

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

**FETAL CELL-FREE DNA TAYİNİNE YÖNELİK
GENOSENSÖR ÇALIŞMASI**

Umut KÖKBAŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah TULİ

ADANA-2019

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

**FETAL CELL-FREE DNA TAYİNİNE YÖNELİK
GENOSENSÖR ÇALIŞMASI**

Umut KÖKBAŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah TULİ

ADANA-2019

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TDK-2017-8841 No'lu proje ile desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Fetal Cell-Free DNA tayinine yönelik Genosensör Çalışması” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi 27-08-2019

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Abdullah TULİ
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Nurten DİKMEN
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Levent KAYRIN
Girne Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL
Gazi Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Elif ORUÇ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun/....../2019 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. 27/08/2019

Kayıtlı Olunan Program : Tıbbi Biyokimya
Tezin Konusu : Fetal Cell-Free DNA tayinine yönelik Genosensör Çalışması

Tezin Türü : Yüksek Lisans: ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Abdullah Tuli
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 5334570408
E-Posta : tuliabd@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 5073533374
E-Posta : ukokbas@cu.edu.tr

Adresi : Gürselpaşa Mah 72111 Sok Üstemel 2 Sit. A blok 8/15,
Seyhan, Adana

İMZA

Umut KÖKBAŞ

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince büyük özveri ve sabrıyla yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye ve bir dönem tez danışmanlığımı yapan Prof. Dr. Levent KAYRIN'a çok teşekkür ederim.

Ders aşamasında teorik bilgilerini aktaran, uygulamalarımda yardımlarını esirgemeyen, tez yazımı sırasında verdiği önerilerle tezime katkı sağlayan Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e teşekkür etmemin yanı sıra Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e, Prof. Dr. Tamer C. İNAL'a, Doç. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK'e ve Öğretim Görevlisi Dr. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ'e eğitimime kattıkları artı değerden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden çok yararlandığım Tek. Halil GÜLSEV'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Güray KILINÇÇEKER'e çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim sürecinde manevi desteklerinden ötürü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarım Doktora Öğr. Duygu DÜZGÜNCE BOĞA'ya, Arş. Gör. Mustafa M. ALPARSLAN'a, Arş. Gör. Başak GÜNAŞTI'ya, Arş. Gör. Yusuf DÖĞÜŞ'e, Arş. Gör. Kezban KARTLAŞMIŞ'a ve Arş. Gör. Ü. Fulden BOZKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarını sürecince desteğini benden esirgemeyen eşim ve aileme teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TDK-2017-8841 No'lu proje ile maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Biyosensörler	4
2.2. Doğum Öncesi Tanı Tanımı, Amacı ve Başlangıcı.....	25
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Gereçler	28
3.2. Çalışma Sırasında Kullanılan Aletler.....	28
3.3. Kimyasallar.....	29
3.4. Örneklem	29
3.5. Yöntemler.....	30
3.6. Duyarlılık ve Özgüllük Çalışmaları	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. ARMS Bulguları	40
4.2. Genosensörde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	41
4.3. Çalışma Aralığının Belirlenmesi	41
4.4. Nanopolimer Miktarının Optimizasyonu	42
4.5. Biyoaktif Tabakanın Biyofizikokimyasal İncelemesi.....	43
4.6. Çalışma Tamponu ve En iyi pH Değerinin Belirlenmesi.....	45
4.7. En iyi Prob Derişiminin Belirlenmesi.....	46
4.8. . SAM Süresi Optimizasyonu	47
4.9. En iyi Tampon Derişiminin Belirlenmesi	48
4.10. En iyi Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	48

4.11. En iyi Tarama Hızı Değerlerinin Belirlenmesi	49
4.12. Optimize edilmiş biyoaktif tabakanın biyofizikokimyasal özellikleri...	50
4.13. “Cell-Free” Fetal DNA Genosensör Çalışma Sonuçları	52
4.14. Duyarlılık ve Özgüllük Çalışmaları	52
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	68
Bilgilendirme ve Rıza Olur Formu	74
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensörün yapısı ve bileşenleri.....	5
Şekil 2.2. Niceleyici biyosensör yapısı	9
Şekil 2.3. Baryum titanat ve perovskite kristal yapısı.....	13
Şekil 2.4. Kutuplaşma sürecinin şematik çizimi.....	13
Şekil 2.5. Piyezoelektrik elemanın davranışı.....	15
Şekil 2.6. Provskit kristalinin şematik görüntüsü	16
Şekil 2.7. Temel piyezoelektrik sensör çeşitleri	18
Şekil 2.8. QCM sensörleri	19
Şekil 2.9. Kuvars kristali	20
Şekil 2.10. Kuvars kristalinin elektrot kesimi	20
Şekil 2.11. QCM'in basit gösterimi	22
Şekil 2.12. SH-Modifiye probun altın yüzeye bağlanması	24
Şekil 3.1. Hema yapısı.....	33
Şekil 3.2. MAC monomerinin sentezi.....	33
Şekil 3.3. Poli Hema-MAC nanopolimerinin yapısı	33
Şekil 3.4. Genosensör düzeneği ve çalışma ilkesi	35
Şekil 4.1. Örneklerin ARMS görüntüsü	40
Şekil 4.2. Döngüsel voltamogram.....	41
Şekil 4.3. Nanopolimer miktarındaki değişiminin genosensör yanıtı üzerine etkisi	43
Şekil 4.4. Altın elektrot yüzeyine bağlı Hema-MAC'ın SEM görüntüsü	44
Şekil 4.5. Biyoaktif tabakanın FTIR görüntüsü.....	45
Şekil 4.6. pH değişiminin genosensör yanıtı üzerine etkisi	46
Şekil 4.7. En iyi prob derişiminin genosensör yanıtı üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.8. SAM süresi optimizasyonu	47
Şekil 4.9. En iyi tampon derişiminin genosensör yanıtı üzerine etkisi	48
Şekil 4.10. Optimum DNA denatürasyon sıcaklığı	49
Şekil 4.11. Optimum bağlanma sıcaklığı	49
Şekil 4.12. Genosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltamogramlar	50
Şekil 4.13. Biyoaktif tabaka hazırlama basamaklarında alınan FTIR görüntüleri.....	50
Şekil 4.14. Optimize edilmiş nanopolimer ve mutant prob eşleşmesinin SEM görüntüsü	51
Şekil 4.15. Prob bağlı biyoaktif tabakanın amplikon ile etkileşime girdikten sonrası SEM görüntüsü	52
Şekil 4.16. "Cell-free" fetal DNA IVS1-110 (G→A) genotipinin genosensör hibridizasyon çalışmaları.....	53
Şekil 4.17. Genosensör çalışmalarının ROC eğrisi.....	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Prediktif değer tablosu	39
Tablo 2. Fetal DNA'ların IVS1-110 (G→A) mutasyonu bakımından genosensör ve ARMS sonuçları duyarlılık ve özgüllük tablosu	54
Tablo 3. Maternal kandan elde edilen fetal mutasyon sonuçlarının listesi	55



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ARMS: “Amplification-Refractory Mutation System”

Au: Altın

FTIR: Feuer Dönüşümlü Kızıl Ötesi

FET: “Field Effect Transistor”

Hema-MAC: Hidroksietilmetakrilat- Metakriloil-Amido-Sisteyin

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

QCM: Kuartz Kristal Mikrobals

LS: “Linear Sweep” Yöntemi

Pt: Platin

ROC: “Reciever Operating Charactersitic”

SAM: Kendiliğinden Bağlanabilen Tabaka

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

PCR: Polimeraz Zincir Tepkimesi

PZT: Kurşun zirkonyum titanat

PVDF: Kutuplanmış polivinilidin floriür

SPR: “Surface Plasmon Resonance”

TR: Türkiye

ÖZET

Fetal Cell-Free DNA Tayinine Yönelik Genosensör Çalışması

21. yüzyılın laboratuvar teknolojisi olan biyosensörler klasik yöntemlere kıyasla sahip oldukları avantajlar sebebiyle yoğun ilgi görmektedir. Genetik analizlerde kullanılan biyosensörlere genosensör adı verilmektedir. Genosensörler rutin genetik analizler ile karşılaştırıldığında, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) ve jel elektroforezi gibi zaman alıcı ve maliyetli işlemleri gerektirmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, maternal kandaki “cell-free” fetal DNA'dan paternal mutasyon tayini için nanopolimer bazlı genosensör ile yeni bir prosedür geliştirmektir. Kuvars-kristal mikrobals (QCM) ve biyosensör teknolojilerini kullanarak β -talasemi IVS1-110 mutasyonunun analizine uygulanmıştır. Bu amaçla, mutasyona ait problemler genosensör elektrodu üzerine Poli Hema-MAC nanopolimeri aracılığıyla bağlandı ve daha sonra örnekler tespit amacıyla çalışma hücrelerine eklendi. Genosensörün optimizasyon, karakterizasyon, duyarlılık ve özgüllük çalışmaları yapıldı.

Geliştirilen biyosensör, yüzeyine bulunan proba özgül olarak fetüsün paternal mutasyon varlığını ortaya koyabilmektedir. Rutinde kullanılan geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha düşük maliyetli, hızlı sonuç verebilen, özgüllüğü ve saptama etkinliği yüksek olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Genosensör, “Cell-Free” Fetal DNA, Nanopolimer

ABSTRACT

Genosensor Study for Cell-Free Fetal DNA Detection

Biosensors, the laboratory technology of the 21st century, have received great interest due to their advantages over conventional methods. Biosensors used in genetic analysis are called genosensors. Genosensors do not require time-consuming and costly procedures such as polymerase chain reaction (PCR) and gel electrophoresis as compared to routine genetic analysis.

The aim of this study is to develop a new procedure with nanopolymer based genosensor for the determination of paternal mutation from cell-free fetal DNA in maternal blood. β -thalassemia IVS1-110 mutation analysis was performed using quartz-crystal microbalance (QCM) and biosensor technologies. For this purpose, the probes of the mutation were immobilized on the genosensor electrode surface by means of Poly Hema-MAC nanopolymer and then samples were added to the working cell for detection. Optimization, characterization, sensitivity and specificity studies of the genosensor were performed.

The developed biosensor can detect the presence of paternal mutation of the fetus specific to the probe on its surface. Compared with the traditional methods used in routine, it was found to be more cost-effective, faster, with high specificity and detection efficiency.

Key Words: Genosensor, Cell-Free Fetal DNA, Nanopolymer

1. GİRİŞ

Biyosensörler, “biyo” (hayati) ve “sensör” (algılayıcı) kelimelerinden oluşan nitel ve nicel analiz yapabilen karmaşık cihazlardır^{1, 2}. Biyosensörler ilk olarak, 1950’lerin sonlarında Lenand C. Clark’ın geliştirdiği ameliyatlar sırasında kan O₂ miktarını bir elektrot yardımıyla izlemesiyle kullanılmıştır². O yıllarda makalelerde biyoelektrot, enzim elektrotu ya da biyokatalitik membran elektrotu gibi isimlerle anılan biyosensör terimi ilk defa Clark ve Lyons tarafından 1962 yılında kullanılmıştır. Birbiri içine geçmiş, biri biyokimyasal, diğeri çevirici olmak üzere iki birleşik sistemin birleşiminden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısım, analizi yapılacak madde ile etkileşime girerek onu tanıır³. Bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürün, çevirici kısım tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir⁴.

Nano malzemelerin çıkış noktasını oluşturan nanopolimerler çok farklı boyutta ve farklı yapılarda üretilebilirler⁵. Nanopolimerler, biyomoleküllerle mükemmel bir uyumluluk sağlar; eşsiz yapıları elektronik, manyetik, optik, katalitik özellikleri, nanopolimerleri iletken bir materyal haline getirir⁶. Böylece, çeşitli elektrokimyasal, optik veya rezonans yöntemler kullanılarak DNA hibridizasyonu saptanmasına dayalı sensor sistemlerinde, biyoaktif tabaka olarak kullanılabilirler^{7, 8}.

Nanopolimerler, özellikle nanobiyoteknoloji alanında yaklaşık son 20 yıldır kullanılmakta olup, genetik analizlerde son yıllarda önem kazanmış ve nanoteknoloji alanında bir mihenk taşı olmuştur⁹.

Geleneksel yöntemlerde biyolojik materyallerden nükleik asit tayini; örnek hazırlama, incelenecek olan nükleik asit dizisinin çoğaltılması ve tayini olmak üzere üç basamaklı bir işlem dizisi gerekmektedirken yeni nesil çalışmalarda bu işlemlere gerek kalmadan tayin gerçekleştirilebilmektedir¹⁰.

Genosensörler; genetik bir bozukluğu ya da bakteri ve virüsleri bir prob DNA dizisi kullanarak biyoelektrokimyasal olarak tanımaktadır¹¹. Bu olayı ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren çeviricinin yüksek duyarlılığı ve hibridizasyonun yüksek seçiciliği; genosensörlerin tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre vb. analizlerde kullanımını sağlamaktadır^{12, 13}. Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısı amacıyla tasarlanan ve klinik uygulamalara hazır hale gelen genomik DNA çiplerinin tasarımı da genosensör esasına dayanmaktadır¹⁴.

Elektrokimyasal genosensör ile DNA dizisinin algılanması, DNA bazlarının birinin yükseltgenme sinyalindeki (indikatörsüz yöntem (doğrudan ölçüm)) ya da bu bazlardan en az biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörünün yükseltgenme veya indirgenme sinyalindeki değişikliklerden (indikatörlü yöntem (dolaylı ölçüm)) yola çıkılarak yapılmaktadır¹⁵. Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde, herhangi bir indikatör kullanmadan, piyezoelektrik tabanlı titreşim sinyallerinden yararlanılarak hibridizasyon tayin çalışmaları hızla devam etmektedir^{16, 17}.

Günümüz teknolojileri, rutinde genetik hastalıkların iyileştirici tedavisini gerçekleştirememesi nedeniyle prenatal (doğum öncesi) tanı, seçeneysel önleyici tıp hizmeti araçlarından birisidir¹⁸. Doğum öncesi tanı aracının rutinde uygulanabilirliğine önemli katkı sağlayan unsurlardan birisi de biyo ve nanoteknolojik alanlarda gerçekleşen gelişmeler olmuştur¹⁹. Bu alanlarda ki gelişmeler; tanı güvenilirliğinin artmasına, daha fazla hastalığa tanı konulabilmesine, daha erken dönemde ve daha hızlı tanı konulabilmesinin yanı sıra tarama testlerinin gelişmesi ile yaygınlaşmasına da olanak sağlamıştır²⁰. Doğum öncesi tanı uygulamalarında erken tanı koyabilmek ve sonuca göre gerekli kararı verebilmek çok önemlidir^{21, 22}. Doğum öncesi tanı amacıyla kullanılan yöntemlerin amacı, gebeliğin sonlandırılması için bir araç olmaması yanında; fetüsün durumu hakkında doğru bilgi vermek, aileye kendi kararlarını kişisel, sosyal ve etik ilkeler çerçevesinde vermesini sağlamaktır²³.

Kalıtsal olarak geçiş gösteren genetik bozuklukların doğum öncesi tanısı, 1970'lerde yapılan uygulamalardan bu yana, yaklaşık 50 yıllık deneyim ile pek çok ülkede rutin olarak uygulanmaktadır^{24, 25}. Hemoglobin sentez bozukluklarının moleküler düzeyde tanımlanan ilk tek gen bozukluklarından olması, mutasyon saptamada ve sonuçta globin gen mutasyonlarının doğum öncesi tanısında kullanılan literatürde polimeraz zincir tepkimesine (PCR) dayalı pek çok tekniğin geliştirilmesi için bir prototip oluşturmuştur^{26, 27, 28}.

Günümüzde hemoglobinopatilerin henüz kesin tedavisi olmadığı için doğum öncesi tanı, bu bozuklukların bir anlamda koruyucu hekimliğini sağlamaktadır²³. Doğum öncesi tanı, gebeliğin olası en erken evresinde doğru ve hızlı sonuç bulmayı amaçlamaktadır²⁹. Doğum öncesi tanı için sağlanması istenen ön koşullar:

- 1-Risk altında olan çiftlerin uygun zamanda belirlenmesi,
- 2-Hastalığa neden olan mutasyonların tanımlanması,
- 3-Fetal materyalin gecikmeden, güvenli şekilde alınması,

4-Ebeveynlerin mutasyonlarına bakılarak fetal DNA'nın genotipinin araştırılmasıdır.

Doğum öncesi tanı alanındaki yeni gelişmeler, bu süreçlerin hem güvenilirlik hem de daha erken dönemde sonuç verme çalışmalarına doğru yönlendirilmesinin yanı sıra fetal genetik materyalin farklı kaynaklarını kullanan yeni moleküler teknolojilerin uygulanmasını içermektedir³⁰. Günümüzde doğum öncesi tanı süreçlerinin en büyük dezavantajı, fetal örneklemede girişimsel yöntemlerin kullanılmasıdır. Kullanılan bu girişimsel fetal örnekleme yöntemlerinde fetal kayıp riski bulunmaktadır³¹. Bu nedenle son dönemlerde, girişimsel olmayan yöntemlerle doğum öncesi analiz çalışmaları büyük bir hız kazanmaktadır. Bu çalışmalar anne kanında bulunan fetal hücreler ve serbest fetal DNA'yı kullanarak yapılmaktadır³². Lo ve arkadaşları 1997 yılında yapmış oldukları bir çalışmada gebelerin plazmasındaki serbest fetal DNA'nın varlığını Y kromozom dizilerinin saptanmasıyla ortaya koymuşlardır³³. Niceliksel analizler maternal plazmadaki fetal DNA derişiminin, hücre içinde bulunan fetal DNA'dan daha fazla olduğunu göstermiştir³⁴. Bu bulgu, maternal plazmadaki fetal DNA'nın girişimsel olmayan doğum öncesi tanı için çok değerli bir materyal olabileceği sonucunu ortaya koymuştur^{33, 34}.

Bu tez çalışmasında, rutinde kullanılan girişimsel doğum öncesi tanı araçlarından koryonik vilüs örneklemesinin geleneksel PCR tabanlı moleküler yöntemleri yanı sıra, girişimsel olmayan bir yöntemle anne kanındaki serbest fetal DNA'nın piyezoelektrik tabanlı yeni teknolojik bir yöntem kullanarak, genetik özelliğinin ortaya konması ve sonuçların geleneksel yöntemle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Biyosensörler

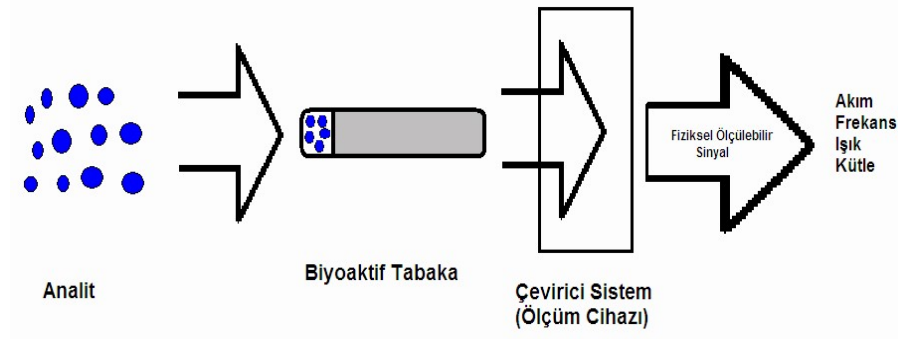
Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ile biyolojik materyallerin birleştirilmesinden oluşan analitik sistemlerdir². Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek özgünlüğü ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı birleştirilmiştir¹. Çok sayıda biyoorganik molekül ve bazı inorganik moleküllerin analizinde kullanmak amacı ile pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, ilaç üretimi ile analizlerinde ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır².

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyobileşenle etkileşime girmesi sonucu iletilen sinyal yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır³⁵.

Tüm biyosensörler moleküler düzeyde algılama ve sinyal işleme olmak üzere iki temel görevi yerine getirmektedir³⁶.

Algılama Bölümü: Ortamda bulunan ve analizi yapılacak olan kimyasal ya da biyolojik materyal ile etkileşime girerek algılanmasını sağlayan “biyolojik ara yüzey” dir³. Algılama bölümü biyosensör için oldukça önem taşıdığından seçici ve kararlı yapıda olması gerekir³⁷. Biyosensörün ara yüzeyini oluşturan doku, hücre, antikor, enzim, reseptör, nükleik asit gibi biyolojik materyaller, özgül şekilde bağlanarak hedef ile etkileşirler⁴. Genosensörlerde bu ara yüzey nükleik asitlerden oluşur³⁸.

Sinyal İşleyici Bölüm: Hedef ile biyolojik ara yüzeyin etkileşimi sonucu oluşan ürün, çevirici birimi tarafından okunabilir sayısal bir değere çevrilir³⁹. Çevirici cihazlar, akım, potansiyel, ışık şiddeti, kütle ya da ısı değişimine duyarlı olabilir⁴⁰.



Şekil 2.1. Biyosensörün yapısı ve bileşenleri².

İlk biyosensör çalışmaları, L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O_2 'ye duyarlı amperometrik bir elektrotla ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında O_2 'ye duyarlı amperometrik elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glukoz biyosensörüdür⁴¹. Bu gelişmenin ardından pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörler Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından 'Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde yanıt veren ve derişime bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar' olarak tanımlanmıştır^{2, 42}. Biyosensör teknolojisi o kadar hızlı gelişmektedir ki; IUPAC tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonunun 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı bu biyosensör tanımı biyomikroçiplerin gelişimi ile daha şimdiden geçerliliğini yitirmiş olmasına rağmen genel olarak biyosensörleri aşağıda verildiği gibi sınıflandırabiliriz².

