springer Science & Business Media.
77. **Dhand C, Das M, Datta M, Malhotra B.** Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**; 26(6):2811-2821.

78. Cristea C, Florea A, Tertiş M, Săndulescu R. *Immunosensors*, in *Biosensors-micro and nanoscale applications*. 2015, IntechOpen.
79. Luppà PB, Sokoll LJ, Chan DW. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 2001; 314(1-2):1-26.
80. Zhou W, Huang P-JJ, Ding J, Liu J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*, 2014; 139(11):2627-2640.
81. Yoo H, Jo H, Oh SS. Detection and beyond: Challenges and advances in aptamer-based biosensors. *Materials Advances*, 2020; 1(8):2663-2687.
82. Ziegler C. Cell-based biosensors. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 2000; 366:552-559.
83. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 2014; 12(4):207-218.
84. Mun'delanji CV, Kerman K, Hsing I-M, Tamiya E. Nanobiosensors and nanobioanalyses. 2015.
85. CH V, Srividya A, Ajitha A, Rao U. An overview on cyclic voltammetry and its application in pharmaceutical analysis. *Int. J. Chem. Pharm. Sci*, 2014; 5(2).
86. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 2018; 95(2):197-206.
87. Shukla RP, Cazelles R, Kelly DL, Ben-Yoav H. A reduced-graphene oxide-modified microelectrode for a repeatable detection of antipsychotic clozapine using microliters-volumes of whole blood. *Talanta*, 2020; 209:120560.
88. Velho G, Froguel P, Sternberg R, Thevenot DR, Reach G. In vitro and in vivo stability of electrode potentials in needle-type glucose sensors: influence of needle material. *Diabetes*, 1989; 38(2):164-171.
89. Busoni L, Carla M, Lanzi L. A comparison between potentiostatic circuits with grounded work or auxiliary electrode. *Review of scientific instruments*, 2002; 73(4):1921-1923.
90. Chooto P. Cyclic voltammetry and its applications. *Voltammetry. IntechOpen*, 2019:1.
91. Bzainia A. *Preparation and ionic transport properties of conductive polymers for dye-sensitized solar cells*. 2019.
92. Bhardwaj T. A review on immobilization techniques of biosensors. *Int. J. Eng. Res*, 2014; 3(5).
93. Sandhyarani N. *Surface modification methods for electrochemical biosensors*, in *Electrochemical Biosensors*. 2019, Elsevier. p. 45-75.
94. Zhou Y, Fang Y, Ramasamy RP. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development. *Sensors*, 2019; 19(2):392.
95. Nguyen HH Kim M. An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 2017; 26(6):157-163.
96. Yang X, Hua L, Gong H, Tan SN. Covalent immobilization of an enzyme (glucose oxidase) onto a carbon sol-gel silicate composite surface as a biosensing platform. *Analytica Chimica Acta*, 2003; 478(1):67-75.
97. Kumar A, Srivastava A, Galaev IY, Mattiasson B. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Progress in polymer science*, 2007; 32(10):1205-1237.
98. Ghica ME, Pauliukaite R, Fatibello-Filho O, Brett CM. Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009; 142(1):308-315.