- Elektrokimyasal Biyosensörler
- Amperometrik/Voltametrik Biyosensörler
- İletkenlik/Kapasitans/Empedans Biyosensörler
- Optik Biyosensörler
- Emilim ve Yansıtma Biyosensörleri
- Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

2.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, diğer biyosensörler ile kıyaslandığında içlerindeki gelişmişliğini neredeyse tamamlamış ve en eski olanlarıdır⁴³. İlk yıllarında biyosensörler, kandaki glukoz seviyesinin saptanması için çalışılmış birer enzim elektrotları şeklindeydi⁴⁴. Sonrasında elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini artırmak için,

enzim-bağılantılı imünoelektrokimyasal (IEC, “Immunochemical”) sensörler geliştirildi^{2, 35}.

2.1.2. Amperometrik/Voltametik Biyosensörler

Amperometrik sensörlerde, elektrokimyasal hücrelere sabit bir potansiyel fark uygulanır ve sonra ilişkili akım bir kimyasal tepkimeye bağlı olarak elde edilir¹⁵. Amperometrik biyosensörler, biyolojik olarak aktif materyalle kaplanmış olduğundan dolayı elektrokimyasal elektrot yardımıyla, derişim bağımlı akımı ölçer⁴. Amperometrik dönüştürme, oksidasyon ve elektro aktif türlerin bir elektrot yüzeyinde indirgenmesi üzerine çalışır⁴⁵.

Amperometrik bir dönüştürücü, herhangi bir enzim, antikor, DNA probu, hücreler ve dokular da dahil biyoalgılama materyali ile birlikte kullanılabilir⁴⁶. Örneğin, çeşitli alaşım materyaller kullanarak, glutamat biyosensörü geliştirmek amacıyla stabil bir enzim elektrotu tasarlamışlardır⁴⁷. Sensörlerinin geniş doğrusal aralıkta, uzun ömürlü, yüksek hassasiyet ile çalıştığını ifade etmektedirler⁴⁸. Bir başka çalışmada ise trigliserit algılamak için amperometrik bir biyosensör hazırlanmıştır³. Diğer bir çalışmada da meyve suyu ve benzeri sıvılardaki görelî antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla yüksek hassasiyetli amperometrik enzim biyosensörü oluşturmuşlardır⁴⁹.

2.1.3. Potensiyometrik Biyosensörler

Potensiyometrik biyosensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu dönüştürücüler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilimdeki değişiklikleri takip eder³⁶. Potensiyometrik tespit, biyolojik algılama elementi içeren bir elektrokimyasal hücre içerisinde genellikle ya bir ürünün aktivitesi ya da elektrokimyasal tepkimedeki bir tepkenin aktivitesinin gerilimini ölçer⁵⁰.

Bunlar çeşitli şekillerde kullanılabilirler. Alan etkili transistörü (FET, “Field Effect Transistor”), Bergveld tarafından önerilmiş olup, etiketsiz olarak bağlanmayı gerçekleştirmek için elverişlidir. FET’lerin boyutlarının küçük olması istenen özelliklerindendir⁵¹.

2.1.4. İletkenlik/Kapasitans/Empedans Biyosensörler

İletkenlik, kapasitans ve empedans biyosensörleri elektrik alandaki değişimleri ölçmek amacıyla tasarlanmıştır⁵². Empedans biyosensörleri daha ziyade patojenik bakteri tayini amacıyla kullanılmıştır⁵³. Empedans biyosensörlerinin birçok tipi, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* (*E. coli*)'nin hızlı saptanması için tasarlanmıştır⁵⁴.

2.1.5. Optik Biyosensörler

Optik tabanlı biyosensör yöntemleri de bugün için kimyasal yöntemler gibi önceden beri yaygınca kullanılan ve artık daha fazla gelişmeye açık olmayan teknikler arasındadır^{2,55}. Biyosensörlerin üretiminde çeşitli optik teknikleri kullanılmıştır. Optik biyosensörler temel olarak 5 bileşenden oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla, ışık kaynağı, ışık demetini oluşturan optik kısım ve bu ışığı yönlendirecek kısımlar, algılayıcı ve ışık dedektörüdür³⁵.

Optik biyosensörlerde dönüştürücüden çıkan sonuç türü ışıktır. Optik kırılma veya elektrokemilüminesansa dayanarak bu çeşit biyosensörler yapılmaktadır. Bu biyosensörler, dönüştürücü yüzeyinde olan reseptörlerle hücrelerin (analit) etkileşimi sonucunda ortaya çıkan kırılma indeks veya ufak kalınlık değişiklikleri tespit edebilmektedir. Işık özellikleri derişim, kütle veya moleküllerin sayısının değişmesi ile bağlantılıdır⁵⁵.

2.1.6. Emilim ve Yansıtma Biyosensörleri

Enzimatik tepkime sonucunda sistemin pH değerindeki farklılıklardan dolayı sistemdeki renkli madde derişimindeki değişimlere bağlı bir takım absorpsiyon farklılıkları söz konusu olmaktadır⁵⁶. Son zamanlarda yapılan çalışmalardan örnekler verilirse, bir çalışmada yiyeceklerdeki penisilinin algılanabilmesi için bir sensör geliştirmişlerdir⁵⁷. Başka bir çalışmada ise *E. coli*'nin saptanması için, immünomanyetik ayırma ile floresan bağışıklık tahlili birleştirilmiştir⁵⁸. Diğer bir çalışmada ise su örneklerinde nitrat tayini için kullan at biçimde optik biyosensör tasarlanmıştır⁵⁹.

2.1.7. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

Polarize ışık, yüzeyi altın kaplı bir prizmaya gönderildiğinde ışığın bir kısmı soğurulmakta, bir kısmı da yansımaktadır⁶⁰. Geliş açısı değiştirilip yansıyan ışığın şiddeti

izlendiğinde yansıyan ışık şiddetinde azalma görülür⁶¹. Yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kaybın gerçekleştiği açıya salınım açısı ya da Yüzey Plazmon Rezonans (“Surface Plasmon Resonance”, SPR) açısı adı verilir^{60, 62}.

Bu geliş açısında ışık, yüzey plazmonlarını (elektron paketçikleri) harekete geçirecek, yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşecektir. Yüzey plazmon rezonansı iki optik ortamın ara yüzeyine ince iletken bir film yerleştirildiğinde meydana gelir. Özgül bir geliş açısında metal yüzeyindeki elektron salınımlarının eşleşmeleri nedeniyle gelen ışık ile rezonans durumuna gelecektir. Bu rezonans durumunda enerji soğurulacağı için yansıyan ışının yoğunluğunda bir azalma meydana gelmektedir. Rezonans açısı, kırılma indeksindeki (RI) ve gerçek metal yüzeyden 800 nm’ye kadar olan bir mesafede ara yüzeydeki dielektrik sabitindeki değişikliklere karşı hassastır. Yüzey ile olan mesafe arttıkça, hassasiyet katlanarak azalır, bu da SPR tabanlı biyosensörün küçük parçacıklar üzerinde daha iyi çalışmasını sağlar^{60, 61}.

Yapılan bir araştırmada, klinik örneklerden prostat özgül antijeni (PSA) gerçek zamanlı ve aşırı hassas bir şekilde algılamak için SPR biyosensörü kullanılmıştır⁶³. 2017 yılında yapılan bir çalışmada ise bir fiber optik SPR biyosensör kullanarak mandıra sütündeki progesteronun saptanması için tahliller yapılmıştır⁶⁴. Başka bir araştırmada birden fazla tümör belirteçlerinin nicel tayin edilebilmesi için antikor konjugatlarını kullanan sinyal amplifikasyonuna dayalı bir SPR biyosensörü üzerinde araştırmalar yapılmıştır⁵⁰.

2.1.8. Optik Fiber Biyosensörler

Optik fiber, örneği uzaktan kontrol ederken, ışığın yönünü değiştirmek için kullanılır⁶⁵. 2016 yılında yapılan bir araştırma, mikro yapılandırılmış optik fiber tabanlı biyosensörler ile çinko iyonlarının geri dönüşlü ve nanolitre ölçekli ölçümü üzerinedir⁶⁶. 2018 yılına ait araştırmada, kayıplı mod rezonans tabanlı optik fiber cihazlarla yüksek hassasiyetli ve seçici C-reaktif protein saptama üzerine çalışılmıştır⁶⁷. 2018 yılında yayınlanan diğer bir çalışma ise immobilize edilmiş optik fiber mikro probunu kullanarak yüksek duyarlılıkla ve seçicilikle *E. coli* tespiti üzerinedir⁶⁸. Yine 2018 yılında yapılan bir araştırmada, nükleik asit tespiti için U-bükülmüş plastik optik fiber tabanlı plazmonik biyosensör geliştirilmiştir⁶⁹.

2.1.9. “Quantilever” (Niceleyici) Biyosensörler

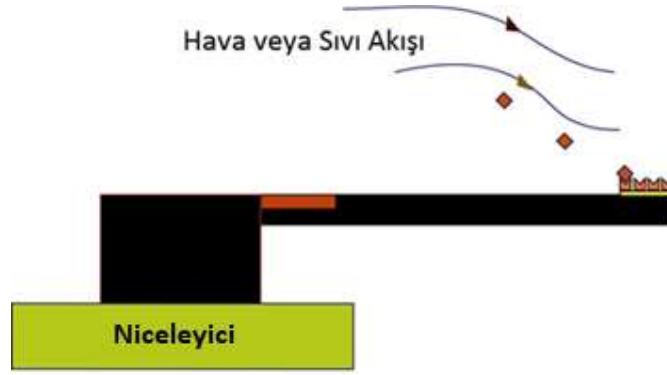
Niceleyici çok hassas bir kütle ölçüm sensörüdür¹⁴. Yüzeyindeki birkaç molekülün ağırlığını bile ölçebilecek hassasiyettedir. Niceleyici biyosensörün yüzeyinde bulunan biyoreseptör ile analitin tepkimeye girmesi sonucunda ortaya çıkan kütle artışına bağlı olarak, dinamik modda niceleyici biyosensörün salınımında meydana gelen değişim ölçülürken durağan modda ise niceleyici biyosensör yüzeyleri arasında meydana gelen bükülme ölçülür⁷. Niceleyici biyosensörler, taşınabilir, ucuz, tümleşik ve güvenilirliği fazla olan bir platformdur⁷⁰.

Niceleyici biyosensörlerin yanıtı kapasitif, piyezorezistif, optik, piyezoelektrik, elektron tüneli gibi çeşitli tekniklerle tespit edilebilmektedir². Nano teknolojinin gelişmesiyle birlikte, niceleyici biyosensörlerin analit yakaladığı zaman, salınımındaki değişimin artırılması amacıyla tasarım çalışmaları yapılmaktadır⁵². Bir ucu sabit diğer ucu serbest olan bu yapıların mikro veya nano boyutlarda olduğu gözden kaçırılmamalıdır⁷¹. Şekil 2.2’de niceleyici biyosensör yapısı görülmektedir.

Optik yöntemlerde düşük güçte çalışan bir lazer ışını kullanılır. Kullanılan lazer ışını sensör yüzeyine çarpar ve pozisyon algılayıcı detektörde yansımaları görülür⁵⁵. Bu yansıma açısına göre, algılanan analitin ağırlığı hesaplanmış olur. Maliyetinin yüksek olması olumsuz özelliklerindendir. Bir diğer olumsuz özelliği ise kullanılan sinyalin bir elektrik sinyali olmaması sebebiyle, sinyali işlemekte ortaya zorluklar çıkmasıdır^{2, 55}.

Piyezoelektrik özellikli maddeler üzerlerinde mekanik baskı (kütle artışı) hissettiği zaman salınımlarında değişim söz konusu olur. Bu değişimi algılayarak kütle hakkında yorumlar yapılabilir⁷².

Piyezorezistif yöntemde ise piyezorezistif malzemeler gerildiği zaman iletkenlikleri ve dirençleri değişen malzemelerdir⁷³. Burada ise dirençteki değişim çeşitli tekniklerle ölçülerek, algılanan analitin kütlesi hakkında yorum yapılır⁷⁴.



Şekil 2.2. Niceleyici biyosensör yapısı⁷³.

Fritz ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir araştırmada bu sensörlerin, pH ve ısı değişikliklerini algılayabildiğini ve DNA hibridizasyonu dahil olmak üzere antikor-antijen etkileşimlerini ayrıca bakteri soğurumunu bile tespit edebildiğini açıklamıştır⁷⁵.

2.1.10. Piyezoelektrik Biyosensörler

2.1.10.1. Piyezoelektrik Tarihçesi

“Piyezoelektrik” Yunancada basınç anlamına gelen "piyezo" kelimesinden türetilmiştir ve “basınç-elektriği” anlamına gelir⁷⁶. Piyezoelektrik kristale uygulanan basınç, gerilmenin büyüklük ve şekliyle orantılı olarak elektriksel kutuplaşmaya neden olur ve bu olay düz piyzeoelektrik etki olarak adlandırılır⁷⁷. Ters piyzeoelektrik etki ise kutuplaştırmacı elektrik alana maruz kalan malzemede meydana gelen elastik gerilme ile açıklanmaktadır⁷⁸.

Gerçekte, insanoğlu piyzeoelektrik malzemeleri çağlar boyunca kullandı. İyi bilinir ki, ilkel insanlar ateş yakmak için kuvarsın bir çeşidi olan çakmak taşının mekanik çarpışma etkisine başvurmuşlardı. Aslında çakmak taşı, yapı inşalarında ve silah olarak kullanılabilecek kesici özelliğe sahip olması nedeniyle taş devrinin ana malzemesiydi³⁵. Bu malzemenin çakmak olarak kullanımı, alet yapımı sırasında kaza sonucu ortaya çıkmıştır. Daha sonra, kibritin icadından önce bu malzeme ile demir çarpıştırılarak kullanımına devam edildi. Ancak, çakmak taşının bu özel ve kullanışlı özelliği ile sadece tutuşturucu olarak kullanılmaması yönünde görüşler ortaya çıkması üzerine, piyzeoelektriklik üzerindeki ilk ciddi deneysel çalışmalar Pierre ve Jacques Curie tarafından 1880 yılında gerçekleştirildi^{2, 35}. Bu etkinin ilk kanıtları kuvars gibi tek

kristallerde keşfedilmiştir. Bu deneyler (turmalin, kuvars, topaz, şeker kamışı ve Rochelle tuzu ile) özel olarak hazırlanan malzemelerle mekanik basınca bağlı yüzey şarj oluşumunun kesin olarak ölçülmesi sonucu oluşmuştur⁸. Düz piyezoelektrik ve ters piyezoelektrik özelliğin, matematiksel anlamı Lippmann tarafından temel termodinamik ilkelerine dayandırılarak 1881 yılında ortaya çıkarıldı. Curie kardeşler hemen ters piyezoelektrikliğin varoluşunu Lippmann'ın bu çıkarımları ile doğruladı ve piyezoelektrik kristallerdeki elektro-elasto-mekanik deformasyonun tamamının tersine çevrilmesinin mümkün olduğunu nicel kanıtlarla ortaya koyarak bu yönde çalışmalarına devam etti².

Piyezoelektrik cihaz uygulamalarındaki önemli ilk sayılabilecek uygulamalar I. Dünya Savaşı esnasında görülmüştür. 1917 yılında, P. Langevin ve Fransız meslektaşları eksiksiz bir ultrasonik denizaltı detektörü yapımına başladılar¹. Bu güç çevirici sistem, iki çelik plaka arasına yapıştırılmış ince kuvars kristallerinin mozaiği şeklinde tasarlanmış ve dalış için uygun bir yere montajı yapılmıştır¹.

Sonar sistemlerdeki başarı, çeşitli piyezoelektrik cihazların geliştirilmesinde itici güç olmuştur. Birçok klasik piyezoelektrik uygulama bugün mikrofonlar, akselerometreler, ultrasonik dönüştürücüler, gramofonlar, sinyal filtreleri gibi yaygın bir şekilde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. II. Dünya Savaşı sırasında, ABD, Japonya ve Sovyetler Birliğinde araştırma grupları yaygın olarak kullanılan sıradan kristallerden 100 kat daha büyük dielektrik sabitine sahip baryum titanat gibi malzemeleri metal oksit tozu sinterleme (katı maddeyi parçalayıp ezip toz haline getirdikten sonra fırınlayarak yeniden şekillendirme) yöntemi ile üretmek için anizotropik yapay polikristal yapılardan keşfedilen kondansatör malzemelerini geliştirmek üzere çalışmıştır⁷⁹. Gelişi güzel dağılmış ve makro boyutta binlerce küçük tek kristalin ortalama dağılımından dolayı malzemeler makro boyutta piyezoelektrik etki gösterememiştir⁷⁹.

Ancak, 1946'dan önce bilim adamları, genellikle ferroelektrik seramikler olarak bilinen bu tip polikristal malzemelerin polarizasyon olarak adlandırılan elektrik alan uygulaması ile piyezoelektrik özellik kazandırılabilceği keşfetmişlerdir. Bu kolay üretilmiş şaşırtıcı performans karakteristiklerine sahip piyezoelektrik malzemenin keşfi, çarpıcı araştırmaların yeniden canlanmasını ve piyezoelektrik cihazların gelişmesini ateşleyen faktördür⁸⁰.

Genellikle kurşun zirkonyum titanat (PZT) sistemine yeni bileşenler eklenerek farklı bileşikler oluşturulmuş ve PZT'nin özelliklerini geliştirmek için yapılan bu işlemin sonuçları rapor edilmiştir⁸¹.

1969 yılında tek bir ekseninde yorulmuş ve uygun bir elektrik alanında kutuplanmış poliviniliden florid (PVDF)'in güçlü piyoelektrikliği ve piroelektrikliği keşfedilmiştir. Ayrıca, naylon veya PVC gibi diğer plastiklerinde, piyoelektrik etki gösterdiği bilinmektedir fakat bu plastikler PVDF'den daha az yoğunluğa sahiptir⁸².

80'lerin başından itibaren farklı yeni malzemelerin piyoelektrik özellikleri incelenmiştir. İçinde seramik, polimer ve yönlendirilmiş taneli cam-seramik bulunan alaşım malzemelerin (tek camlı faz ve bir ya da daha fazla kristal fazın alaşımı) parlak bir geleceğe sahip olduğu öngörülmüştür⁸⁰.

2.1.10.2. Piyoelektrik Hakkında Teorik Bilgi

2.1.10.2.1. Ferroelektrik Özellik ve Polarizasyon

“Ferroelektrik özellik” 1921 yılında Valasek tarafından ilk kez Rochelle tuzunda (potasyum sodyum tartarat) keşfedilen ve bazı kristallerin bir kritik sıcaklığın (“Temperature of Curie”; Curie sıcaklığı; Curie noktası olarak da tanımlanan belirli manyetik malzemelerin manyetik özelliklerinde keskin bir değişikliğe uğradığı sıcaklık) altına soğutulduğunda kendiliğinden polarizasyon (Kutuplanma, *PS*) göstermesi olarak tanımlanır. Ferroelektrik kristallerde oluşan polarizasyon dışarıdan bir elektrik alan uygulandığında yön değiştirebilir⁸⁰.

2.1.10.2.2. Piyoelektrik Özellik

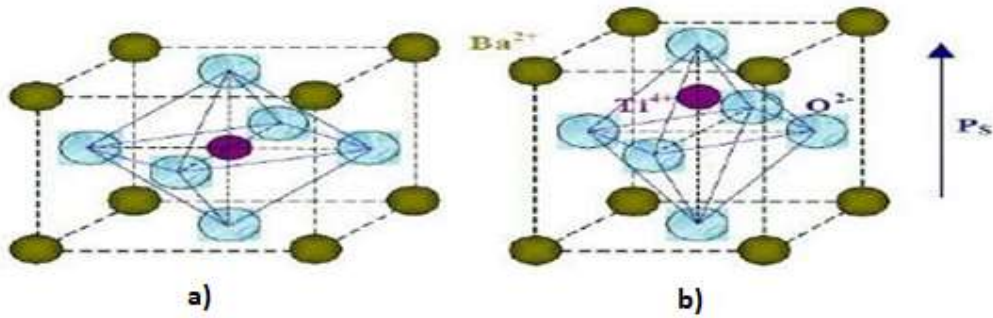
Tüm ferroelektrik malzemeler potansiyel olarak aynı zamanda piyoelektrik özellik de gösterirler⁸. Piyoelektriklik bazı malzemelerde bir mekanik gerilime maruz kaldığında bu gerilmeyle orantılı olarak elektrik yükü (şarj) üretmesidir. Bu davranış düz piyoelektrik etki olarak da adlandırılır. Piyoelektrik malzemeler aynı zamanda tersinir bir etki de gösterir ki bir elektriksel gerilim altında malzemenin geometrik olarak şekil değiştirmesidir⁷³.

2.1.10.2.3. Piyezo / Ferroelektrik Etki ve Polarizasyon

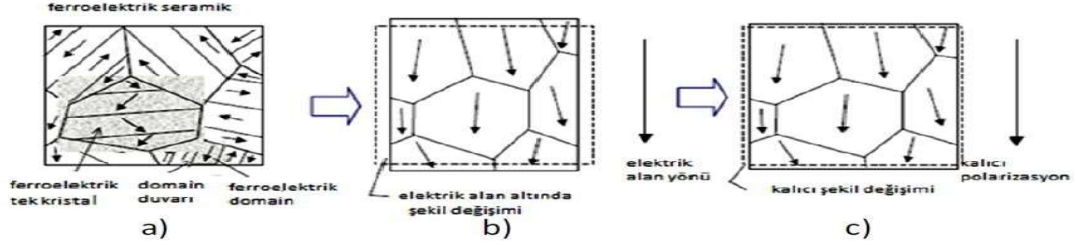
2.1.10.2.3.1. Polarizasyon

Şekil 2.3'te baryum titanatın kristal yapısı gösterilmektedir. 120 °C'lik Curie sıcaklığı denilen bir sıcaklığın üzerinde, şekil 2.3.a'da gösterildiği gibi küp köşelerinde Ba^{+2} iyonları, yan yüzlerin merkezinde O^{-2} iyonları ve yapının merkezinde de Ti^{+4} iyonlarıyla prototip kristal yapısı kübiktir. Curie sıcaklığı altında, yapı az miktarda deforme olur, şekil 2.3.b'de gösterildiği gibi Ba^{+2} ve Ti^{+4} iyonları miktarları değişmeyecek şekilde O^{-2} iyonlarıyla yer değiştirerek çift kutuplaşma (dipol) oluşturur. Bu sebeple, her bir pozitif ve negatif iyonuna ait elektriksel kutup çifti ve aynı yöne işaret eden bu çift kutup çiftlerinin birleşmesinden dolayı kendiliğinden oluşan kutuplaşma veya polarizasyon (birim hacimdeki dipol momenti) olarak düşünebiliriz. Kendiliğinden oluşan kutuplaşmanın P_s değeri ısıya bağlıysa buna piroelektrik (ısı elektrik) etkisi denir. Ferroelektrik malzemelerde büyüklük ve P_s yönü dışarıdan verilen bir elektrik alanıyla tersine çevrilebilir⁸³ (Şekil 2.4).