99. Salem M, Mauguen Y, Prangé T. Revisiting glutaraldehyde cross-linking: the case of the Arg–Lys intermolecular doublet. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **2010**; 66(3):225-228.
100. Acciaretto F, Vesentini S, Cipolla L. Fabrication strategies towards hydrogels for biomedical application: chemical and mechanical insights. *Chemistry–An Asian Journal*, **2022**; 17(22):e202200797.
101. Ostrowska-Czubenko J, Pieróg M, Gierszewska-Drużyńska M. State of water in noncrosslinked and crosslinked hydrogel chitosan membranes–DSC studies. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, **2011**; (16):147-156.
102. Fischer MJ. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Surface plasmon resonance: methods and protocols*, **2010**:55-73.
103. Krishnamoorthy G, Sehgal PK, Mandal AB, Sadulla S. Novel collagen scaffolds prepared by using unnatural D-amino acids assisted EDC/NHS crosslinking. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2013**; 24(3):344-364.
104. Montalbetti CA Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **2005**; 61(46):10827-10852.
105. Yan Q, Zheng H-N, Jiang C, Li K, Xiao S-J. EDC/NHS activation mechanism of polymethacrylic acid: Anhydride versus NHS-ester. *Rsc Advances*, **2015**; 5(86):69939-69947.
106. Huebner J. Antibody-Antigen Interactions and Measurements of Immunologic Reactions. *Immunology, infection, and immunity*, **2004**:207-232.
107. Mehraj U, Nisar S, Qayoom H, Mir MA. Antigen-antibody interaction. *Immunoglobulins, magic bullets and therapeutic antibodies*, 69.
108. Dhuiège B, Lasseuguette E, Brochier-Salon M-C, Ferrari M-C, Missoum K. Crosslinked facilitated transport membranes based on carboxymethylated NFC and amine-based fixed carriers for carbon capture, utilization, and storage applications. *Applied Sciences*, **2020**; 10(1):414.
109. Nainggolan I, Shantini D, Nasution TI, Derman MN. Role of metals content in spinach in enhancing the conductivity and optical band gap of chitosan films. *Advances in Materials Science and Engineering*, **2015**; 2015.
110. Rizzo S, Zingale E, Romeo A, Lombardo R, Pignatello R. Colon Delivery of Nutraceutical Ingredients by Food-Grade Polymeric Systems: An Overview of Technological Characterization and Biological Evaluation. *Applied Sciences*, **2023**; 13(9):5443.
111. Kumar S Koh J. Physiochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, **2012**; 13(5):6102-6116.
112. Cardenas G, Anaya P, Del Rio R, Schrebler R, Von Plessing C, Schneider M. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **2010**; 55(3):352-354.
113. Kubiak-Ossowska K, Tokarczyk K, Jachimska B, Mulheran PA. Bovine serum albumin adsorption at a silica surface explored by simulation and experiment. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2017**; 121(16):3975-3986.
114. Rombouts I, Lagrain B, Scherf KA, Lambrecht MA, Koehler P, Delcour JA. Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Scientific reports*, **2015**; 5(1):1-12.
115. Nataraj D REDDY N. Chemical modifications of alginate and its derivatives. *International Journal of Chemistry Research*, **2020**:1-17.

116. **Raus RA, Nawawi WMFW, Nasaruddin RR.** Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2021**; 16(3):280-306.
117. **Neves MI, Moroni L, Barrias CC.** Modulating alginate hydrogels for improved biological performance as cellular 3D microenvironments. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **2020**; 8:665.
118. **Fernando IPS, Lee W, Han EJ, Ahn G.** Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *Chemical Engineering Journal*, **2020**; 391:123823.
119. **Devi N, Deka C, Maji TK, Kakati DK.** Gelatin and gelatin–polyelectrolyte complexes: Drug delivery. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*; Mishra, M., Ed, **2015**:3557-3569.
120. **Kommareddy S, Shenoy DB, Amiji MM.** Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization. *Nanotechnologies for the life sciences: Online*, **2007**.
121. **Mikhailov OV.** Gelatin as It Is: History and Modernity. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**; 24(4):3583.
122. **Wang S, Liu J, Wang L, Cai H, Wang Q, Wang W, Shao J, Dong X.** Underwater Adhesion and Anti-Swelling Hydrogels. *Advanced Materials Technologies*, **2023**; 8(6):2201477.
123. **Türe H.** Characterization of hydroxyapatite-containing alginate–gelatin composite films as a potential wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, **2019**; 123:878-888.
124. **Ngwuluka NC, Abu-Thabit NY, Uwaezuoke OJ, Erebor JO, Ikomuanya MO, Mohamed RR, Soliman SM, Elella M, Ebrahim N.** Natural polymers in micro- and nanoencapsulation for therapeutic and diagnostic applications: part I: lipids and fabrication techniques. *Nano Microencapsul Tech Appl*, **2021**:3-54.
125. **Dalheim MØ, Vanacker J, Najmi MA, Aachmann FL, Strand BL, Christensen BE.** Efficient functionalization of alginate biomaterials. *Biomaterials*, **2016**; 80:146-156.
126. **Manju S, Muraleedharan CV, Rajeev A, Jayakrishnan A, Joseph R.** Evaluation of alginate dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel as a biodegradable sealant for polyester vascular graft. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2011**; 98(1):139-149.
127. **Mohamed MA, Jaafar J, Ismail A, Othman M, Rahman M.** *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*, in *Membrane characterization*. **2017**, Elsevier. p. 3-29.
128. **Lopes S, Bueno L, AGUIAR FD, Finkler C.** Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Anais da academia brasileira de ciências*, **2017**; 89:1601-1613.
129. **Fisher MI, Tjärnhage T.** Structure and activity of lipid membrane biosensor surfaces studied with atomic force microscopy and a resonant mirror. *Biosensors and Bioelectronics*, **2000**; 15(9-10):463-471.
130. **Xia N, Huang Y, Cui Z, Liu S, Deng D, Liu L, Wang J.** Impedimetric biosensor for assay of caspase-3 activity and evaluation of cell apoptosis using self-assembled biotin-phenylalanine network as signal enhancer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2020**; 320:128436.
131. **Dong Y-P, Chen G, Zhou Y, Zhu J-J.** Electrochemiluminescent sensing for caspase-3 activity based on Ru (bpy) 3²⁺-doped silica nanoprobe. *Analytical chemistry*, **2016**; 88(3):1922-1929.
132. **Saunders PA, Cooper JA, Roodell MM, Schroeder DA, Borchert CJ, Isaacson AL, Schendel MJ, Godfrey KG, Cahill DR, Walz AM.** Quantification of active caspase 3 in apoptotic cells. *Analytical biochemistry*, **2000**; 284(1):114-124.
133. **Zhao S, Li Y, Wang Y, Ma Z, Huang X.** Quantitative study on coal and shale pore structure and surface roughness based on atomic force microscopy and image processing. *Fuel*, **2019**; 244:78-90.