Yukarıda bahsedilen kristallerin dışında, laboratuvarında geliştirilen önemli bir grup piyezoelektrik malzeme ise ferroelektrik özelliği taşıyan PZT seramikleridir⁷⁸. Ferroelektrik malzemeler bir yığın küçük tek kristaller olarak düşünülebilir. Genel olarak, ferroelektrik alanlarının (domainlerin) kutuplaşmadan önce seramik bünyesinde rastgele yönelmiş dipol içeriğine sahip olmasından dolayı ferroelektrik seramikler hiçbir piyezoelektrik özelliğine sahip değildir (Şekil 2.4.a). Çünkü örnek içerisinde var olan yük ayrışmaları sonucu oluşmuş dipollerin rastgele yönelmesi vektörel toplamalarının yaklaşık olarak sıfır olması ve net bir polarizasyonun elde edilememesine neden olmaktadır⁸³.



Şekil 2.3. Baryum titanat ve perovskit (baryum titanyum oksit) kristal yapısı. a) Curie sıcaklığının üzerinde birim hücre kübiktir. b) Curie sıcaklığının altında Ba^{+2} ve Ti^{+4} iyonları O^{2-} iyonlarıyla orantılı sayıda yer değiştirmiş olan birim hücre yapısı tetragonaldır⁸³.



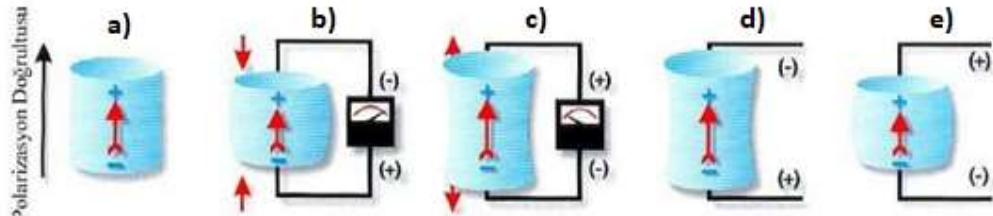
Şekil 2.4. Kutuplaşma sürecinin şematik çizimi. a) Ferroelektrik seramik-ferroelektrik tek kristal/alan duvarı/ferroelektrik alan. b) Alanın neden olduğu bozunma (uzama)/doğru akım. c) Kalıcı deformasyon/kalıcı kutuplaşma⁸³.

Malzemeye kuvvetli bir doğru akım uygulandığında her biri bir vektörel büyüklük olan tüm dipoller yine bir vektörel kuvvet olan elektrik alan yönüne yönlenmeye zorlanır. Eğer elektrik alan kuvveti yeterli gelir ise dipollerin rastgele yönlenmiş yapısı bozulur ve neredeyse hepsi aynı doğrultuda yönlenerek maksimum bir büyüklüğe ulaşırlar ki bu toplam etkiye yani malzeme hacmi içerisinde var olan tüm dipollerin momentleri toplamına polarizasyon denir. Polarizasyon bazen kutuplaşma olarak da ifade edilir. Polarizasyon sırasında, doğru akım ile benzer yönlenmiş dipollerin yönlendirilmesi çok farklı açıyla yönlenmiş olanlara kıyasla çok daha kolay olacaktır. Yönlendirilmesi en zor olan veya en yüksek elektrik alan kuvveti gerektiren dipol elektrik alanla yönlenmesi antiparalel olandır ki bu durumda aralarındaki açı 180° 'dir. Bu durumdaki polarizasyon yönlenmesi hareketine 180° polarizasyon çevrimi denilir. Ferroelektrik seramiklere alanların yönlenmesini ya da kutuplaşmasını sağlamak için uygulanan elektrik alan tersinir pizeoelektrik etki sonucu bir şekil değişimine de yol açar (Şekil 2.4.b). Malzemenin dipol içeriğine bağlı olarak bu uzama veya kısılma şeklinde olur. Tüm dipoller yani net polarizasyon ile elektrik alan ters yönlü ise kısılma gerçekleşir. Elektrik alanın kaldırılmasıyla birlikte ideal yönlendirilmiş dipoller bir miktar yönlenmesini yitirir. Bu sapma polarizasyon gevşemesi olarak ifade edilir. Bu sapmaya rağmen, önemli ölçüde belirli bir yönü koruyan dipoller bir miktar azalmayla beraber bir kalıntı polarizasyon, P_r ve gerinim, S_r oluşturur (Şekil 2.4.c). Eğer yeniden ters yönde (zıt

polarite) güçlü bir elektrik alan uygulanırsa bir domaindeki polarizasyon vektörünün ters çevrilmesine neden olabilir (polarizasyon döngüsü)⁸³.

Polarizasyon işlemi sırasında malzemenin yüzeylerine yerleştirilen elektrotlar yardımıyla malzeme üzerine doğru akım uygulanarak yüksek bir elektrik alan ($\sim 5\text{kV/cm}$) oluşturulur ve dipollerin bu elektrik alana paralel olarak yönelmesi sağlanır (Şekil 2.4.b). Polarizasyon esnasında bölgeler uygulanan elektrik alan doğrultusunda gerek ters çevrilme ile gerekse belirli bir açı kazanma yoluyla yeniden dizilerek anizotropik duruma gelirler. Polarizasyon sonrasında çok fazla gerilen bölgelerin bir kısmı yeniden eski durumlarına dönebilirler, fakat büyük bir çoğunluğunda kutuplaşma kalıcıdır (Şekil 2.4.c). Dolayısıyla polarizasyon öncesi malzeme, izotropiktir ve bu durumda piyezoelektrik davranış göstermez. Polarizasyon sonunda ise uygulanan elektrik alanı ile dipoller bir eksene doğru yönelirler ve polikristallerden oluşan tüm yapıda net bir elektriksel dipol momenti oluşur^{81, 83}.

Şekil 2.5 örneğin elektrik akımına göre gösterdiği bozunma S_3 (kutuplaşma yönünde) değişimini göstermektedir ve ayrıca kutuplaşma için gözlenen etkiye tam olarak karşılık gelen gecikme etkisini de ortaya koyduğu görülmektedir.



Şekil 2.5. Piyezoelektrik elemanın davranışı a) Elemandaki polarizasyon doğrultusu. b-c) Üreteç davranışı. d-e) Motor davranışı⁸¹.

Herhangi bir piyezoelektrik seramik eleman üzerine uygulanan mekanik basma veya çekme gerilmesi, voltaj üreterek elemanın dipol momentini bozar, polarizasyon doğrultusunda basma veya polarizasyona dik yönde çekme, polarizasyon voltajıyla aynı polariteye sahip bir voltaj üretir (Şekil 2.5.b). Polarizasyon yönünde çekme veya polarizasyon doğrultusuna dik yönde basma uygulandığında ise piyezoelektrik seramik eleman, polarizasyon voltajına zıt polariteye sahip bir voltaj üretir (Şekil 2.5.c). Seramik elemanın bu şekildeki basma ve çekme mekanik enerjilerini elektrik enerjisine

çevirmesine üreteç davranışı denir. Bu davranış; ateşleme sistemlerinde, kuru pillerde, sensör cihazlarda vb. ürünlerde kullanılır⁸¹.

Eğer seramik elemana polarizasyon voltajı ile aynı polariteye sahip bir voltaj, polarizasyon doğrultusunda uygulandığı takdirde, seramik eleman uzayacak ve çapı küçülecektir (Şekil 2.5.d). Polarizasyon voltajı ile aynı polariteye sahip bir voltaj, polarizasyon doğrultusuna dik uygulandığında ise seramik elemanın boyu kısılacak ve çaptan genişleyecektir⁸¹ (Şekil 2.5.e).

Seramik eleman üzerine AC voltajı uygulanırsa, eleman uygulanan voltajın salınımında sinüzoidal bir şekilde sırayla uzayıp kısılacaktır. Seramik elemanın bu şekilde elektrik enerjisini mekanik enerjiye çevirmesine motor davranışı denir ve piyezoelektrik motorlarda, ses ve ultrasonik titreşim üreten cihazlarda vb. birçok üründe kullanılır. Uygulanan gerilmeler ve oluşan voltaj malzeme özelliklerine bağlıdır. Bu durum uygulanan voltaj ve elde edilen gerinim değerleri için de geçerlidir⁸².

İnce düzlemsel bir nesnenin kalınlık modunun salınımı enine modundakinden çok daha yüksek olacaktır.

2.1.10.2.3.2. Piyezoelektrik Malzemeler

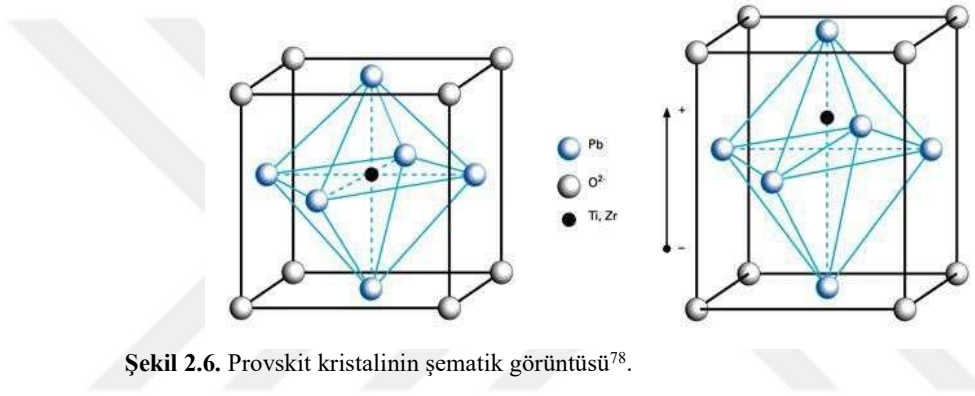
Genel olarak piyezoelektrik malzemeler; doğal piyezoelektrik malzemeler (kuvars, rochelle tuzu vb.), piyezoelektrik seramik malzemeler (kurşun-zirkonyum-titanat, baryum titanat, kurşun titanat, vb.), polimer piyezoelektrik malzemeler (naylon, vinilidin florür, trifloretilen, tetrafloretillen vb.) ve alaşım piyezoelektrik malzemeler olarak sınıflandırılabilir⁸¹.

Endüstriyel olarak uygulama alanı bulmuş en önemli ve en eski piyezoelektrik seramik malzemeler; baryum titanat ($BaTiO_3$; BT) ve PZT olarak ifade edilebilir. Her ikisi de perovskit tipi kristal yapıya sahip bu seramikler, günümüzde halen yaygın kullanıma sahiptir. Baryum titanata kıyasla daha üstün piyezoelektrik özelliklere sahip olmasıyla PZT hem büyük boyutta (bulk) seramik hem de ince film seramik biçiminde elektronik endüstrisi için çok önemlidir³⁵.

Piyezoelektrik malzemeler, doğal piyezoelektrik malzemelere göre fiziksel, kimyasal, mekanik ve piyezoelektrik özellikleri açısından daha kullanışlı oldukları gibi, kimyasal olarak da daha kararlıdır. Ayrıca neme ve atmosferik koşullara karşı da daha

dayanıklılırlar. Özel uygulamalara kolaylıkla uyum sağlayabilirler, karmaşık geometri veya büyük hacim gerektiren uygulamalar için kolay ve ucuz üretim olanağı sağlarlar⁸⁴.

Çoğu piyezoelektrik seramik, genelde perovskit kristal yapısına sahiptir. Şekil 2.6'da olduğu gibi provskit kristalleri, genellikle geniş bir kafese dizilmiş kurşun veya baryum ve oksijen iyonları gibi divalent metal iyonları arasında, küçük titanyum veya zirkonyum gibi tetravalent metal iyonları içerirler. Kristallerde, tetragonal veya rombohedral simetriyi oluşturan şartlar altında her bir kristal dipol momente sahiptir⁷⁸.



Şekil 2.6. Provskit kristalinin şematik görüntüsü⁷⁸.

APC (American Piezoceramic) International firması, “Piyezoelektrik seramik bir malzeme hazırlamak için, ince toz halindeki metal oksit tozlarını belirli oranlarda karıştırıldıktan sonra homojen bir toz karışımı elde etmek için ısıtıp; elde edilen toza organik bir bağlayıcı ekleyerek disk, tel, bar, levha, vb. şekillerde yapısal elemanlara dönüştürmektedir. Çeşitli biçimler verilmiş seramik örnekler belirli süreler dahilinde pişirme programları uygulanarak fırınlanırlar. Bu fırınlama işlemi “sinterleme” olarak adlandırılır ve başlıca amacı toz parçacıklarını birbirine bağlayan yoğun kristal yapıya dönüştürmektir⁷⁷.

2.1.10.2.3.3. Piyezoelektrik Malzemelerin Kullanıldığı Yerler / Uygulama

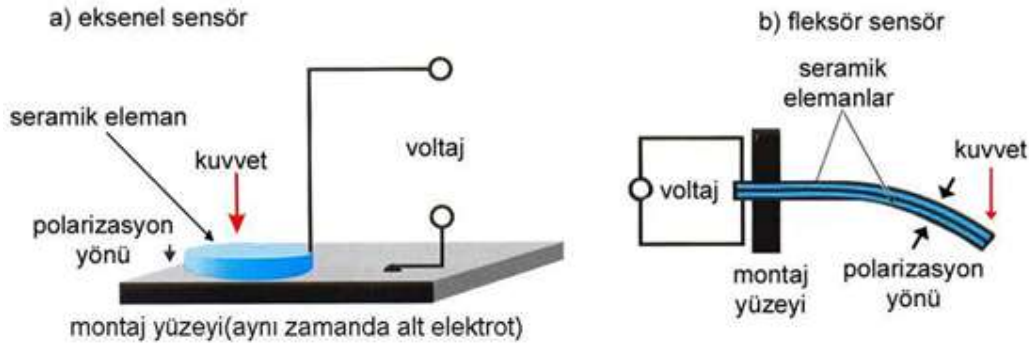
Alanları

Piyezoelektrik malzemelerin kullanıldığı cihazlar dört genel başlık altında toplanabilir. Bunlar: sensörler, üreteçler, aktuatörler (tahrikçiler) ve dönüştürücülerdir².

2.1.10.2.3.3.1. Piyezoelektrik Sensörler

APC International sensörü, “Sensör, ivmelenme veya basınç gibi fiziksel bir değişkeni elektrik sinyaline çevirir. Bazı sensörlerde fiziksel değişken, direk piyezoelektrik elemanın üzerine etkir ve elektrik sinyalini oluşturur. Bazen de sensörde mevcut olan piyezoelektrik elemana, akustik sinyallerin etkimesi sonucu oluşan titreşimlerle elektrik sinyali oluşturulur. Genellikle kurulan sistemler, sensörden gelen sinyalleri işleyerek duyulabilir, görülebilir veya hissedilebilir yanıtlara dönüştürürler” olarak tanımlamıştır^{73, 81}.

Piyezoelektrik eleman kullanılarak yapılan sensörlerin eksenel ve fleksör olmak üzere iki temel çeşidi mevcuttur. Bu sensörlerin basitçe yapıları Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Temel piyezoelektrik sensör çeşitleri. a) Eksenel sensör. b) Fleksör sensör⁷³.

2.1.10.2.3.3.1.1. Kuvars Kristal Mikrodenge

Piyezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik salınımındaki farklanmayı belirleyerek bir piyezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan, gravimetrik aygıtlardır⁸⁵. Sensör seçimliliği, Kristal yüzeyindeki madde ile özgül bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piyezoelektrik kristalin salınımındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır⁷.

Kütledeki değişiklikleri takip ederek, birçok kimyasal ve fiziksel değişimi takip edebiliriz. Makromolekül özgül olarak liganda bağlandığı zaman, sinyal değiştirici bağlanma olayından dolayı, fiziksel bir değişikliği ölçebilir⁷. Sinyal değiştirici genellikle direnç, pH, ısı, ışık ya da kütledeki değişikliği ortaya çıkarır ve daha sonra veriyi işlenebilecek elektriksel bir sinyale dönüştürür. Mikrodenge kullanımına olan ilginin

artması, bilimsel enstrümantasyonda hızlı bir ilerlemenin gerçekleşmesi ile sonuçlanmıştır. Geleceği parlak olan bir detektör tipi de Kuvars Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance; QCM)'dir. QCM bir piyezoelektrik kütle-algılama cihazıdır². Bir QCM cihazı altın kaplı bir Kuvars kristalin içerisinde bazı yankılanan salınımlarında titreşime neden olan elektriksel bir sinyal yollayarak çalışmaktadır. QCM çalışmalarında en yaygın kullanılan elektrotlar, hava içerisinde okside olmadığından dolayı altın elektrotlarıdır. Altın elektrotların dışında biyosensör çalışmalarında, Cu, Ni, Pt ve diğer metaller de kullanılmaktadır⁷³.



Şekil 2.8. QCM Sensörleri, daha sonra QCM kristal içerisindeki salınımların süresini ölçer. Biyosensör olarak kullanıldığında, QCM kristalin yüzeyindeki kütle değişimlerinden dolayı kristalin salınımlarındaki değişimleri ortaya çıkarmaktadır²⁹.

2.1.10.2.3.3.1.2. Kuvars

Kuvars silikanın ya da silikon dioksidin (SiO_2) en kararlı biçimidir. Saydam ve renksizdir ancak, renk verici maddelerin bileşimine girmesi sonucunda çeşitli renklerde olabilirler. Örneğin, mor renkli olanlarına ametist, siyah renkli olanlarına da dumanlı kuvars adı verilmektedir. Çoğu kimyasal çözücüden etkilenmediği gibi, kristal yapısını yüzlerce santigrat dereceye kadar koruyabilmektedir. Aynı zamanda piyezoelektrik özelliğe sahiptir. Yani üzerine basınç uygulandığında, örneğin bir fiskeyle tıklatıldığında

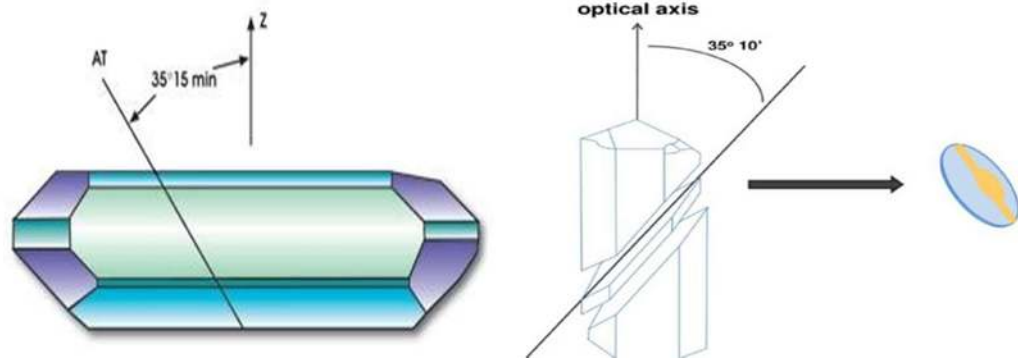
veya büküldüğünde, yüzeyinde elektrik gerilimleri veya akımları oluşur. Bunun tersi de doğrudur: Yüzeyine gerilim uygulandığında, yani üzerine bir miktar elektrik yükü atıldığında, şeklini hafifçe değiştirir. Fakat bu şekil değişikliği, öyle donup kalmaz ve kristal yapı, orijinal şekli etrafında titreşmeye başlar⁸.

Kuvars kristal kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütlesine bağlı olan doğal bir titreşim salınımına sahiptir. Kristalin kırılmasının salınımı üzerinde bir etkisi vardır. Yüksek kaliteli mekaniksel ve piyezoelektrik özelliğinden dolayı QCM uygulamalarında alfa-kuvars kristalleri kullanılmaktadır⁷.



Şekil 2.9. Kuvars kristali⁷.

Kristal yönelimiyle birlikte kesik açısı (the cut-angle) salınımın şeklini belirlemektedir. QCM uygulamalarında en yaygın kullanılan kristal, kuvars çubuğunun $35^{\circ}10'$ açısı ile uzunluk yönünde olacak şekilde kesilmesi ile yapılmaktadır⁷².



Şekil 2.10. Kuvars kristalinin elektrot kesimi⁷².

2.1.10.2.3.3.1.3. Kuvarsın Kullanım Alanları

Kumlarda bolca bulunan kuvarsın, saf olmayanları içinde demir vardır. Beyaz kum olarak bilinen oldukça saf kuvarslar camcılıkta kullanılır. Kuvars kristali mor-ötesi ve kızılaltı ışınımına geçirgendir; bu bakımdan morötesi lambaların hazırlanmasında kullanılır. Piyezoelektrik olay göstermesi Jacques ve Pierre Curie tarafından ortaya konulmuştur. Bu özelliğinden dolayı elektronik sanayiinde osilatör olarak kullanılır. Ergitilen kuvarstan, ısınınca genleşme oranı çok düşük olan bir cam elde edilir. Ani sıcaklık değişikliklerinden etkilenmesi istenmeyen malzemelerin yapımında kuvarstan yararlanılır^{2, 7}.

2.1.10.2.3.3.1.4. QCM'in Avantajları

Moleküler etkileşimlere dayalı algılayıcı sistemlerin (QCM, FET, SPR gibi) önemi ve uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır. Klasik analitik tayin yöntemlerine nazaran biyosensörlerin daha avantajlı olması bu uygulamalara ilgiyi arttırmaktadır. Yanıt verme süresi, hassasiyet, düşük maliyeti, tasarım kolaylığı gibi beklentileri karşılayabilmek amacıyla tanıyıcı yüzey ve çevirici bütünlüğünün sağlandığı biyosensörler tasarlanmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi de QCM'dir. QCM'de de bir çevirici ("transducer") sistem ile bir biyolojik molekül beraberce kullanılmaktadır. Bu amaçla sensörlerde çevirici sistem olarak piyezoelektrik kristallerin kullanılması önem kazanmaktadır⁷.

2.1.10.2.3.3.1.5. Piyezoelektrik Etki ve QCM'in Çalışma Prensibi

Piyezoelektrik etki ilk defa 1880'de Jacques ve Pierre Curie tarafından Rochelle tuzunda keşfedilmiştir. Temel olarak piyezoelektrik etki, mekanik basınç altında bırakılan bazı yalıtkan kristallerin bir yüzünde pozitif, karşı yüzünde ise negatif elektrik yüklerinin ortaya çıkması şeklinde tanımlanır. Piyezoelektrik bir kristalin yüzeyine fiziksel bir kuvvet uygulandığında yüzeyler arasında bir elektriksel potansiyel farkı olduğu gözlenmektedir. Oluşan elektriksel potansiyelin şiddetinin, uygulanan fiziksel kuvvet ile doğru orantılı olduğu bu etkiye "Piyezoelektrik Etki" adı verilmektedir. Bu durumun tersi de mümkündür, yani bir kristalin iki yüzüne bir potansiyel farkı uygulanması sonucunda kristalde mekanik biçim değişikliği görülmektedir^{2, 72}.

Dolayısıyla, piyezoelektrik kristalin yüzeyi üzerine yerleştirilen herhangi bir yabancı maddenin kütlesi ile salınımının değişmesi, piyezoelektrik düzeneğinin çok

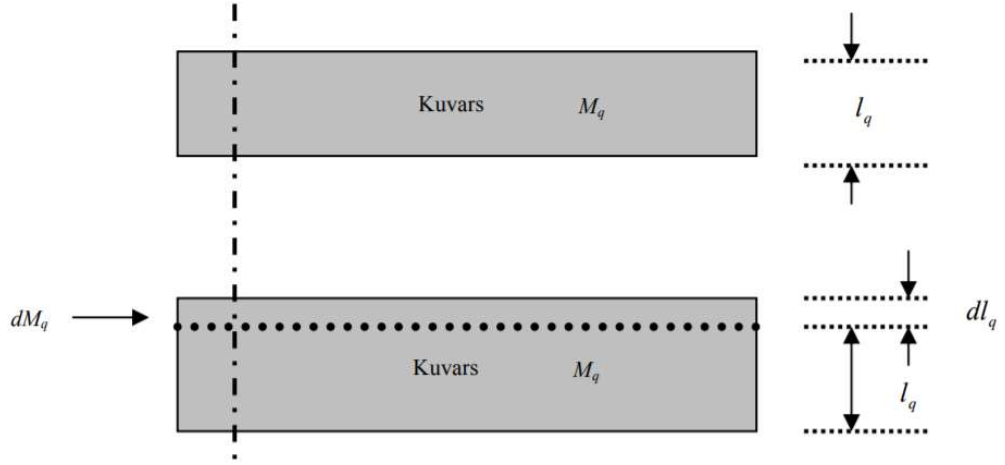
yüksek bir hassasiyetle kütle ölçümünde kullanılabilmesi mümkün olmaktadır. Kristal yüzeyinin seçici bir kimyasal malzeme ile kaplanması durumunda piyezoelektrik kristal düzeneği kimyasal sensör olarak kullanılabilir. Bu amaçla, piyezoelektrik kütle sensörlerinin geleceğe yönelik kullanımı için yapılan çalışmaların en çok yoğunlaştığı konu, seçici sensörlerdir. Piyezoelektrik kristal olarak genellikle kuvarsın kullanılması nedeniyle bu tür sensörlere QCM adı verilmektedir⁷¹.

Bu prensipten yola çıkarak piyezoelektrik özellik taşıyan malzemeler hem aktüatör (tahrikçi) olarak hem de sensör olarak kullanılabilirler. En yaygın olarak kullanılanlar kuvars kristalleri, Rochelle tuzu ve PZT'dir⁷⁴.

Bu sistemde kullanılan kristal iki tane elektrot arasında bulunmaktadır. Bu elektrotlar bir osilatöre bağlıdır ve sisteme verilen akım kristalin titreşim yapmasına izin verir. Ve bu sistem geniş sıcaklık aralıklarında dayanıklı olduğu için stabil çalışmalara olanak sağlar QCM sisteminde kullanılan elektrotların yüzeyleri %99,99 saflıkta 1000 Å Au kaplanmaktadır⁷¹.

QCM, parçacıkların ölçümünün uygulanması için üzerinde iki tane kristal barındırır. Bunlardan bir tanesi yukarı doğru, diğeri ise parçacıkların bulunduğu ortamdan uzak bir yerde bulunur. Yukarı doğru yer alan kristal ince bir yapışkan tabaka ile kaplıdır ve bu tabaka parçacıkların kristal üzerine yapışmasını sağlar. Bu iki kristal karakteristik salınımlarına göre karşılaştırılır. QCM, bu iki kristalin aralarındaki salınım değişimini ölçmektedir⁸³.

Piyezoelektrik kristallerin sensörlerde kullanılması ilk kez 1959 yılında Sauerbrey tarafından ortaya çıkartılmıştır. Uygulanan gerilim mekaniksel bir bozulma yaratır. Kuvarsın bu özelliği QCM'deki az miktardaki kütle değişimlerini saptayabilmektedir. Kuvars kristal yüzeyinde gerçekleşen en ufak kütle değişimi kristalin salınım yapmasına sebep olacaktır. Gerçekleşen bu salınının ürettiği enerji Saurebrey denklemiyle hesaplanabilmektedir^{7,14}.



Şekil 2.11. QCM'in basit gösterimi⁸⁶.

Şekil 2.11'de verilen kuvars kristal mikroterazinin basit şeklinde M_q kütlede ve l_q kalınlığındaki titreşimli kuvars kristalinin işleyiş prensibi görülmektedir. Temel durumda, kuvars bir kristal levhanın salınımı şu şekilde tanımlanır⁸⁶.

$$f_q = \frac{v_q}{\lambda_q} = \frac{v_q}{2l_q} \quad (1)$$

Bu eşitlikte;

- f_q : kuvarsın salınımı
- v_q : kuvars dalga hızının kırılması
- λ_q : kuvars dalga boyu ($2l_q$ 'ye eşittir).

Kristal kalınlığındaki çok az bir değişim (dl_q), salınımda da kaymaya (df_q) neden olur.

$$\frac{df_q}{f_q} = - \frac{dl_q}{l_q} \quad (2)$$

M_q kütleli kuvars kristal için dM_q kütle değişimi aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\frac{df_q}{f_q} = -\frac{dM_q}{M_q} \quad (3)$$

Eşitlik (2) ve (3)'ün birleştirilmesiyle eşitlik (4) elde edilir.

$$\Delta f_q = -\left(\frac{2f_q^2}{\rho_q}\right) \frac{\Delta M_q}{A} \quad (4)$$

Burada;

Δf_q : salınım değişimi

F_q : değişiklikten önceki salınım

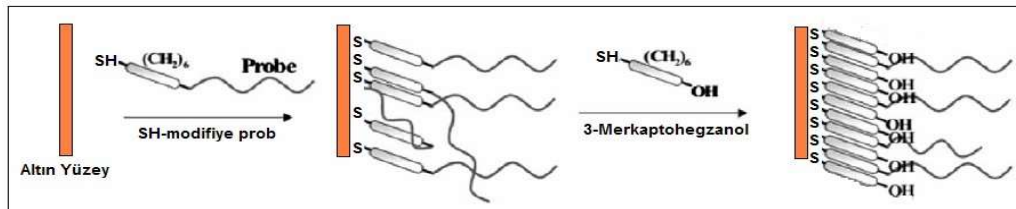
ΔM_q : kütle değişimi

A : osilasyon altındaki kuvars düzlemin alanı

ρ_q : kuvarsın yoğunluğudur.

2.1.10.2.3.3.1.6. QCM ile Biyosensör Tasarımı

QCM'ye dayalı DNA hibridizasyon çalışmalarında kullanabilecek 2 farklı yol mevcuttur. Bunlardan biri altın yüzeye doğrudan tiyol grupları içeren probun tutturulmasıdır¹⁶. Tiyol gruplarının altına olan duyarlılığı bilinmektedir. Bu şekilde altın yüzeye prob tutturularak biyosensör oluşturabilir¹⁷.



Şekil 2.12. SH-modifiye probun altın yüzeye bağlanması¹⁷.

Diğer yol ise yüzeyi, bir kaplama ajanıyla kaplayarak DNA tutturulmasının sağlanmasıdır. Bu yöntemin bir diğer adı; Kendiliğinden Bağlanan Çoklu Tabaklar (“Self-Assembly Multilayers”, SAM)’dır³⁹.

2.1.10.2.3.3.1.7. QCM Uygulamaları

QCM sistemler yüksek hassasiyete sahip olması, kullanım kolaylığı, özgüllüğü, ucuz olması, doğrudan yanıt vermesi gibi avantajlara sahip olduğundan hastalık tanısı, antijen/antikor etkileşimi, ilaç analizleri ve özgül molekül tayinlerinde kullanımı son zamanlarda oldukça artmıştır⁸⁶. Kristalin yüzeyinin analizlenecek analite göre özgül olarak tasarımı hassasiyeti arttıran bir etkidir. Uygulamalar, biyomolekülleri (proteinler, DNA, antijen/antikor, lipitler), nanoparçacıkları, polimerleri, polimer filmleri ve hücreleri içermektedir. QCM tekniği çok ince yüzey sınır tabakalarının kütlesini belirler ve viskoelastik özellikleri hakkında bilgi verir. QCM tekniği yüzeyde bulunan makromoleküllerle çalışmak için uygun bir tekniktir ve var olan teknikleri tamamlayıcı özelliğe sahiptir. Yüksek duyarlılığı ve eş zamanlı algılama özelliği ile QCM birçok uygulamada kullanılabilirlik açısından cazip duruma gelmiştir⁷⁸.

1950’lerin sonunda başlayan QCM çalışmaları, zaman içerisinde büyük yol kat etmiştir. Bu çalışmalardan Thomas Clausen’in QCM kullanarak Primer kanser doku örneklerine ligand bağlanma- kinetiğinin gerçek zamanlı olarak belirlemesi ve Hiroyuki Furosawa’nın QCM yüzeyindeki DNA ipliği ile etkileşen küçük DNA bağlayıcı moleküllerin kinetik karakterizasyonu üzerine araştırmaları, bu alanda bir mihenk taşı olmuştur⁷⁸.

2.1.10.3. Piezo Tabanlı Biyosensörlerde Nanopolimer Kullanımı

Biyosensör çalışmalarında biyoaktif tabaka bileşenleri arasında son dönemlerde nanomalzeme kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Yeni bir alan olan nanomalzemeler elektrot yüzeyine kaplandığında hem elektrotun yüzey alanını arttırmakta hem de iletken yapılarından dolayı avantaj sağlamaktadır⁸⁷.

2.2. Doğum Öncesi Tanı Tanımı, Amacı ve Tarihçesi

Doğum öncesi tanı, ailede bir genetik kusurun bulunabilme riskine ilişkin fetüs doğmadan ana rahminde iken yapılan işlemler bütünüdür. Başka bir deyişle, gebeliğin

erken dönemlerinde alınan fetal örneklerin, biyokimyasal, biyoteknolojik ve moleküler yöntemlerle kalıtsal geçiş gösteren hastalıkların tanısının konulması ve gerekiyorsa yasal süreler içinde gebeliğin sonlandırılmasına olanak sağlamaktadır⁸⁸.

Doğum öncesi tanı ilk olarak, 1966 yılında Steele ve Breg'in bir fetüse ait kromozom yapısının, amniyotik sıvıdan alınan örnekten yapılan kültürde, hücrelerin analizi ile belirlenebileceğini göstermesiyle başlamıştır. Bu sürecin başlamasıyla birlikte koriyonik vilüs örnekleme ve perkütan umbilikal örnekleme 1970'lerde ve 1980'lerde uygulanmaya başlamıştır. Literatürde doğum öncesi tanının tarihçesi 1985'lere kadar dayanmaktadır⁸⁹.

2.2.1. Doğum Öncesi Tanı Yöntemleri

Fetal tıbbın en büyük kısıtlaması hekimin hasta yani fetüs ile doğrudan temas edememesidir. Bu sebeple özel görüntüleme tekniklerine gereksinim duyulmaktadır. Bir diğer önemli konu ise fetüse yapılacak müdahalelerin anne üzerinden yapılması gerekliliğidir, çünkü fetüse başka bir erişim şekli olmadığından anne üzerinden yapılacak müdahaleler veya yaklaşımlar anneyi ve fetüsü doğrudan etkilemektedir⁹⁰. Doğum öncesi tanı yöntemleri girişimsel doğum öncesi tanı yöntemleri ve girişimsel olmayan doğum öncesi tanı yöntemleri olarak iki ana başlığa ayrılmaktadır.⁹¹

Girişimsel doğum öncesi tanı yöntemleri fetüs ve eklerine yapılan doğrudan müdahale tekniklerini kapsamaktadır. Bu teknikler²³:

1. Amniyosentez,
2. Koriyonik vilüs örnekleme,
3. Fetal kan örnekleme (kordosentez)'dir.

Girişimsel olmayan doğum öncesi tanı yöntemleri doğrudan fetüse bir etki yapılmadan anne üzerinden yapılan müdahale tekniklerini kapsamaktadır. Bu teknikler:

1. Fetal ultrasonografik değerlendirme,
2. Fetal ekokardiyografi,
3. Magnetik salınım görüntüleme,
4. Röntgenogram,
5. Dolaşımdaki fetal hücreler veya fetal nükleik asitler ile yapılan çalışmalardır²³.

Günümüzde ailesinde pozitif öykü bulunan fetüsün tek gen mutasyonlarının belirlenmesinde girişimsel bir yöntem olan koriyonik vilus örnekleme tercih edilmektedir. Bu yöntemde alınan örnek dokudan önce DNA izole edilmesi gerekmektedir ve daha sonra PCR temelli genetik analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Rutin analizlerde kullanılmakta olan yöntemlerin başlıcaları “Amplification-Refractory Mutation System” (ARMS) ve dizi analizi yöntemleridir⁸⁴.

ARMS yönteminde özgül primerler aracılığıyla çoğaltılan gen bölgelerinin varlığının belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde primerin karşılığı olan gen bölgesinin bulunup bulunmadığına bakılmaktadır⁴⁰.

Dizi analizi yöntemi nükleotide özgül flüoresan boyalar yardımıyla DNA bölgelerinin dizilerinin belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde ARMS yöntemi gibi primerin karşılığına bakılmamakta, örnekten elde edilen dizinin normal diziyle karşılaştırılıp baz değişimi belirlenmektedir³⁷.

2.2.1.1. Dolaşımdaki fetal nükleik asit kullanımı

Maternal dolaşımdaki serbest fetal DNA’nın analizi; genetik bozukluklarının doğum öncesi tanısına zaman, doğruluk, güvenilirlik sağlaması yanında maddi yönden uygun olmasıyla da önemli fırsatlar sunmaktadır⁹². Geleneksel moleküler yöntemlerin kullanımıyla fetal DNA genotipinin belirlenebilmesi, gebeliğin erken evrelerinde mümkün olmaktadır⁹³. Günümüzde, ilk üç aydaki girişimsel olmayan analiz yöntemleri arka plandaki maternal DNA nedeniyle fetal DNA’nın belirlenmesindeki duyarlılık ve özgüllüğü sınırlamaktadır. Buna rağmen maternal plazmadaki fetal DNA’nın zenginleştirilmesi, testlerin gücünü arttırılabilmekte ve yarı niceleyici analizlere izin vermektedir. Hemoglobinopatiler, akondroplazi, konjenital adrenal hiperplazi, kistik fibroz, Huntington hastalığı, miyotonik distrofi gibi giderek genişleyen bir çeşitlilikte kalıtsal hastalıkların test edilmesine olanak sağlamaktadır⁹⁴.

Maternal dolaşımdaki fetal nükleik asitlerin tayini için araştırma çalışmaları büyük bir ivmeyle ilerlemektedir. Bu alanda umut vaat eden yöntemler arasında biyosensörler önem arz etmektedir⁹⁵.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıdaki gibidir.

3.2. Çalışma Sırasında Kullanılan Aletler

- Altın Kaplama Quartz Kristal Çalışma Elektrotu (Basi Mf 4146, ABD)
- Altın Çalışma Elektrotu (Basi Mf 2014, ABD)
- QCM rezonans ölçer (SRS 200, ABD)
- Potensiyostat (Palm Sens EmStat3, Hollanda)
- Platin Tel Yardımcı Elektrot (Basi Mf 1032, ABD)
- Ag/AgCl Referans Elektrot (Basi Mf 2021, ABD)
- Otomatik Pipetler (Gilson P1000, P20, Fransa)
- Termostatlı su banyosu (Nuve Nb 5, Türkiye)
- pH Metre (Mettler Toledo 1100, ABD)
- Hassas Terazı (Mettler Toledo Pl 3, ABD)
- Sonikatör (Resonik 1016, Türkiye)
- Ölçüm hücresi (Basi C3, ABD)
- Taramalı Elektron Mikroskopu (FEI Q 200, ABD)
- Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi ((FTIR) Jasco 4700, Japonya)
- Saf Su Cihazı (Milipore MiliQ, ABD)
- DNA izolasyonu cihazı (Roche Magna Pure LC, Almanya)
- Isı Döngüleyici (Thermo Fisher 9700, ABD)
- Santrifüj (Hettich 320R, Almanya)
- Plate okuyucu (BioTech Epoch, ABD)
- Yatay Elektroforez (Biorad, ABD)
- Mikrosantrifüj (Biorad, ABD)
- UV ışık kaynağı (Vilber Lourmat, Fransa)
- Görüntüleme (Nikon D5100, Japonya)

3.3. Kimyasallar

- Monosodyumhidrojenfosfat NaH_2PO_4 (Merck, Almanya)
- Disodyumhidrojenfosfat Na_2HPO_4 (Merck, Almanya)
- Sodyum asetat trihidrat (Merck, Almanya)
- Asetik asit (Merck, Almanya)
- Distile su (Milipore MiliQ, ABD)
- DNA probları (Sentegen, Türkiye)
- NaOH (Sigma, ABD)
- Glisin (Sigma, ABD)
- HCl (Sigma, ABD)
- Gama Alümina çözeltileri (1, 3 ve 15 mM; Basi, Hollanda)
- %96'lık Etanol (Sigma, Almanya)
- Potasyum persülfat (Sigma, Almanya)
- Etidyum Bromür (Merck, ABD)

3.4. Örneklem

β -talasemi prenatal tanısı için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'ye 2017-2019 tarihleri arasında başvurmuş, maternal moleküler tanısı IVS1-110 (G→A) mutasyonu dışında farklı bir mutasyonu olan, paternal moleküler tanısı IVS1-110 (G→A) mutasyonu konmuş, yapılan koriyonik vilüs materyalinde IVS1-110 mutasyonu taşıdığı saptanmış, fetüse sahip ebeveynlerden onam formunu (Ç.Ü. Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan Etik Kurulu'nun 03.03.2017 tarihinde yapılan 62 sayılı oturumunda alına 39 nolu kararı) imzalayan 20 aile, çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, paternal IVS1-110 mutasyonunu (G→A) aldığı saptanmış fetüse sahip, bu 20 ailenin maternal "cell-free" fetal DNA'sında, tasarlanan genosensör aracılığıyla aynı fetal genotipini belirleyebilmek için ebeveynler doğum öncesi tanı raporunu almaya geldiklerinde, EDTA'lı tüplere 5 mL maternal kan alınmıştır. Alınan maternal kanlar doğrudan "cell -free" fetal DNA çalışması amaçlı kullanılmıştır. Ayrıca, moleküler yöntem ile fetal genotipi doğrulamak amacıyla anneden alınan koriyonik vilüs materyali kullanılmıştır.

3.5. Yöntemler

3.5.1. DNA izolasyonu

Prensip: Tam kan örneklerinden DNA izolasyonu otomatize sistem (Roche Magna Pure LC) kullanılarak yapıldı. Bu sistemin izolasyon prensibi, özel polimerle kaplı manyetik cam partikül teknolojisine dayanmaktadır. Lökosit DNA'sının bağlama tamponuyla manyetik bilyelere bağlanması sağlanır ve alkolün, tuzların ve proteinlerin uzaklaştırılmasından sonra DNA, manyetik tabla üzerinde elüsyon tamponuyla bilyelerden sıvı faza alınır^{23, 96}.

Yöntem: Firmanın önerileri doğrultusunda cihazın kendi sporuna eklenen 500'er µL tam kan üzerine, sırasıyla hücre zarı parçalayıcı tamponunu, protein uzaklaştırmak için Proteinaz K, DNA bağlayıcı manyetik cam partiküller, kullanılan çözeltileri uzaklaştıracak yıkama tamponu eklenir. Son olarak elüsyon tamponu eklenerek DNA elde edilir^{23, 96}.

3.5.2. β-globin IVS1-110 Mutasyonunu İçeren Gen Bölgesi Amplikonu Protokolü

Prensip: IVS1-110 normal ve mutant DNA dizisini içeren bölge uygun primerler aracılığıyla PCR yöntemi kullanılarak 436 bp'lik amplikon elde edilmesi esasına dayanmaktadır.^{26, 96}.