134. **Guideline IH.** Bioanalytical method validation and study sample analysis M10. *ICH Harmonised Guideline: Geneva, Switzerland*, **2022**.
135. **KILIÇ S.** Klinik karar vermede ROC analizi. *Journal of Mood Disorders*, **2013**; 3(3):135-40.
136. **Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V.** Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, **2012**; 4(5):330.
137. **Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, Savardashtaki A.** Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2022**; 69(4):1633-1645.
138. **Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z.** Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods in cell biology*, **2011**; 103:55-98.
139. **Pashazadeh P, Mokhtarzadeh A, Hasanzadeh M, Hejazi M, Hashemi M, de la Guardia M.** Nano-materials for use in sensing of salmonella infections: recent advances. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**; 87:1050-1064.
140. **Steckl AJ Ray P.** Stress biomarkers in biological fluids and their point-of-use detection. *ACS sensors*, **2018**; 3(10):2025-2044.
141. **Wan Y, Su Y, Zhu X, Liu G, Fan C.** Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, **2013**; 47:1-11.
142. **Barman K Jasimuddin S.** Electrochemical detection of adenine and guanine using a self-assembled copper (II)-thiophenyl-azo-imidazole complex monolayer modified gold electrode. *RSC Advances*, **2014**; 4(91):49819-49826.
143. **Antonov Y Zhuravleva I.** Effect of protein thermo aggregation on the binding of BSA to gelatin type A. *International journal of biological macromolecules*, **2013**; 53:160-167.
144. **Florowska A, Hilal A, Florowski T, Mrozek P, Wroniak M.** Sodium Alginate and Chitosan as Components Modifying the Properties of Inulin Hydrogels. *Gels*, **2022**; 8(1):63.
145. **Gong C, Kong Z, Wang X.** The effect of agarose on 3D bioprinting. *Polymers*, **2021**; 13(22):4028.
146. **Baydin T, Aarstad OA, Dille MJ, Hattrem MN, Draget KI.** Long-term storage stability of type A and type B gelatin gels: The effect of Bloom strength and co-solutes. *Food Hydrocolloids*, **2022**; 127:107535.
147. **Shen Z-S, Cui X, Hou R-X, Li Q, Deng H-X, Fu J.** Tough biodegradable chitosan-gelatin hydrogels via in situ precipitation for potential cartilage tissue engineering. *Rsc Advances*, **2015**; 5(69):55640-55647.
148. **Lei Q, Huang X, Zheng L, Zheng F, Dong J, Chen F, Zeng W.** Biosensors for Caspase-3: From chemical methodologies to biomedical applications. *Talanta*, **2022**; 240:123198.
149. **Dragan ES, Dinu MV, Ghiorghita CA.** Chitosan-based polyelectrolyte complex cryogels with elasticity, toughness and delivery of curcumin engineered by polyions pair and cryostructuration steps. *Gels*, **2022**; 8(4):240.
150. **Elbayomi SM, Wang H, Tamer TM, You Y.** Enhancement of antioxidant and hydrophobic properties of alginate via aromatic derivatization: Preparation, characterization, and evaluation. *Polymers*, **2021**; 13(15):2575.
151. **Lin S-S, Chen I-C, Yang J, Hsueh TJ, Hsu C-L, Lee H-E, Shieh T-Y.** A study on one-step immobilization of horse immunoglobulin with vertically grown ZnO nanorods substrates. *Journal of The Electrochemical Society*, **2011**; 158(4):K107.
152. **Abdulbari HA Basheer EA.** Electrochemical biosensors: electrode development, materials, design, and fabrication. *ChemBioEng Reviews*, **2017**; 4(2):92-105.