Yöntem: Toplamda 20 µL toplam hacim içerisinde 30 mM Tris•HCl, pH 8,8; 250 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,06 µg/mL BSA; 0,3 mM dNTP karışımı; 1'er pmol “reverse” ve “forward” primerleri ve 1 µg DNA bulunan karışımı PCR ile β-talasemi protokolünde çoğaltıldı^{26, 96}.

3.5.3. ARMS

Prensip: Normal DNA dizisine ve mutant bölgeye uygun primerler kullanılarak mutasyonun varlığı hakkında bilgi sahibi olunur. Klasik PCR'de iki primer kullanılırken bu teknikte dört primer gerekmektedir. Bu yöntem ile IVS1-110 (G→A) mutasyonunun varlığı ya da yokluğu tanımlaması yapılır^{28, 96}.

Yöntem: Toplamda 25 µL PCR hacmi içerisinde 196 mM Tris•HCl, pH 8,8; 7 mM dNTP karışımı; 1'er pmol "reverse" ve "forward" primerleri; 0,5 µg BSA; 0,5 M KCl; 35 µM MgCl₂ ve 1 µg koriyonik vilüs kaynaklı fetal DNA bulunan karışım PCR'da β-talasemi protokolünde çoğaltıldı^{28, 96}.

3.5.3.1. Elektroforez

Elektroforez jeli %4'lük (1,6 gram agaroz ile 1,6 gram Neu Sieve agaroz 80 mL 1X AGB tamponunda çözülür) olarak hazırlanır. Amplifiye ürünler, 5 µL bromfenol boyası ile karıştırılarak jel kuyucuklarına uygulanır. 1X AGB tamponunda 150 voltluk akımda elektroforez 60 dakika yürütülür. Jel etidiyum bromür (0,5 µg/mL) ile boyanarak UV ışık altında incelenir (Şekil 4.1)^{28, 96}.

3.5.4. Genosensör Hazırlanması

Prensip: Aşağıda sıralayacağımız hazırlama yöntemini takiben iyi kurgulanmış biyoaktif tabaka yanında klasik "dot blot" yönteminde olduğu gibi herhangi bir yanlış hibridizasyonu engellemek amacıyla en az 18 nükleotitlik bir prob tasarımı kullanılması gerekmektedir. Bu özelliklerden dolayı sensör yüzeyine aşağıda bahsedilecek işlemlerle immobilize edilen prob DNA ile hibridizasyonun gerçekleştiğini belirleyebilmek için 2 yöntem kullanılabilir. Bu yöntemlerden birincisi sensör yüzeyinde hibridizasyon sonucu ağırlık artması sonucunda salınım değişiminin gözlenmesi, ikinci yöntem ise hibridizasyon sonucunda kurulan hidrojen bağlarının oluşturduğu yük değişiminin elektrobiyokimyasal olarak ölçülmesidir³⁷.

Genosensör Hazırlama Yöntemi: Öncelikle nanopolimerin SH gruplarıyla bağ kurabilecek olan, altın elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle temizlendi.

Temizlik aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir.

- I. Bir miktar gama alümina solüsyonu kadife yüzey üzerine damlatıldı. Daha sonra altın elektrot kadife yüzey üzerinde hafif bir şekilde halkalar çizerek gezdirildi. Böylece yüzeydeki tabaka veya herhangi bir kirlilik mekanik olarak giderilmiş oldu.

- II. Altın elektrot distile suyla durulanır sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için 5-10 dk %96'lık etanolde ve sonikatör içinde bekletildi. Tekrar distile suyla durulandı ve sonra 10 dk distile su içerisinde sonikatörde bekletildi.
- III. Altın elektrot yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N HCl çözeltisi içerisinde +1,0 ve -1,0 potansiyelleri arasında en az on beş tane döngüsel voltamogram alındı.

Temiz elektrot yüzeyinde biyoaktif tabaka oluşturulup çalışmalar yapılmaya başlandı.

3.5.4.1. Genosensörün Optimizasyon Çalışmaları

Anne kanında “cell-free” fetal DNA saptanması amacıyla geliştirilen genosensör için, en iyi yanıtın elde edilebileceği immobilizasyon ve çalışma koşullarının tespit edilmesi amaçlandı.

Genosensörün her bir değişkeninin en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için, bir değişkenin farklı değerleri denenirken diğer değişkenler sabit tutularak hazırlanan genosensörle ölçümler alındı. Alınan ölçüm sonuçları irdelendiğinde örnek ayırım gücü en iyi olan değerler seçilmiştir.

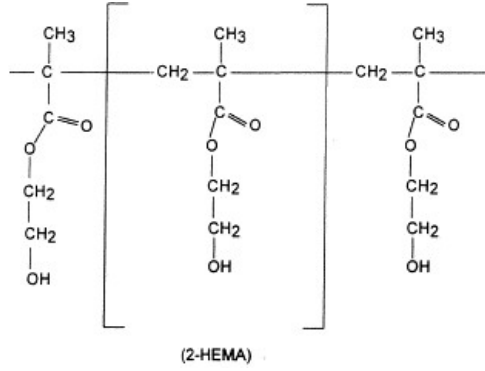
3.5.4.1.1. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Genosensör için en iyi yanıtın elde edilebileceği immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaçla nanopolimer derişiminin genosensör yanıtına etkileri araştırılmıştır³⁹.

3.5.4.1.2. Biyoaktif Tabaka Oluşturma ve Nanopolimer Derişiminin Etkisi

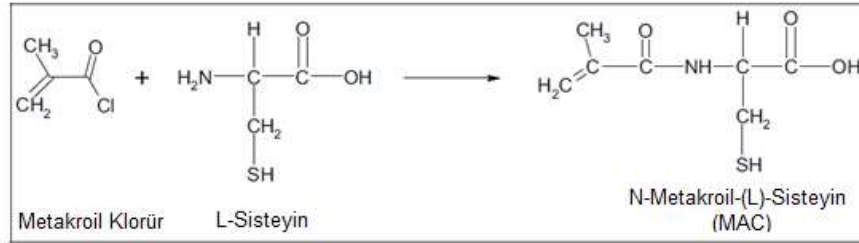
3.5.4.1.2.1. Hema-MAC Nanopolimeri

Hema grupları nedeniyle yüksek biyoyuymululuk gösteren, çeşitli biyolojik ajanların bağlanmasına uygun hidroksil ve SH grupları taşıyan, sulu ortamda oldukça yüksek oranda şişen, yüksek oranda şişmesi ve gözenekli bir yapıda olması nedeniyle çeşitli biyolojik ajanların yüklenmesine izin veren nanopolimerdir⁹⁷. Poli Hema-MAC nanopolimerinin yapısı şekil 3.1’de verilmiştir.

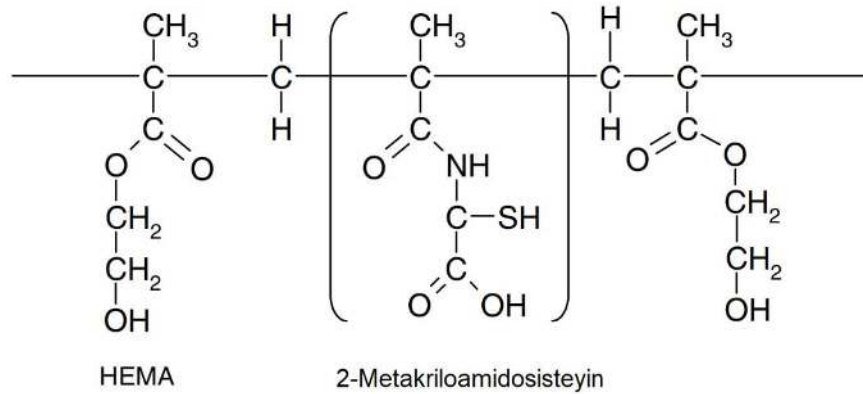


Şekil 3.1. Hema yapısı⁹⁷.

MAC (Metakriloil sisteyin) monomeri, L-sisteyin metakroil klorür ile tepkimesi sonucu elde edilir.



Şekil 3.2. MAC monomerinin sentezi⁹⁷.



Şekil 3.3. Poli Hema-MAC nanopolimerinin yapısı⁹⁷.

Poli Hema-MAC nanopolimerinin (Şekil 3.3) sentezlenmesi için 0,6 mL Hema (Şekil 3.1) ile 0,3 mL Etilen glikol di-metakrilat (EGDMA) karıştırıldıktan sonra, 0,75 ml (50:50) etanol-su karışımı içerisine çözölmüş 100 µL MAC (Şekil 3.2) monomeri üzerine eklendi. 0,275 g 25 mL polivinil alkol (PVA) ile bu karışım 30 saniye çalkalandı. Başlatıcı olarak 0,0198 g 45 mL potasyum persölfat (KPS) ortama eklendi. Polimerleşme 70 °C’de su banyosunda 12 saatte gerçekleştirildi. Polimerizasyon sonrasında 14.100 g’de 15 dk santrifüj edilerek polimer çöktüröldü, sonrasında etanol ve su ile yıkama yapıldı. Hazırlanan nanopolimer buz dolabında +4 °C’de saklandı deney çalışmaları için oda sıcaklığına getirildi⁹⁷.

3.5.4.1.2.2. DNA Probları

Çalışmada kullanılan DNA probları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakölte Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında rutin analizlerde kullanılan β-globin geninin IVS1-110 bölgesindeki normal ve mutant dizisine özgül 30 bazlık ARMS primerine tiyol grubu eklenerek Sente Gen Biolab’a sentezlettirilmiştiir.

1) Mutant Prob Dizisi

SH-5'- ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC AAC 3'

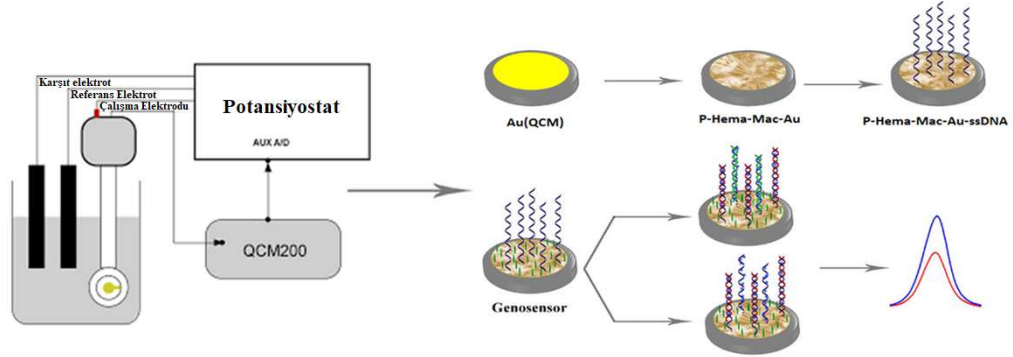
2) Normal Prob Dizisi

SH-5'- ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC AGC -3

3.5.4.1.3. Biyoaktif Tabakanın Optimizasyonu

Genosensör üzerinde tek tabaka Poli Hema-MAC nanopolimer biyoaktif tabakası oluşturulması, elektrot yüzeyinde nanopolimer eklenip belirli bir süre bekletilerek gerçekleştirilerek elektrotun polimer ile modifiye edilmesi sağlandı. Polimer modifiye elektrot üzerine, SH grubu bağılı Prob DNA eklendi. Polimerin SH grupları ile tiyol bağı oluşturabilmesi için +4 °C de bekletildi. Son olarak elektrot, içerisinde fosfat tamponu bulunan su ceketli ve Faraday kafesli tepkime hücresine alındı. Bütün deneyler aynı elektrot tipi kullanılarak yapıldı (Optimizasyon çalışmalarıında izlenen yol ve yöntem ilgili maddelerde ayrıntılı olarak verilmiştir.).

Hazırlanan genosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzenek ve çalışma ilkesi şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4. Genosensör düzenneği ve çalışma ilkesi.

Genosensörün biyoaktif tabakasındaki nanopolimer derişiminin genosensör yanıtına etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı nanopolimer derişimleriyle elektrot hazırlandı. Hazırlanan her elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen akım farkı ve hedef dizi derişimi arasındaki grafik yardımıyla en uygun nanopolimer derişimi tespit edildi.

3.5.4.1.4. Biyoaktif Tabakanın SEM Görüntülemesi

Prensip: Taramalı Elektron Mikroskopunda görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların örnek üzerine odaklanması, bu elektron demetinin örnek yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve örnek atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılması ile elde edilir. Görüntü elektron gibi çok küçük materyaller yardımıyla alındığından dolayı nanometre boyutundaki yapıların ayırt edilebilmekte ve böylece yüzey hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Taramalı elektron mikroskopunun bu özelliğinden yararlanarak biyoaktif tabakanın morfolojik özelliklerinin gözlemlenebilmesi sağlanmaktadır⁹⁸.

SEM Görüntüleme Protokolü: Hazırlanan biyoaktif tabakanın fiziki incelemesi yapılabilmesi için Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan taramalı elektron mikroskopunda çekimler yapılmıştır. Biyoaktif tabaka (Elektrot-nanopolimer etkileşimi; Elektrot-nonopolimer-prob etkileşimi) hazırlama sırasına göre farklı bağlanma basamaklarındaki elektrotların SEM görüntüleri alınmıştır.

Cihazın örnek yükleme tablasına yerleştirilen elektrotların yüzey görüntüleri çekilmiştir. Her elektrotun 3'er görüntüsü alınmış olup 1'er tanesi bulgulara verilmiştir.

3.5.4.1.5. Nanopolimerin Prob Etkileşiminin FTIR ile Görüntülenmesi

Prensip: Kızılötesi Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulması prensibine dayanır. Soğurulma, moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir. Titreşen bu bağların enerji aralıklarına göre biyoaktif tabaka bileşiminde gerçekleşmiş olan bağlar tespit edilebilmektedir⁹⁹.

Yöntem: Hazırlanan biyoaktif tabakanın bağ yapısının incelemesi için Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan taramalı FTIR cihazında görüntüler alınmıştır. Ölçümü yapılan biyosensör yüzeyi, biyoaktif tabaka hazırlama sırasına göre farklı bağlanma (sadece nanopolimerin elektrot yüzeyine bağlı olduğu tabaka ve nanopolimer bağlı elektrota bağlanmış prob içeren tabaka) gösteren elektrotlardır. Bu elektrotlardaki farklı bağ yapıları FTIR cihaz kuyucuğuna yerleştirildikten sonra kızıl ötesi titreşim frekansına göre elde edilen grafikte belirlenmiştir. Her elektrotun 3'er analizi yapılmış olup, 1'er tanesi bulgulara verilmiştir.

3.5.4.2. Genosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.5.4.2.1. Tampon pH'si Optimizasyonu

Tampon pH'si optimizasyonu çalışmalarında önce 25-100 mM derişim ve 7,0-8,0 pH aralığında fosfat tamponu yanısıra, 25-100 mM derişim 4,0-6,0 pH aralığında asetik asit tamponu ve 25-100 mM derişim 8,5-9,5 pH aralığında glisin tamponu hazırlandı. Hazırlanan tamponlar pH optimizasyonu için kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler buzdolabında +4 °C'de saklandı deney çalışmaları için oda sıcaklığına getirildi.

Tampon çözeltilerinin pH optimizasyonu için önce 50 mM sodyum fosfat tamponu 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5 ve 8,0 pH değerlerinde, 50 mM asetik asit tamponu 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 ve 6,0 pH değerlerinde; 50 mM glisin tamponu ise 8,5; 9,0; 9,5 pH değerlerinde hazırlanıp ölçümler alındı. Çalışma sonucunda tampon pH'si ve maksimum akım

değerlerini gösteren grafik çizilerek en iyi genosensör yanıtının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi.

3.5.4.2.2. Tampon Derişimi Optimizasyonu

Hazırlanan genosensörün en iyi çalıştığı pH değeri ve bu pH değerindeki uygun tampon sisteminin belirlenmesinden sonra, tampon derişimlerinin genosensör yanıtı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan genosensörler için farklı derişimlerdeki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi. Bu amaçla önceki çalışmada en uygun tampon sistemi olarak belirlenen fosfat tamponundan pH'si 7,5 olan 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM derişimlerde tamponlar hazırlandı. Ölçümler pH 7,5 fosfat tamponunda, 100 nmol prob kullanılarak 5 saatlik SAM süresinde gerçekleştirildi. Yapılan ölçümlerden elde edilen akımlar tampon derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek, en uygun tampon derişimi belirlendi.

3.5.4.2.3. Prob Miktarı Optimizasyonu

Prob miktarının genosensör yanıtı üzerine etkisinin belirlenmesi için, diğer değişkenler sabit tutularak biyoaktif tabakası 50 nmol, 100 nmol ve 200 nmol prob içeren genosensörler hazırlandı. Ölçümler pH 7,5'te fosfat tamponunda su ceketli hücrede gerçekleştirildi. Hazırlanan her bir elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen akım farkı ve prob miktarı arasında çizilen grafikten en uygun prob derişimi miktarı belirlendi.

3.5.4.2.4. Kendiliğinden Oluşan Çoklu Tabaka (Self Assembled Multilayer ,SAM) Süresi Optimizasyonu

SAM süresinin genosensör yanıtına etkisinin belirlenmesi için diğer değişkenler sabit tutulmak suretiyle 2,5 saat, 5 saat ve 7,5 saat bekleme ile elektrotlar hazırlandı. Ölçümler pH 7,5 fosfat tamponunda, 100 nmol prob kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan her bir elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen akım farkı ve SAM süresi arasındaki grafikten en uygun SAM süresi belirlendi.

3.5.4.2.5. Sıcaklık Optimizasyonu

DNA hibridizasyonu sıcaklık bağımlı olduğu için çalışmalar su ceketli hücre içerisinde DNA denatürasyon ve bağlanma sıcaklıklarını belirleyebilmek amacı ile denatürasyon çalışmalarında 85-95 °C arasındaki sıcaklıklarda, DNA bağlanması çalışmalarında ise 58-68 °C arasındaki sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirildi. Optimum denatürasyon ve bağlanma sıcaklıklarının ölçümlere ait akımlar, sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek en iyi denatürasyon ve bağlanma sıcaklıkları belirlendi.

3.5.5. Maternal “Cell-Free” Fetal DNA Çalışması

Örneklemede sözü edilen maternal kaynaklı EDTA içeren kanlar, koriyonik vilüs materyalinde daha önce moleküler yöntemlerle belirlenen fetal genotiple uyuşup uyuşmadığını, optimize ettiğimiz genosensörle fetal genotipin mutasyonunu saptamak amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla alınan 50 µL materyal kan, optimizasyon çalışmaları sırasında belirlenen potasyum fosfat tamponu içeren genosensör çalışma hücresine eklenerek sonuçlar elde edilmiştir.

3.6. Duyarlılık ve Özgüllük Çalışmaları

Bu çalışmada anne kanında “cell-free” fetal DNA saptanması için geliştirilen genosensörün ölçüm tekrarlanabilirliği araştırıldı. Ölçümler, 0,06 V/s tarama hızı ve pH 7,5 olan 50 mM fosfat tamponunda, 100 nmol prob kullanılarak 5 saatlik SAM süresinde gerçekleştirildi.

Bu çalışmada geliştirilen genosensörün ölçüm tekrarlanabilirliği araştırıldı. Ölçüm hücresi içerisine mutasyon varlığı bilinen örnek ampikonlarından 1'er µL ekleme yaparak ölçümler alındı. Anne kanında fetal DNA tayini tekrarlanabilirlik denemelerinde paternal IVS1-110 mutasyonunu (G→C) aldığı saptanmış fetüse sahip, 20 ailenin maternal “cell-free” fetal DNA'sını içeren maternal kanın çalışma hücresine eklenmesi suretiyle 20 ölçüm alınmıştır.

Belirlenen en iyi koşullarda hazırlanan genosensör ile genetik materyalin belirlenebileceği duyarlılığı ve özgüllüğünün tespit edilmesi için prediktif değer tablosu kullanıldı (Tablo. 1).

Tablo 1. Prediktif değer tablosu⁷³.

Yeni Test (Tanı Testi)	GOLD STANDART (Gerçek)			
		Hastalık Var	Hastalık Yok	Toplam
	Pozitif	a	b	Toplam Pozitif (a+b)
	Negatif	c	d	Toplam Negatif (c+d)
	Toplam	Toplam Hasta (a+c)	Toplam Sağlam (b+d)	a+b+c+d

a Gerçek pozitif hastalar

b Yanlış pozitif hastalar

c Yanlış negatif hastalar

d Gerçek negatif hastalar

Sensitivite (duyarlılık) yeni testin (tanı testi) gerçekte hasta olanların içinden ne kadarını saptayabildiğidir (tanı koyabildiğidir)⁷³.

Sensitivite (Duyarlılık): $a / (a+c) \times 100$

Spesifite (özellik) ise yeni testin gerçekte sağlam olanların ne kadarını saptayabildiğidir (hastalığın ekarte edilmesi)⁷³.

Spesifite (Özellik): $d / (b+d) \times 100$

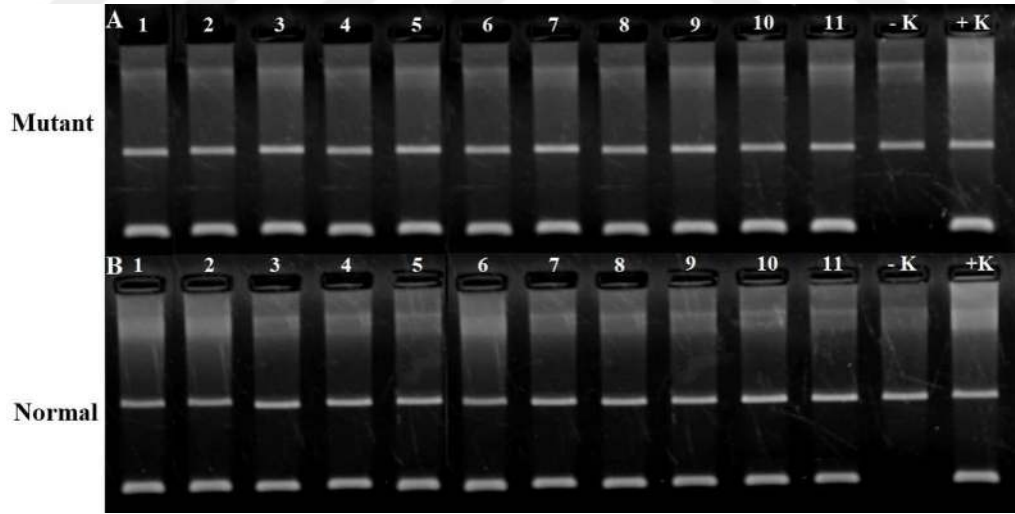
Ölçüm hücresi içerisine ampikon ekleme yaparak kalitatif ölçümler alındı. 20 kez tekrar edilen ölçümlere ait duyarlılık ve özellik değerleri hesaplandı. ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi yapıldı¹⁰⁰.

4. BULGULAR

β -talasemi prenatal tanısı için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'ye başvuran, paternal moleküler tanısı IVS1-110 (G→A) mutasyonu konmuş, yapılan CVS materyalinde IVS1-110 (G→A) mutasyonu taşıdığı saptanmış, fetüse sahip ebeveynlerden onam formunu imzalayan 20 aile, çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmanın optimizasyon ve karakterizasyon denemelerinde IVS1-110 (G→A) mutasyonunu içeren β -globin bölgesinin çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünleri (amplikon) kullanılmış olup, genosensörün ayırım gücünü belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda amplikonlar kullanıldıktan sonra maternal likit biyopsi örneğindeki “cell-free” fetal DNA çalışmaları yapılmıştır.

4.1. ARMS Bulguları

Çalışmaya dahil edilen örneklerin ARMS sonuçları şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Örneklerin ARMS görüntüsü.

Şekil 4.1’de görülen ARMS sonuçlarında üst satır IVS1-110 (G→A) mutasyonu yönünden mutant aleli içerip içermediğini, alt satır ise normal aleli içerip içermediğini göstermektedir. Şekil 4.1 çalışmalarda kullanılan örneklerin IVS1-110 (G→A) mutasyonu açısından heterozigot olarak taşıyıcı olduğunu göstermektedir. Alınan

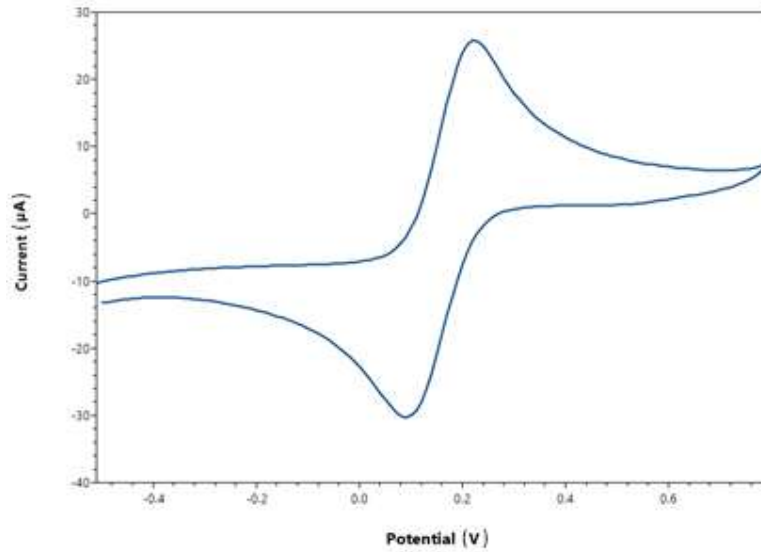
örneklerin ARMS yöntemiyle mutasyonları belirlendikten sonra genosensör çalışmalarına dahil edilmiştir.

4.2. Genosensörde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Anne kanında “cell-free” fetal DNA tayini amacıyla geliştirilen genosensörün, ölçüm koşullarını saptamak için rutinde kullanılan genetik parametreler ile yapılmış çalışmalar göz önüne alındı. Değerler saptandıkça en uygun değerler kullanılmaya başlandı.

4.3. Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla daha önceden yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınmıştır. Çalışmamızın prensibi, elektrik iletkenliği olmayan quartz kristalin yüzeyinde ağırlık değişimi olmasıyla bir titreşim hareketi yapması ve bunun sonucunda elektrik sinyali üretmesidir. Biyoaktif tabaka, quartz kristal elektrotun altın yüzeyi üzerine nanopolimer aracılığı ile DNA dizisi bağlanmasıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan genosensörde literatürce kabul gören üç elektrot sistemi kullanıldı ve şekil 4.2’de görülen döngüsel voltamogram elde edildi. Döngüsel voltametre, genosensörün çalışma aralığının belirlenebilmesi için verilen sabit akıma karşı biyoaktif tabaka bileşenlerinin potansiyel değişimi sonucu pik oluşturduğu gerilim bölgesidir.



Şekil 4.2. Döngüsel voltamogram.

Döngüsel voltamogramda yukarı yönlü pik anodik pik, aşağı yönlü pik ise katodik pik olarak adlandırılmaktadır. Yükseltgenme indirgenme tepkimesinde anodik pikin potansiyel değeri yükseltgenmeyi, katodik pik ise indirgenmeyi ifade eder. Bu iki pik karşılaştırılıp tepkimenin yönü hakkında bilgi sahibi olunabilir^{1, 2}.

Döngüsel voltamogramdan alınan sonuçlar doğrultusunda çalışmalara -0,2-1,4 V sabit akım aralığında devam edildi. Döngüsel voltamogram ölçüm verileri aşağıdaki gibi belirlendi:

t equilibration: 10 s

E begin: -0,2 v

E vertex1: -0,2 v

E vertex2: 0,8 v

E step: 0,004 v

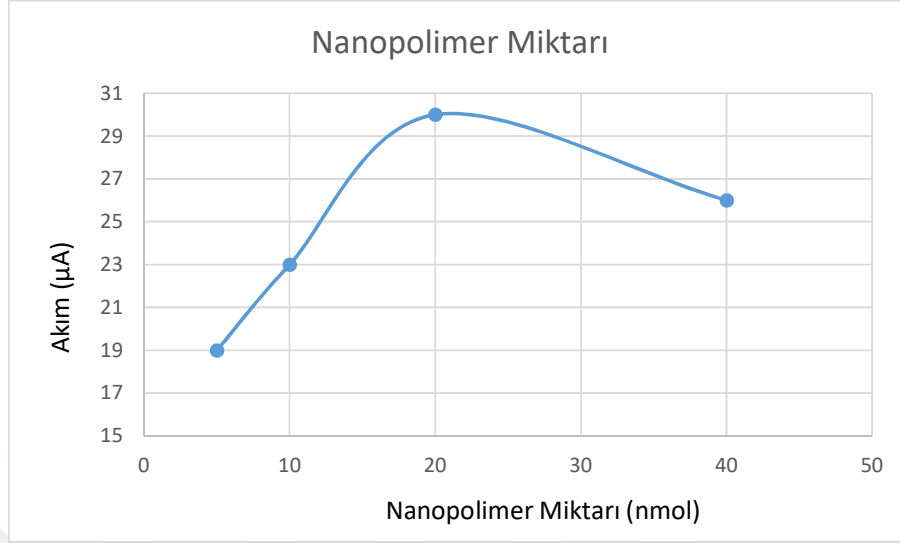
Scan rate: 0, 06 v/s

Number of scans: 1

4.4. Nanopolimer Miktarının Optimizasyonu

Optimizasyon çalışması sonucunda, voltamogramda en yüksek anodik akım fark, de olan 50 mM derişimdeki pH 7,5 fosfat tamponu ile 100 nmol prob derişiminde elde edildi. Bu değerler tüm çalışma kullanılan optimize edilmiş veriler olarak kabul edildi.

Yukarıda sözü geçen optimize edilmiş değerler ek olarak, nanopolimerin değişik miktarına (5, 10, 20 ve 40 nmol) sahip çözeltiler kullanarak hazırlanan genosensör ile denemeler yapılmıştır. Elde edilen yanıt şekil 4.3'te gösterilmiştir.

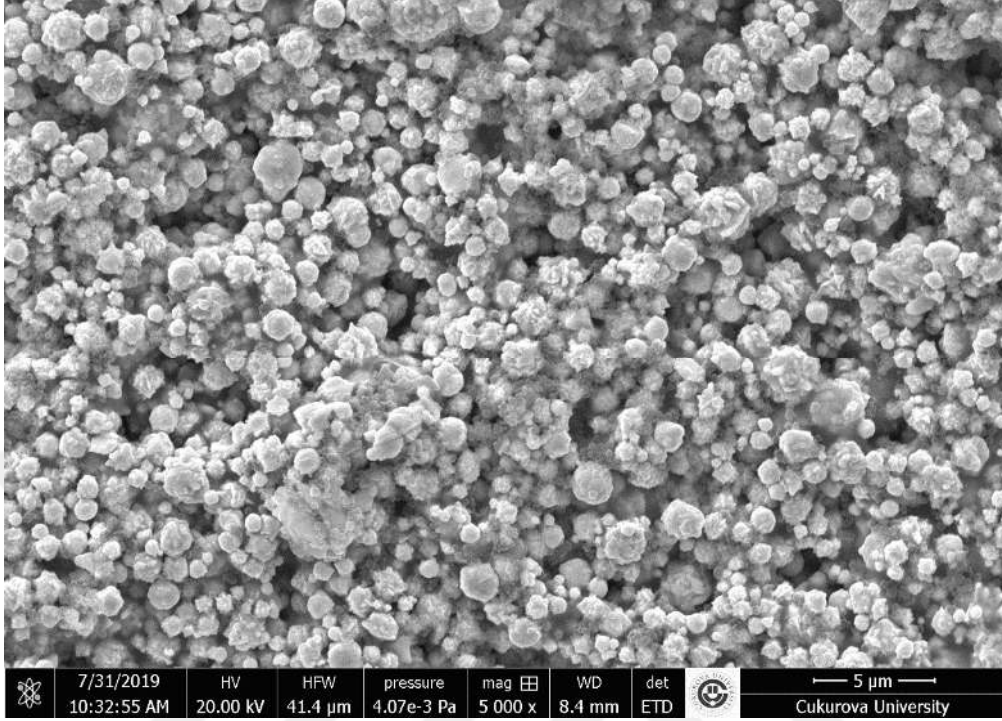


Şekil 4.3. Nanopolimer miktarındaki değişiminin genosensör yanıtı üzerine etkisi.

Şekil 4.3'te elde edilen değerler grafiğine göre en yüksek salınım farkına sahip nanopolimer miktarının 20 nmol olduğu saptanmıştır.

4.5. Biyoaktif Tabakanın Biyofizikokimyasal İncelemesi

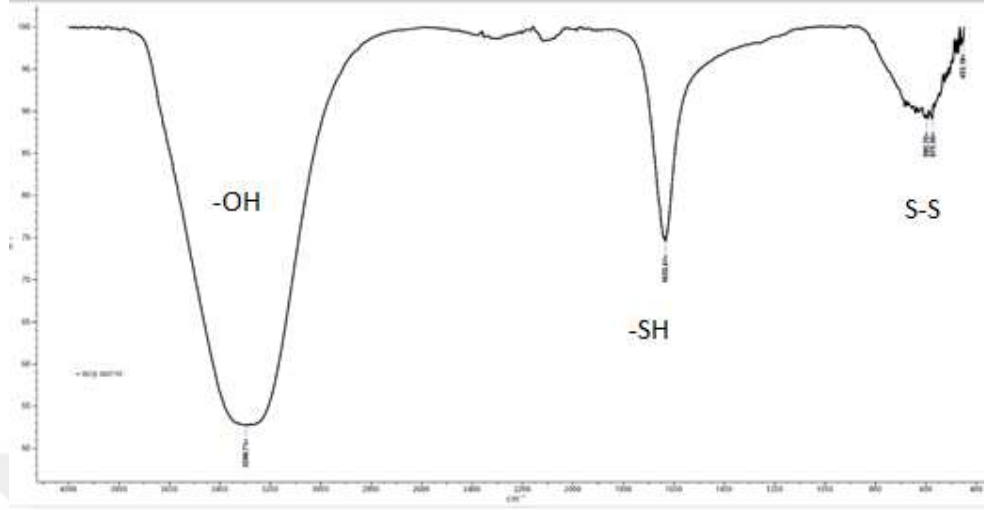
Biyoaktif tabakanın biyofizikokimyasal özelliklerini ortaya koymak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elektrot yüzeyinin fiziki olarak görüntülenmesi ve biyoaktif tabaka bileşenlerinin kimyasal bağ yapısının görüntülenmesi amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR) analizleri yapıldı^{98, 99}. Analiz sonuçları şekil 4.4' ve şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.4. Altın elektrot yüzeyine bağlı Hema-MAC'ın SEM görüntüsü.

Şekil 4.4'te elektrot yüzeyinin biyoaktif tabaka hazırlama sırasına göre alınan SEM görüntüsü verilmiştir. Şekilde elektrot yüzey alanının nanopolimer yardımıyla artırıldığı görüldü.

Biyoaktif tabaka bileşeninde bulunan kimyasal bağların görüntülenebilmesi için alınan FTIR görüntüsü şekil 4.5'te verilmiştir. Şekil kimyasal olarak incelendiğinde, nanopolimerle SH grubu bağlı primer arasında gerçekleşen disülfid bağlarının yanısıra bağlanan genetik materyalin varlığı görülmektedir. FTIR görüntüsünde nanopolimerin tampon içerisinde olduğundan dolayı 3100-3600 nm dalga boyunda gözlenen -OH piki ve bu bölgeyi kapsayan karbon bağı çeşitleri, yüzde ifade ile görünmektedir. 1600-1650 nm dalga boyunda -SH grupları ve 510-630 nm dalga boyunda S-S bağı gözlemlenmektedir¹⁰¹.

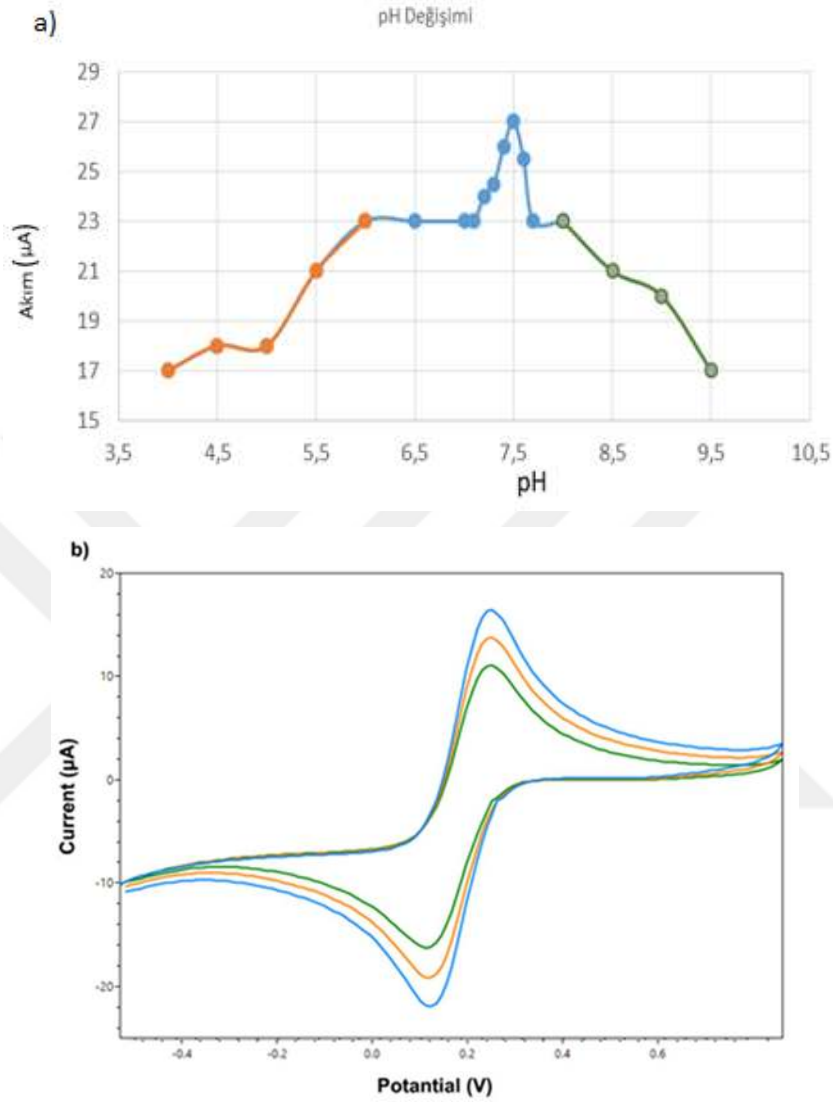


Şekil 4.5. Biyoaktif tabakanın FTIR görüntüsü.

4.6. Çalışma Tamponu ve En iyi pH Değerinin Belirlenmesi

Çalışma tamponu ve en iyi pH değerinin belirlenmesi için, pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; ve 6,0'da 50 mM asetik asit/asetat tampon çözeltileri ile pH 6,5; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 8,0'de olan 50 mM sodyum fosfat tamponlarında ölçümler alınarak salınımlar elde edildi (Şekil 4.6).

Salınımlara ait maksimum akım farkı değerinin pH'ye karşı grafiği şekil 4.6.a ve 4.6.b'de gösterildiği gibidir.

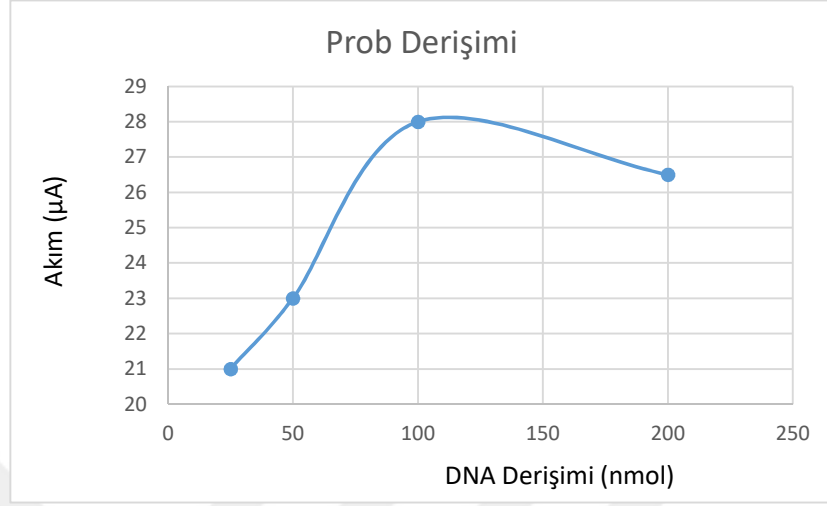


Şekil 4.6. pH değişiminin genosensör yanıtı üzerine etkisi(Turuncu Asetik asit tamponu, Mavi Fosfat tamponu, Yeşil Glisin tamponu). a) Elde edilen akıma karşı çizilen pH ve tampon grafiği. b) pH değişiminin genosensör yanıtı üzerine voltamogram.

Maksimum ölçüm değeri pH 7,5'te 50 mM fostat tamponu kullanılarak saptanmıştır.

4.7. En iyi Prob Derişiminin Belirlenmesi

Biyoaktif tabaka üzerinde en iyi DNA derişiminin belirlenmesi amacıyla pH 7,5'te derişimi 50 nmol, 100 nmol ve 200 nmol olan DNA miktarları kullanılarak, çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar şekil 4.7'de verilmiştir.

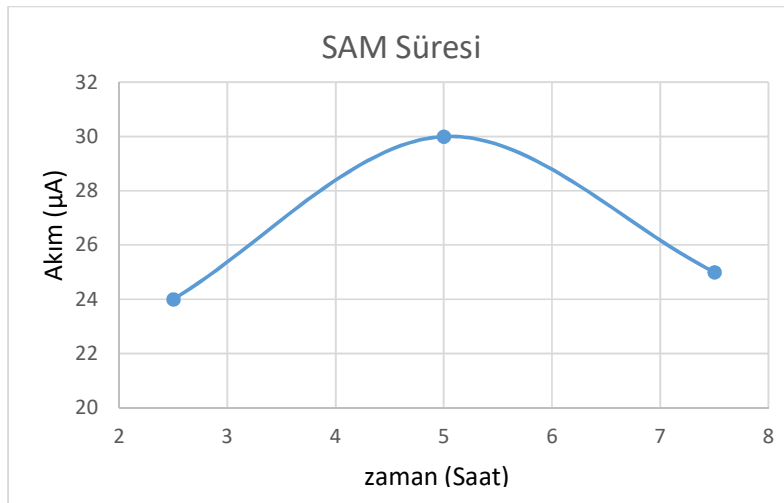


Şekil 4.7. En iyi prob derişiminin bulunması amacıyla değişik enzim derişimlerinin genosensör yanıtı üzerine etkisi.

Şekil 4.7’de elde edilen değerlerde en yüksek salınım farkına sahip DNA miktarının 100 nmol olduğu saptanmıştır.

4.8. . SAM Süresi Optimizasyonu

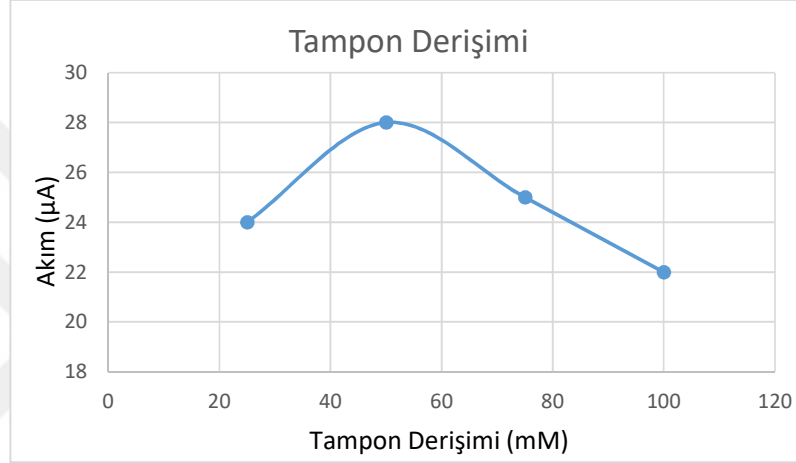
Optimum SAM süresinin belirlenmesi için 2,5 saat, 5 saat ve 7,5 saatlik SAM süreleriyle elektrotlar hazırlandı. Hazırlanan elektrotlarla alınan sonuçlar şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. SAM süresi optimizasyonu.