153. Bizzotto D, Burgess IJ, Doneux T, Sagara T, Yu H-Z. Beyond simple cartoons: challenges in characterizing electrochemical biosensor interfaces. *ACS sensors*, **2018**; 3(1):5-12.
154. De Wael K, Verstraete A, Van Vlierberghe S, Dejonghe W, Dubruel P, Adriaens A. The electrochemistry of a gelatin modified gold electrode. *International Journal Of Electrochemical Science*, **2011**; 6(6):1810-1819.
155. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics. *Antibodies*, **2019**; 8(4):55.
156. Goulet DR Atkins WM. Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, **2020**; 109(1):74-103.
157. Feeney B Clark AC. Reassembly of active caspase-3 is facilitated by the propeptide. *Journal of Biological Chemistry*, **2005**; 280(48):39772-39785.
158. Stennicke HR Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3,-6,-7, and-8. *Journal of Biological Chemistry*, **1997**; 272(41):25719-25723.
159. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *The interaction of the antibody molecule with specific antigen*, in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. **2001**, Garland Science.
160. Song M, Lin X, Peng Z, Xu S, Jin L, Zheng X, Luo H. Materials and methods of biosensor interfaces with stability. *Frontiers in Materials*, **2021**; 7:583739.
161. Ford R, Quinn SJ, O'Neill RD. Characterization of biosensors based on recombinant glutamate oxidase: Comparison of crosslinking agents in terms of enzyme loading and efficiency parameters. *Sensors*, **2016**; 16(10):1565.
162. Yakovlev A, Lyzhin A, Khaspekov L, Gulyaeva N. Use of crosslinkers for the identification of intracellular partners of caspase-3. *Neurochemical Journal*, **2010**; 4:185-188.
163. de Moraes GN, Carvalho É, Maia RC, Sternberg C. Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde. *Analytical biochemistry*, **2011**; 415(2):203-205.
164. Ahmad R, Tripathy N, Hahn Y-B. Wide linear-range detecting high sensitivity cholesterol biosensors based on aspect-ratio controlled ZnO nanorods grown on silver electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2012**; 169:382-386.
165. Chen C La M. Recent Developments in Electrochemical, Electrochemiluminescent, Photoelectrochemical Methods for the Detection of Caspase-3 Activity. *Int. J. Electrochem. Sci*, **2020**; 15:6852-6862.
166. Chesher D. Evaluating assay precision. *The Clinical Biochemist Reviews*, **2008**; 29(Suppl 1):S23.
167. Shabir GA. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology*, **2005**; 10:314-325.
168. Moosavi SM Ghassabian S. Linearity of calibration curves for analytical methods: A review of criteria for assessment of method reliability. *Calibration and validation of analytical methods: a sampling of current approaches*, **2018**; 109.
169. Gibson T, Hulbert J, Parker S, Woodward J, Higgins I. Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system. *Biosensors and Bioelectronics*, **1992**; 7(10):701-708.
170. Gan SD Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, **2013**; 133(9):e12.
171. Yücel D. *Pratik Metot Validasyonu ve Verifikasyonu*. **2014**, Ankara.
172. Jensen AL Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology*, **2006**; 35(3):276-286.

173. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*, **2022**; 27(7-8):482-508.
174. Mollarasouli F, Kurbanoglu S, Ozkan SA. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, **2019**; 9(3):86.
175. Deng D, Hao Y, Yang S, Han Q, Liu L, Xiang Y, Tu F, Xia N. A signal-on electrochemical biosensor for evaluation of caspase-3 activity and cell apoptosis by the generation of molecular electrocatalysts on graphene electrode surface for water oxidation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2019**; 286:415-420.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kezban KARTLAŞMIŞ

MAKALELER

A.Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

A1- Dünder Yenilmez E, Kökbaş U, **Kartlaşmış K**, Kayrın L, Tuli A. A new biosensor for noninvasive determination of fetal RHD status in maternal blood of RhD negative pregnant women. Plos One. 2018 Jun 6;13(6):e0197855. doi: 10.1371/journal.pone.0197855.

B.SCI ve uluslararası indekslerce taranan dergiler dışında hakemli ve süreli dergilerde yayınlanan makaleler

B1- **Kartlaşmış K.**, Kökbaş U., Kayrın L., Electrochemical Characterization of Cholesterol Biosensor Formed by Polymer Film Based on o-Phenylenediamine and Benzoquinone. İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2023;20:347-360.

- B2- **Kartlaşmış K**, Dikmen N, 2022. Evaluation of the effect of glyphosate on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity *in vitro* conditions. Cukurova Med J 2022;47(1):143-151. DOI: 10.17826/cumj.996838
- B3- Eser N., **Kartlaşmış K.**, Uçar Y., Kökbaş U., Total Fenolic Contents Of *Ferula Elaeochytris* Root Extract and its Effect on Glucose Levels., 2020, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi, 10(2), 154-161.
- B4- **Kartlaşmış K.**, Kökbaş U., Kayrın L., Biochemistry of apoptosis. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2016, 25.1: 52-69.
- B5- **Kartlaşmış K.**, Kökbaş U., Günaştı B., Alparslan MM., Kayrın L., Sirkadiyen Saatin Epigenetikle İlişkisi., 2017, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.
- B6- **Kartlaşmış K.**, Kökbaş U., Kayrın L., Kanser Metabolizması ve Otofaji. 2018 Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 27(4), 388-396., Doi: 10.17827/Aktd.383576.
- B7- **Kartlaşmış K.**, Kökbaş U., Kayrın L., Piwi-Etkileşimli RNA'ların Biyogenezi ve İşlevleri, 2018 Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 27(1), 18-26., Doi: 10.17827/Aktd.315624
- B8- **Kartlaşmış K.**, Dikmen N., Piroptozise Biyokimyasal Yaklaşım ve Biyokimyadaki Rolü, 2020, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.
- B9- **Kartlaşmış K**, Dikmen N, 2021. Nükleobazların Demetilasyonu ve Güncel Gelişmeler, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2021;30(3):158-165 doi:10.17827/aktd.906243.

C.Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- C1- **Kartlaşmış K**, Tan Z, Polat T, Bozkaya F, Dikmen N, Investigation of Interference Effect of Glyhosate on Kinetic Urea Measurement Method with Urease in Serum, (2020) Poster Abstracts. Turkish Journal of Biochemistry, Vol. 45 (Issue s2), pp. 65-83. doi.org/10.1515/tjb-2020-45s208.
- C2- Bozkaya F, Polat T, Tan Z, **Kartlaşmış K**, Dikmen N, The Effect of Quinine Molecule to Glucose Oxidase/Peroxidase Enzyme System Used for Glucose Measurement, (2020) Poster Abstracts. Turkish Journal of Biochemistry, Vol. 45 (Issue s2), pp. 65-83.
- C3- **Kartlaşmış K**, Dikmen N, Evaluation of Alginate-Gelatin Polymers in Glucose Oxidase-Peroxidase Model in Enzyme Immobilization in Amperometric Biosensors,

(2021) Scientific Programme. Turkish Journal of Biochemistry, Vol. 46 (Issue s2), pp. 6-18. <https://doi.org/10.1515/tjb-2021-46s203>.