4.9. En iyi Tampon Derişiminin Belirlenmesi

En iyi tampon derişiminin belirlenmesi amacıyla pH 7,5'te derişimi 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM olan fosfat tamponları kullanılarak tampon derişim optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçlar şekil 4.9'da verilmiştir.

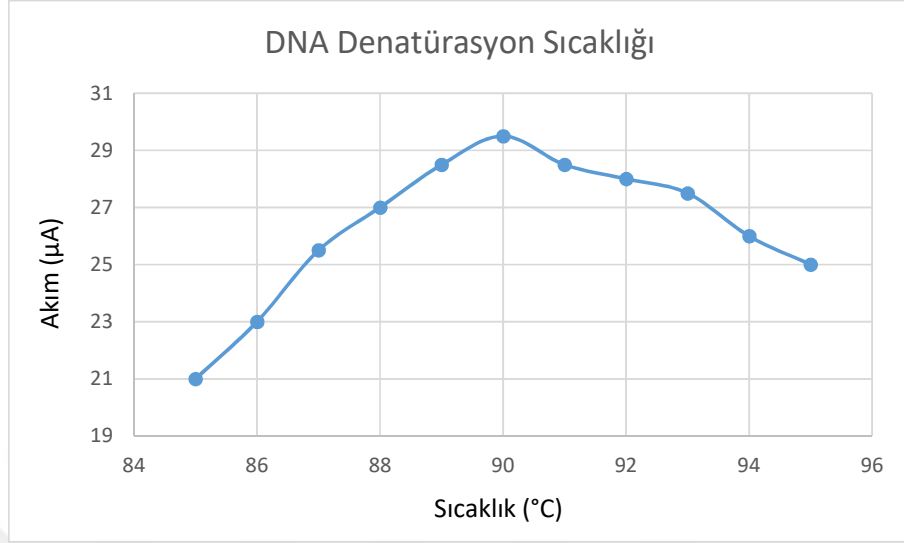


Şekil 4.9. En iyi tampon derişiminin bulunması amacıyla değişik tampon derişimlerinin genosensör yanıtı üzerine etkisi.

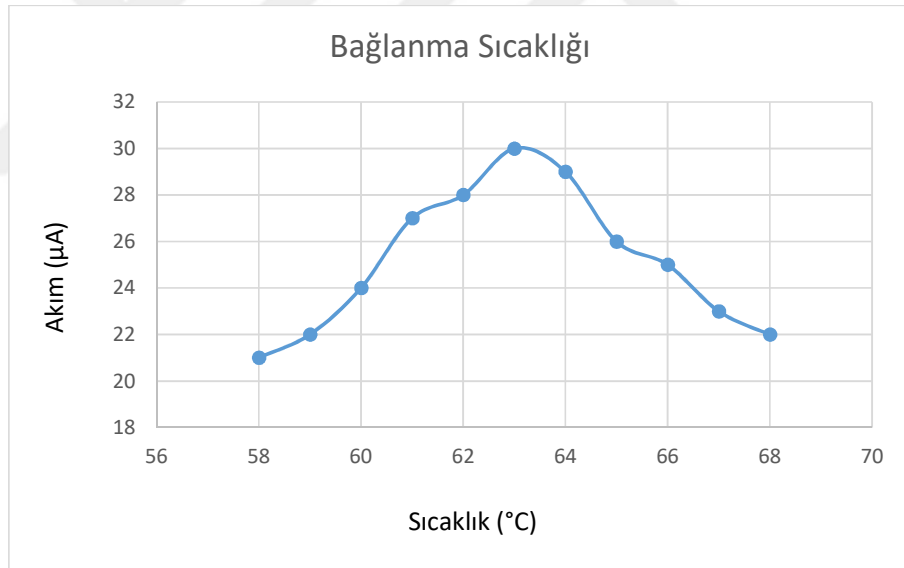
Şekil 4.9'da grafiksel olarak gösterilen ölçüm değerleri, tampon derişimine karşı maksimum değerin 50 mM fosfat tamponu derişiminde olduğu saptanmıştır.

4.10. Amplikon ve “Cell-Free” Fetal DNA Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

En iyi sıcaklık değerlerini belirlenmesi çalışmalarında geliştirilen genosensörle amplikon ve “cell-free” fetal DNA'nın hibridizasyonunu sağlamak için tek iplik DNA molekülü elde etmek amacıyla optimum denatürasyon sıcaklığı çalışmaları yapıldı. Bu denemeler 85-95 °C arasındaki sıcaklıklarda çalışıldı. En uygun DNA denatürasyon sıcaklığı 91 °C (Şekil 4.10) olarak saptandı optimum DNA hibridizasyon çalışmalarında ise 58-68 °C arasında yapılan sıcaklık denemelerinde hibridizasyonun en iyi olduğu sıcaklık 63 °C (Şekil 4.11) olarak bulundu.



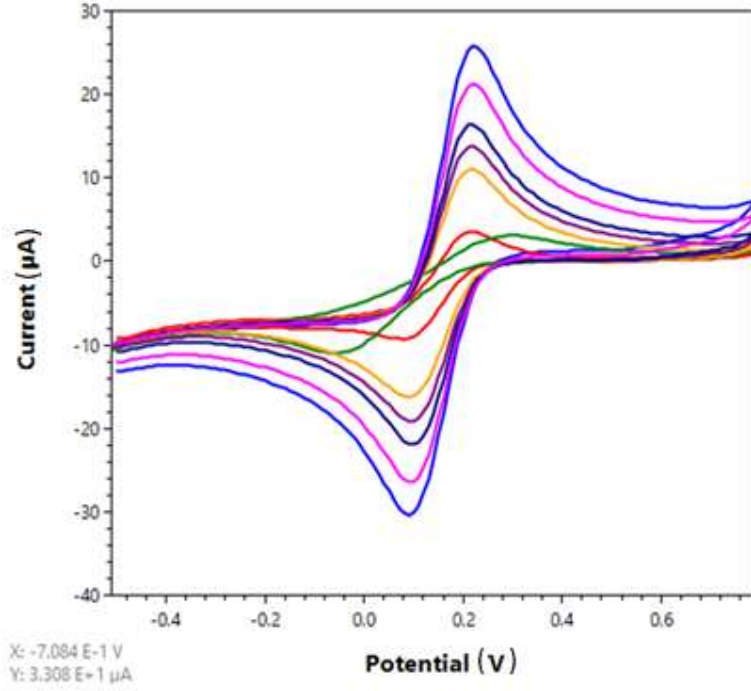
Şekil 4.10. Optimum DNA denatürasyon sıcaklığı.



Şekil 4.11. Optimum bağlanma sıcaklığı.

4.11. En iyi Tarama Hızı Değerlerinin Belirlenmesi

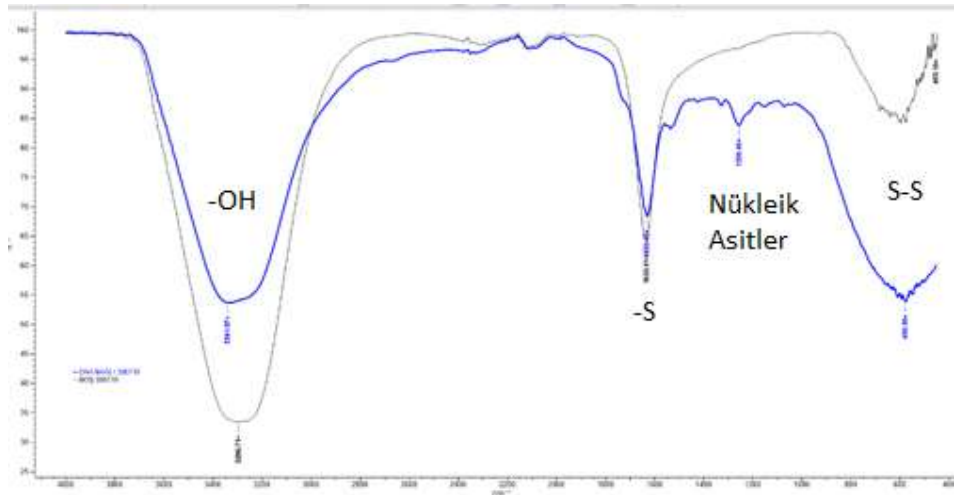
Tarama hızının genosensör yanıtı üzerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Genosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltamogramlar.

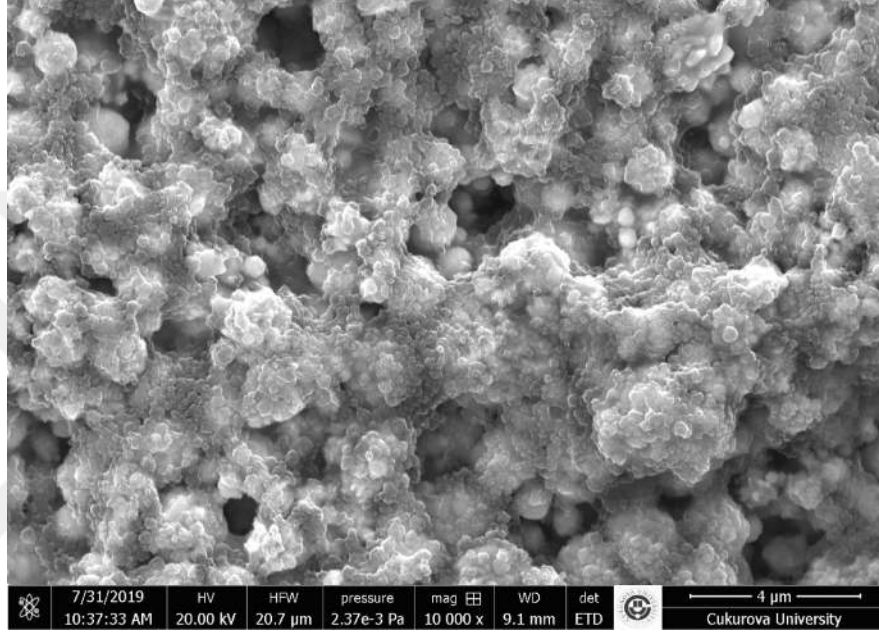
Sonuçta farklı tarama hızları ile yapılan ölçümler içinde en yüksek akım ve pik oluşturan tarama hızı 0,06 V/s olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).

4.12. Optimize edilmiş biyoaktif tabakanın biyofizikokimyasal özellikleri



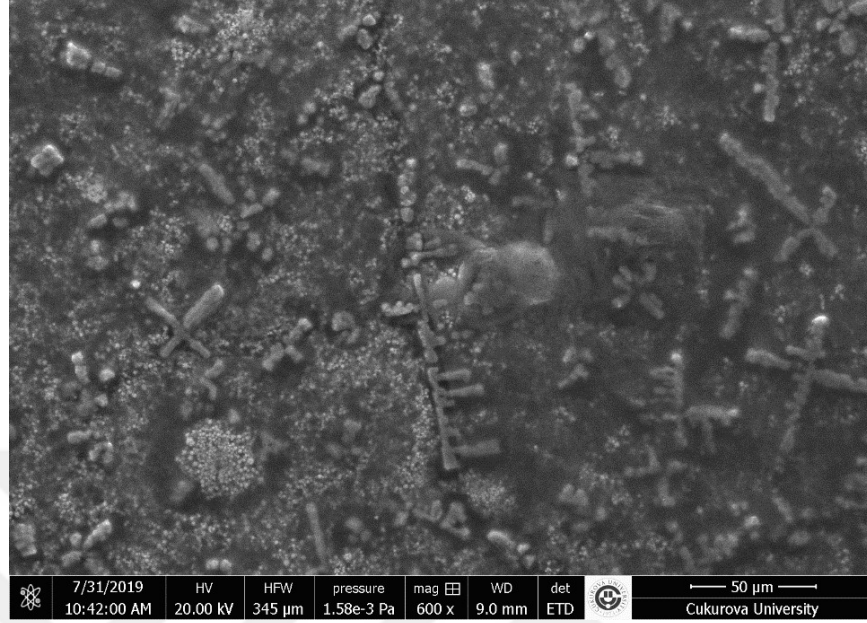
Şekil 4.13. Biyoaktif tabaka hazırlama basamaklarında alınan FTIR görüntülerinin üst üste eklenmesi (Mavi: prob bağlı, Gri: nanopolimer).

Şekil 4.13'te elde edilen FTIR görüntüsünde biyoaktif tabakada bileşeni olan nanopolimerin prob ile yaptığı disülfid bağı 510-630 nm dalga boyunda, ayrıca nükleik asit moleküllerinin varlığı 1000-1500 nm dalga boyundaki değişimde gözlenmektedir¹⁰².



Şekil 4.14. Optimize edilmiş nanopolimer ve mutant prob eşleşmesinin SEM görüntüsü.

Şekil 4.4 ile Şekil 4.14'te verilen SEM görüntüleri karşılaştırıldığında prob bağlanmasıyla biyoaktif tabakanın fiziki görünümünün de değiştiği gözlemlendi. Ayrıca Şekil 4.4, 4.14 ve Şekil 4.15 birlikte incelendiğinde genosensör çalışmalarında biyoaktif tabakayla amplikon eşleşmesi sonucunda oluşan değişim SEM görüntüsünde ortaya konuldu.



Şekil 4.15. Prob bağlı biyoaktif tabakanın amplikon ile etkileşime girdikten sonrası SEM görüntüsü.

Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15’te biyoaktif tabaka hazırlama basamaklarında ve biyoaktif tabakaya amplikon bağlandıktan sonraki elektrot yüzeyinin biyofizikokimyasal özelliklerini ortaya koyan FTIR ve SEM görüntüleri verilmiştir.

4.13. “Cell-Free” Fetal DNA Genosensör Çalışma Sonuçları

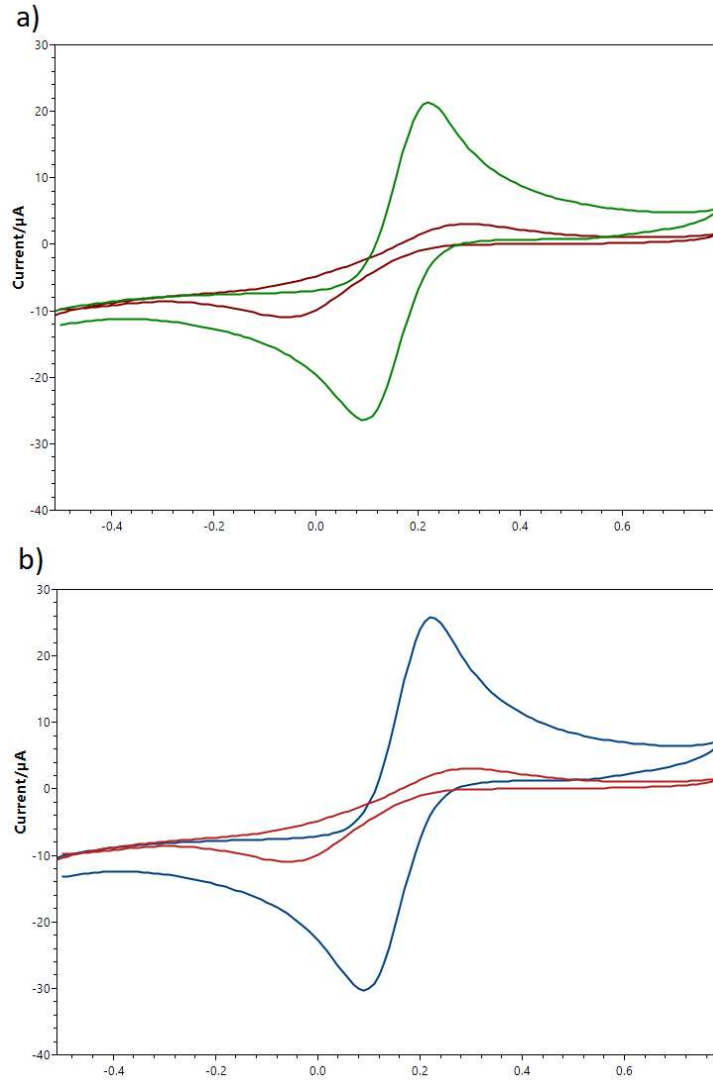
Optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen pH 7,5 potasyum fosfat tamponu, 20 nmol Nanopolimer derişimi, 100 nmol prob miktarı içeren çalışma hücreesine maternal 50 µL tam kan eklenmesiyle genosensörde saptanan IVS1-110 (G→A) mutant ve normal genotipini gösteren voltamogram sonuçları şekil 4.16’da gösterilmiştir. Şekil 4.16’da genosensörde hibridizasyon işleminin gerçekleştiği referans voltamograma göre elde edilen yeşil (mutant) ve mavi (normal) eğrilerde gözlemlenmektedir. Örnekleme belirtilen 20 örnekte aynı sonuçlar, şekil 4.16’da gösterildiği gibi elde edilmiş olup, her bir örneğin maternal “cell-free” fetal DNA genotipinin IVS1-110 (G→A) heterozigot olduğu ortaya konmuştur.

4.14. Duyarlılık ve Özgüllük Çalışmaları

Duyarlılık ve özgüllük testin karakteristik özellikleridir. Popülasyondan etkilenmezler. Alınan 20 pozitif örnekten alınan 20 pozitif ölçüm ve 20 negatif örnekten

alınan 20 negatif ölçümün sonuçları tabloda yerleştirilip yukarıdaki denklemlerde yerlerine konduğunda Duyarlılık ve Özgüllük çalışmalarının %100 olduğu belirlenmiştir¹⁰³.

ROC testi yeni geliştirilen tanı testlerinin altın standart yöntem ile karşılaştırılıp, yeni yöntemin etkinliğini ve kullanılabilirliğini göstermektedir. Tablo 2’de genosensörün altın standart yöntem olan ARMS yöntemiyle karşılaştırılması verilmiştir.

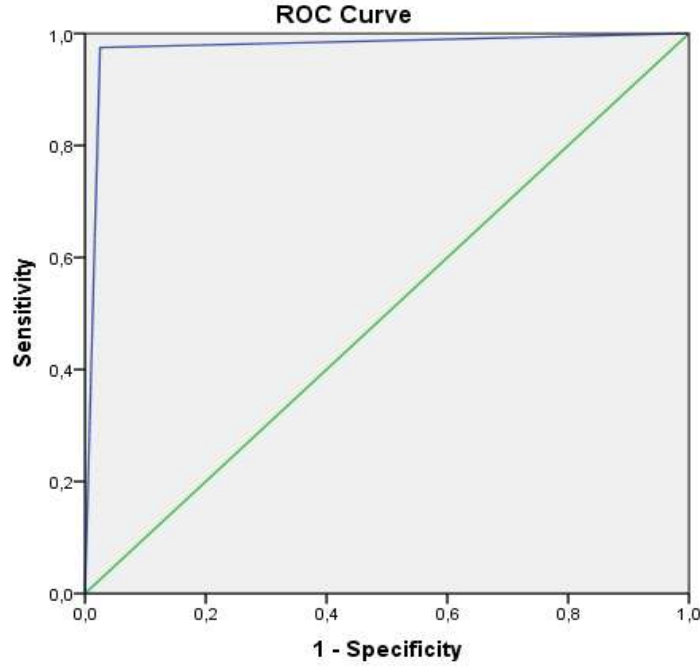


Şekil 4.16. “Cell-free” fetal DNA IVS1-110 (G→A) genotipinin genosensör hibridizasyon çalışmaları. a) Mutant genotip çalışması (Yeşil: Mutant genotip eğrisi, Kırmızı: Referans eğrisi). b) Normal genotip çalışma (Mavi: Normal genotip eğrisi, Kırmızı: Referans eğrisi).

Bu çalışmada geliştirilen genosensörün ölçüm tekrarlanabilirliği araştırıldı. Ölçüm hücresi içerisine mutasyon varlığı bilinen örnek ampliconlarından 1'er µL ekleme yaparak ölçümler alındı. Anne kanında fetal DNA tayini tekrarlanabilirlik denemelerinde örnek olarak mutasyonu babadan farklı olan, anne kanının çalışma hücresine eklenmesi suretiyle 20 ölçüm alınmış, bu ölçümler sonucunda 20 pozitif yanıt alınmıştır.

Tablo 2. Fetal DNA'ların IVS1-110 (G→A) mutasyonu bakımından genosensör ve ARMS sonuçları duyarlılık ve özgüllük tablosu.

ARMS				
Yeni Test		Mutasyon Var	Mutasyon Yok	Toplam
	Pozitif	20	0	Toplam Pozitif 20
	Negatif	0	0	Toplam Negatif 20
	Toplam	20	0	20



Şekil 4.17. Genosensör çalışmalarının ROC eğrisi.

Tablo 3. Maternal kandan elde edilen fetal mutasyon sonuçlarının listesi.