C4- Tan Z, Polat T, **Kartlaşmış K**, Dikmen N. Investigation of the interference effect of glyphosate on the measurement of triglycerides in serum by the enzymatic method, Turk J Biochem (2021) Vol. 46 (Issue s2).

C5- Dikmen N, Ulusoy A, **Kartlaşmış K**. Inhibition of alkaline phosphatase on glyphosate and the effect of some molecules on this inhibition. XXVII. Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting Bclf 2019, 44(3), 49-49.

C6- **Kartlaşmış K.**, Ulusoy A, Leventerler H, Dikmen N (2019). Investigation Of The Effect Of Glyphosate On G6PD Activity İn *İnvitro* Conditions. Turkish Journal Of Biochemistry 44(3), 49-49.

C7-Ulusoy A, **Kartlaşmış K**, Dikmen N (2019). Inhibitory Effect Of Glyphosate On Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase Activity. Turkish Journal Of Biochemistry- 44(3), 46-46.

C8- Ulusoy A, **Kartlaşmış K**, Dikmen N (2020). Effect of a herbicide glyphosate on butyrylcholinesterase activity in breast cancer. II. International Enzyme and Bioprocess abstract book. s 43.

C9- **Kartlaşmış K**, Dikmen N (2021). Development of polymer complexes of chitosan, gelatin, alginate and albumin in bioactive layer design of caspase-3 biosensor, 45th FEBS Congress.

C10-Ulusoy A, **Kartlaşmış K**, Muhtaroglu S, Dikmen N (2021). Preparation and characterization of basil seed mucilage/Alginate biocomposite hydrogels. 45th FEBS Congress.

C11- **Kartlaşmış K.**, Dikmen, N. (2022) . "Evaluation of the Performance of Pectin and Pectin-Based Composites on Glucose Biosensor Systems." International scientific research congress- XII , Dehri, India, pp.591-593.

D.Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Araştırma Projeleri

D1- Glukoz Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı, Araştırmacı TYL-2015-3899, 2017.

D2- 17-Hidroksiprogesteron Düzeyini Saptayan Yeni Bir Elektrobiyokimyasal Ölçüm Yöntemi Geliştirilmesi, Araştırmacı, 2019.

D3- Apoptozis Belirtecini Belirlenmesinde Biyosensör Geliştirilmesi, Doktora Projesi, TDK-2019-12115.

D4- Fesleğen Tohumu (*Ocimum basilicum L*) Tabanlı Hidrojellerin İlaç Taşımında İncelenmesi, Araştırmacı, TYL-2019-12241.

D5- Elektrokimyasal ve impedans temelli glukoz biyosensörlerinde pektin ve kompozitlerinin biyoaktif tabaka oluşumu ve biyosensör performansı üzerine etkilerinin araştırılması, Araştırmacı, TSA-2021-14083.

BİLİMSEL TOPLANTI DÜZENLEME

E.Ulusal sempozyum, kongre ve sanatsal etkinlik düzenlemede üye olarak çalışma

E1- Laboratuvar Uygulamalarında Moleküler Tekniklerin Yeri ve Kullanım Kursu, Çukurova Üniversitesi, Adana, Yardımcı Araştırmacı, 29 Ocak- 02 Şubat 2018 (TÜBİTAK)

E2- Biyosensör Kursu. 29. Ulusal Biyokimya Kongresi/TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi, Davetli Konuşmacı/Eğitmen, Bodrum-Muğla, 26 Ekim 2018.

E3- Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı (Çevrimiçi) Eğitim Kursu, Yardımcı Araştırmacı, 20-26 Mayıs 2021 (TÜBİTAK)

E4- Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı (2.Çevrimiçi) Eğitim Kursu, Yardımcı Araştırmacı, 13-18 Haziran 2021 (TÜBİTAK)

E5- Uygulamalı Biyosensör Geliştirme Kursu, Davetli Konuşmacı/Eğitmen 19-23 Eylül 2017, 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, Erzurum.

E6- 2nd Advanced Course in Molecular diagnostic (C-CMBC/IFCC), Yardımcı Araştırmacı, 30 Kasım-3 Aralık 2022, Adana, Türkiye

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

Türk Biyokimya Derneği