Örnek	Moleküler Sonuç	Genosensör
Y. S.	Pozitif	Pozitif
T. G.	Pozitif	Pozitif
D. A.	Pozitif	Pozitif
L. K.	Pozitif	Pozitif
H. U.	Pozitif	Pozitif
Ö. G.	Pozitif	Pozitif
E. S.	Pozitif	Pozitif
N. K.	Pozitif	Pozitif
D. Y.	Pozitif	Pozitif
B. N.	Pozitif	Pozitif
F. T.	Pozitif	Pozitif
L. T.	Pozitif	Pozitif
P. B.	Pozitif	Pozitif
Z. G.	Pozitif	Pozitif
M. A.	Pozitif	Pozitif
D. S.	Pozitif	Pozitif
H. K.	Pozitif	Pozitif
G. L.	Pozitif	Pozitif
D. U.	Pozitif	Pozitif

Tablo 2 ve şekil 4.17’de gösterilen bulgular tablo 3’te listelenen örneklerin sonuçlarının duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Tıbbın kullanımına hizmet eden neredeyse tüm yöntem ve cihazlar, her gün evrilir iken tanısal yöntemlerin rutin kullanımındaki yeri tamamen değişmese de güncelleme gerektirir. Bu nedenle dünya genelinde yapılan çalışmalar, laboratuvar tıbbının da diğer tüm alanlar gibi, yenilemesi yönündedir. Bu yenilikler, eski sistemlerin güncellenerek daha hızlı sonuç verebilen, daha küçük, daha az sarf malzeme harcayan ve daha az maliyetli sistemlerin üretilmesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm saydığımız bu özellikleri bir araya getiren ve laboratuvar tıbbının geleceğini oluşturan, yüksek ivme ile ilerleyen bilimsel gelişmelerin yardımıyla yonga temelli laboratuvar (lab-on-a-chip) teknolojisi, yakın gelecekte yerini alacaktır^{104, 105}.

“Lab-on-a-chip” teknolojisinin alt yapısını biyosensörler oluşturmaktadır. Hazırlanan prototip biyosensörler, ileri multidisipliner çalışmalar ile “lab-on-a-chip” teknolojisine hizmet etmektedir. Genetik analizlerde kullanılmak üzere tasarlanan biyosensör sistemlerine, genosensör adı verilmektedir. Genosensörler, bir fizikokimyasal çevirici ile biyolojik yapıları birleştiren analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir genosensör, bir veya bir grup analit (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali (elektiriksel, optiksel vs.) üretir^{106, 107}.

Genosensörler genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyobileşen”, bu biyobileşenin analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürülebilen çevirici ve bu sinyalleri ileten ileticilerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli, fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren biyobileşendir².

Biyobileşen, biyoaktif tabaka üzerinde değişime ve dönüşüme neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu, ortamda oluşan uyarı izlenerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları, genetik materyal gibi birçok biyomolekül kullanılmaktadır². Bu tez kapsamında biyomolekül olarak bağlanmış prob ve algılama sistemi olarak salınım değişimine duyarlı genosensör kullanılmıştır. Bu tür genosensörlerde temel prensip, normalde yalıtkan olan kuvars kristalin yüzeyinde bağlanma gerçekleşmesiyle oluşan, ağırlık değişiminin oluşturacağı salınım kaynaklı elektrik sinyali üretmesidir¹⁰⁸.

Bu çalışmada, hibridizasyona yönelik genosensör, bir biyosensörde bulunması gereken parametreler göz önünde bulundurularak tasarlanmaya çalışılmıştır. Bu parametrelerden en önemlileri geliştirilen biyosensörün hassas, seçiciliği yüksek ve düşük maliyetle kısa sürede tayin yapabilmeye elverişli olmasıdır. Herhangi bir etiketlemenin olmadığı ve indikatörün kullanılmadığı hibridizasyon tayin yöntemi kullanılarak tasarımı yapılan genosensör ile girişimsel olmayan prenatal tanı uygulamalarında kullanılmak üzere, “cell-free” fetal DNA tayinine yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

Tez çalışmamızda örneklem grubu olarak β -talasemi prenatal tanısı için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD’ye başvuran, paternal moleküler tanısı IVSI-110 mutasyonu konmuş, alınan CVS materyalinde IVSI-110 mutasyonu taşıdığı saptanmış, fetüse sahip ebeveynlerden onam formunu imzalayan 20 aile, çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklem grubunun mutasyonları ARMS yöntemiyle belirlenmiştir. ARMS halen geçerliliğini koruyan bir yöntem olsa da literatüre girişi ve rutin analizlerde kullanıma başlanması 1970’lerin başlarına karşılık gelmektedir⁹⁶. 50 yıldır kullanılan güvenilir bir yöntem olmasına rağmen içerisinde bulunduğumuz nano teknoloji çağında, yukarıda sıralamaya çalıştığımız gereksinimlerin üstesinden gelemediğini göz ardı etmemek gerektiğini düşüncesi yadsınamaz bir gerçektir¹⁰⁹.

Tez çalışmasında kullanılan genosensör biyoaktif tabakasının amacımızı karşılayıp karşılamayacağını anlaşılabilmesi için biyofizikokimyasal analizlere gereksinim duyulmaktadır. Bu biyofizikokimyasal analizlerde yüzey morfolojinin belirlenebilmesi için taramalı elektron mikroskobu görüntüleri alınıp, ayrıca biyoaktif tabakanın içerdiği kimyasal kompozisyon ve bağ yapısı FTIR analizi yapılarak belirlenmiştir^{99, 101}.

Taramalı elektron mikroskobunda yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların örnek üzerine odaklanması, bu elektron demetinin örnek yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve örnek atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra, bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılması ile elde edilir. Görüntü elektron gibi çok küçük materyaller yardımıyla alındığından dolayı nanometre boyutundaki yapıların ayırt edilebilmekte ve böylece yüzey hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir^{98, 110}. Taramalı elektron mikroskobunun bu özelliğinden yararlanarak biyoaktif tabakanın morfolojik özelliklerinin gözlemlenebilmesi sağlanmıştır. Şekil 4.4’te, biyoaktif tabaka hazırlanma aşamalarının ilk basamağı olan, nanopolimer bağlanması gerçekleşmiş

elektrot yüzeyi görüntülenmektedir. Şekilde nanopolimerin karnabahar şekli oluşturduğu görülmektedir. Görüntüdeki karnabahar şekilleri, enzimlerin aktif merkezi benzeri girinti ve çıkıntılar içermektedir. Bu girinti ve çıkıntılar yüzey alanını genişletmeye yardımcı olmaktadır. Yüzey alanının genişlemesi, genosensörün elektrotunun yüzeyine daha fazla prob bağlanmasına olanak sağlamaktadır. Şekil ayrıntılı incelendiğinde yüzeyde oluşan kürelerin ortalama yarıçap uzunluğu 5 nm civarındadır. Şekil 4.14'te ise biyoaktif tabaka hazırlanma aşamalarının ikinci basamağı olan, prob bağlanması gerçekleştikten sonra elektrot yüzeyi görüntülenmiştir. İki görüntü arasındaki fark, biyoaktif tabaka hazırlanma işlemlerinin amacına uygun ve başarılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, şekil 4.15'te örnek çalışması sonrası elektrot yüzeyi görülmektedir. Çalışma yapıldıktan sonra elektrot yüzeyindeki bariz değişimler, şekil 4.5 ve şekil 4.13 karşılaştırıldığında fark edilmektedir.

Kızılötesi Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulması prensibine dayanır. Soğurulma, moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir^{99, 111}. FTIR analizinin prensibi "Tacoma Narrows Köprüsü Kuramı"na dayanmaktadır¹¹². Kurama göre her maddenin kendine özgü bir salınım değeri vardır, eğer bu salınım dışardan bir etkiyle sağlanırsa madde bu salınıma kayıtsız kalmayacaktır. Bu kuram, bir askeri geçit sırasında askerlerin uygun adım yürüyüş salınımindan etkilenerek yıkılan "Tacoma Narrows Köprüsü"nden adını almaktadır. Bu prensibe göre, titreşen bağların enerji aralıklarına göre biyoaktif tabaka bileşiminde gerçekleşmiş olan bileşenler ve yapmış olduğu bağların saptanması sağlanmıştır^{112, 113}. Şekil 4.5'te biyoaktif tabaka hazırlanması aşamalarının ilk iki basamağının kimyasal bileşenleri ve bu kimyasalların yapmış olduğu bağlar iki grafiğin üst üste getirilmesi ile iki basamak arasındaki fark gösterilmiştir. FTIR analizinde elde edilen grafikte, kızıl ötesi ışığın belirli dalga boyundaki salınımla aynı salınımı gösteren bağlardan; dalga boyu 510-630 nm arası olan kısımda tiyol gruplarının kurduğu disülfit köprüleri belirlenmektedir, dalga boyu 1000-1500 nm arasında genetik materyal bazları belirlenmektedir. Şekil 4.13'te iki görüntünün üst üste getirilmesi bu aralıklardaki bariz farkın görülebilmesini kolaylaştırmıştır¹¹³.

Biyokimyasal çalışmalarda tampon seçimi ve tampondan gelen iyon şiddetinin belirlenmesi çalışmaları, çalışmanın sağlıklı yürütülebilmesi için olmazsa olmaz bir optimizasyon basamağıdır³. En iyi tampon derişimini belirlemek için ölçümler, pH 7,5'te, derişimi 25, 50, 75 ve 100 mM olmak üzere 4 farklı fosfat tamponunda yapıldı. Tampon

kaynaklı iyon şiddeti çalışmalarında, çeşitli derişimlerde hazırlanan fosfat tamponu derişim optimizasyonu çalışmaları sonucu, 50 mM tampon derişimi en uygun değer olarak belirlendi. Tampon derişiminin diğer biyokimyasal çalışmalara göre düşük olmasının nedeni, biyoelektrokimyasal temelli yöntemler, tepkimeye giren analitin çok düşük derişimlerini saptanabilmesine olanak veren yöntemler olmasıdır. Bu özelliğiyle elektrobiyokimyasal yöntemler, diğer yöntemlerin saptama sınırının altında kalan miktarlardaki analitleri de ayırt edebilme özelliğine sahiptir.

Tampon derişimi çalışmalarında ARMS gibi genetik analiz çalışmalarında tris tamponu kullanılmaktayken fosfat tamponu seçilmesinin sebepleri vardır. Kullanılan nanopolimerin uyumluluğunun fosfat tamponunda daha yüksek olmasıdır. Hema-Mac nanopolimeri fosfat tamponunda kararlı olup yapısı bozulmadan saklanabilmektedir¹¹⁴. Tris•HCl tamponunun genetik analizlerde kullanılmasının nedeni elektroforezde ayırımın sağlanması için iletkenliğinin ve elektronegatifliğinin yüksek olmasından dolayıdır. Biyosensör çalışmalarında biyoaktif tabakanın iletken olması istenmekte ancak tampon ortamında gerçekleşebilmesi muhtemel tepkimelerden sisteme elektron akışı olmaması için tampon ortamının iletkenliğinin biyoaktif tabakanın iletkenliğinden yüksek olması istenmemektedir. Tris•HCl tamponunun elektronegatifliğinin yüksekliği de ortamdaki elektron akımını etkileyebileceğinden dolayı Tris•HCl tamponu tercih edilmemiştir^{108,114}.

Optimum tampon derişimi belirlenmesinin ardından, belirlenen derişimde, farklı tamponların ve bu tamponların optimum çalışma pH aralığının belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde, fosfat tamponundan başka asetik asit ve glisin tamponlarında da denemeler yapıldı (Şekil 4.6.a, Şekil 4.6.b). Asetik asit ve glisin tamponlarının tamponlama bölgesi fizyolojik pH'den uzak olduğu için bu tamponlarla yapılan denemelerde alınan elektrobiyokimyasal yanıtlar fosfat tamponuna göre düşük bulundu. Elde edilen akım farkları şekil 4.7'de karşılaştırıldığında, en iyi ayırım gücünün 50 mM fosfat tamponuyla yapılan çalışmalarda olduğu görülmektedir.

Optimum nanopolimer miktarı çalışmalarında biyoaktif tabaka hazırlanmas aşamasında 5, 10, 20 ve 40 nmol derişimlerinde poly Hema-MAC nanopolimeri kullanılarak elektrotlar hazırlandı, optimum nanopolimer miktarı 20 nmol olarak belirlendi. Nanopolimer derişimi elektrot yüzeyini kaplayacak düzeye ulaştıktan sonra kendi içerisinde istenmeyen bağlar yapabileceğinden dolayı fazla kullanımı hem yanlış sonuca hem de malzeme israfına neden olabilecektir.

En uygun prob derişimi çalışmalarında biyoaktif tabakaya immobilize edilen farklı prob miktarları ile çalışma yapıldığında aynı örneğe verdikleri akım değerleri farklı olmuştur. En uygun prob miktarı 100 nmol olarak belirlenmiştir. Bu akım farkının nedeni, nanopolimer aracılığıyla yüzey alanı genişletilmiş elektrot yüzeyinde daha düşük derişimlerdeki problemlerin polimer yüzeyindeki bağlanma doğunluğuna ulaşamaması olduğu düşünülmektedir. 100 nmol derişiminde ise elektrot yüzeyinin yeteri kadar kaplanmasına ek olarak IVS1-110 probunun nanopolimer ile yeterli düzeyde bağlanma doğunluğuna eriştiği düşünülmektedir. 100 nmol'luk optimum prob derişiminin yzerindeki derişimlerde alınan elektrokimyasal yanıt, 100 nmol derişimindeki alınan yanıtı çok yakındır (şekil 4.7). 100 nmol yzerindeki prob derişimlerinin kullanımı, gereğinden fazla malzeme sarfı yanında yöntemin özgüllük ve duyarlılığını da etkileyeceğinden elektrobiyokimyasal çalışmaların prensibine uymamaktadır.

Kendiliğinden oluşan çoklu tabaka, biyomembran mikro çevreye benzeyen tek moleküler film tabakası benzeri yapılar oluşturarak, elektrot yüzeyinin işlevsellik kazanmasına olanak saęlar¹¹⁵. İçerdiği elektro aktif veya elektro inaktif işlevsel yan gruplarla gerek elektrot yüzeyine bağlanmada gerekse de prob bağlanmasında önemli rol oynar. Yüksek kararlılığı ve iletkenlik özelliğiyle SAM biyoelektrokimyasal çalışmalara geniş bir uygulama alanı sağlamaktadır. SAM oluşumu sırasında biyoaktif tabakayla elektrot yüzeyi arasında gerçekleşen özgül ilişkiler yoluyla meydana gelir. Bu yapıların moleküler anlamda yapısal esnekliğe izin vermesinden dolayı bu tip yüzeyler biyoelektrokimyasal modifikasyona uygun hale gelir¹¹⁶. Bu fiziko-kimyasal özellikleri ortaya koyacak elektrokimyasal yanıtı göstermek amacıyla yapılan SAM süresinin optimizasyonu çalışmalarında, elektrot yüzeyindeki biyoaktif tabakanın bağlanma süresi çalışmaları yapılmıştır. En uygun kendiliğinden oluşan çoklu tabaka süresinin, gerçekleştirilen farklı bağlanma sürelerinde 5 saat olduğu bulundu (şekil 4.8). Daha kısa veya daha uzun bekleme sürelerinde yeteri kadar bağlanma sağlamaması yanında fazla beklemeden dolayı biyoaktif tabaka hazırlanmasından sonraki adımda, bağlanacak problemlerin nanopolimer etkileşimini değiştirebilecek durumlar olabileceği dşnlmektedir^{115, 116}.

Hibridizasyona bağlı genetik çalışmalarda, tek zincirli proba bağlanma sağlanabilmesi için örneğin de tek zincirli olması gerekmektedir. Çift zincirli genetik materyalin tek zincirli genetik materyal haline gelebilmesi için DNA denatürasyon sıcaklığına getirilmesi gerekmektedir. Uygun DNA denatürasyon sıcaklığına gelen

genetik materyal, elektrot yüzeyindeki proba hibridize olma yeteneğine kavuşmuş olacaktır⁹⁶. Bu amaçla 85-95 °C aralığında DNA denatürasyon sıcaklığı çalışmaları yapıldı. Çalışmalarda elde edilen verilere göre en yüksek akım farkı, çift zincirli genetik materyali içeren çalışma hücresi 91 °C’de iken saptandı (Şekil 4.10).

En iyi bağlanma sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda, elektrot yüzeyinde bulunan proba hibridizasyon gerçekleştirebilmesi için optimum DNA bağlanma sıcaklığına getirilmesi gerekmektedir. Optimum bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 58-68 °C sıcaklık aralığında çalışıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek akım farkının elde edildiği sıcaklık 63 °C olarak bulundu (Şekil 4.11). Literatüre ve PCR protokollerine bakıldığında genetik materyalin bağlanma sıcaklığı için çalışma sıcaklığının 65 °C civarında olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçların PCR sonuçlarına yakın olduğu düşünülmekle birlikte, PCR koşullarının 2 °C altında olması, çözeltinin 2 °C az ısıtılması maliyet açısından bir artı değerdir. Ayrıca iyonlaşma potansiyelinden dolayı ısı kaynaklı tampon içeriği bozulmasının az da olsa önüne geçilmesine katkı sağlayacaktır.

Optimum tarama hızı çalışmalarında en yüksek akım farkını veren tarama hızının belirlenmesi için PalmSens potansiyostat cihazının sistem üzerinde takip ve tespit edebileceği sabit akım miktarının genliği değiştirilerek çalışmalar yapılmıştır. Sabit akım genliğinin değişmesi, kuvars kristalin genliği ile aynı mikroamper (μ A) aralığında, genosensörde elde edilen akım farkı artmakta ve böylece genosensörün ayırım gücü artmaktadır. Optimizasyon çalışmalarının temel amacı da en yüksek akım farkını elde ederek sistemin ayırım gücünü arttırmaktır¹¹⁷. Tarama hızı belirlenmesi çalışmalarında döngüsel voltametre tekniği kullanılmaktadır. Döngüsel voltamogram optimizasyonu çalışmalarında tarama hızı önemli değişkenlerden biridir. Tarama hızı değişimiyle sensörün ayırım gücüne etki eden potansiyel farkı değişiminden faydalanılarak, heterojen elektrot tepkimesini takiben oluşan kimyasal tepkimelerin, difüzyon, adsorpsiyon gibi, özellikleri incelenip gözlemlenebilir. Döngüsel voltamogramın gerçekleşen tepkime hızı ile tarama hızı arasındaki uyumun yakalanamamasında, tepkimenin doğru bir şekilde izlenmesi mümkün değildir. Çok yavaş gerçekleşen bir tepkime çok hızlı bir tarama hızı ile ölçülmeye çalışıldığında tepkimenin gerçekleşmesi gözlenemeyecek, dolayısıyla bir potansiyel fark elde edilemeyecektir¹¹⁸. 0,01 ile 0,07 V/s aralığında tarama hızları ile yapılan ölçümler içinde en yüksek akım ve pik oluşturan tarama hızı 0,06 V/s olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Duyarlılık ve özgüllük testleri yeni bir yöntemin halihazırda kullanılmakta olan yöntem ile ayırım güçlerinin karşılaştırılması işlemidir. Duyarlılık: Duyarlılık, gerçek pozitif oranı olarak da adlandırılmaktadır. Tez çalışmamızda geliştirdiğimiz genetik tanı yönteminde duyarlılık, testin mutasyonu taşıyanları hangi oranla tespit edebildiği anlamına gelir¹¹⁹.

Duyarlılık çalışmalarında önemli olan durum, duyarlılığın kaç yanlış pozitif tanı yaptığı değil, kaç gerçek pozitif yaptığıdır. Bu bağlamda, mutasyonun doğru şekilde belirleme başarısı ölçülmektedir. Geliştirdiğimiz genosensör sisteminde çalışılan 20 örneğin 20'si de pozitif sonuçlandığından dolayı genosensör sisteminin duyarlılığı %100 bulundu (Şekil 4.15).

Özgüllük kimi zaman gerçek negatif oranı olarak da adlandırılmaktadır. Tez çalışmamızda geliştirdiğimiz genetik tanı yönteminde mutasyonu olmayan bir hastada mutasyonun olmadığını saptama oranını belirtir. Özgüllük hesaplanırken kaç hastaya gerçek pozitif tanı konduğu dahil edilmez. Duyarlılık gibi özgüllük de sadece tanı hassasiyetinin tek bir yönünü değerlendirmektedir. Bu bağlamda, mutasyonun gerçek negatif olmadığını belirleme başarısını ölçmektedir. Geliştirdiğimiz genosensör sisteminde çalışılan negatif kontrol örnekleri gerçek negatif sonuçlandığından dolayı genosensör sisteminin özgüllüğü %100 bulunmuştur.

Duyarlılık ve özgüllük deneylerinde önemli olan sadece duyarlılığı veya sadece özgüllüğü en üst seviyede tutmak değildir. Önemli olan hem duyarlılığı hem de özgüllüğü kabul edilebilecek ortak bir paydada birleştirecek kritik noktayı belirleyebilmektir^{98, 119}.

Tanı testlerinin değerlendirilmesinde duyarlılık özgüllük parametrelerinin yanısıra ROC eğrisi analizi ve grafiğinin yorumlanıp böylece tanı testinin etkinliğinin gösterilmesi gerekmektedir. ROC eğrisinde ise tüm eşik değerlere göre elde edilen duyarlılık y ekseninde, özgüllük (grafikte 1-duyarlılık olarak verilmektedir) ise x ekseninde noktalar halinde belirtilerek en sonunda birleştirilir ve ortaya ROC eğrisi çıkar. Analiz sonunda eğri altında kalan alan 1'e yaklaştıkça tanı değeri yükselmektedir. %100'lük tanı gücünde eğri altında kalan alan 1'e eşit olur. Eğri altında kalan alan belirlenir. Sonuç olarak eğri altında kalan alan 0.50 değerinde veya 0.50 değerinin altında ise yeni yöntem istatistiksel olarak anlamsızdır. Eğri altında kalan alan 0.50 değerinden ne kadar büyük ise test o derece anlamlıdır^{103, 119}. Tez çalışması kapsamında geliştirdiğimiz sistemde yapmış olduğumuz analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde ROC eğrisinde de %100'lük tanı gücü oranı elde edilmiştir.

Çalışmada vaka sayısının az olması özgüllük, duyarlılık ve ROC analizlerinde bu denli yüksek sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir ancak elde edilen verilerin gerçek olmadığı anlamına gelmemektedir. Sistemin daha çok örnek çalıştıktan sonra duyarlılık ve özgüllük çalışmalarının tekrarlanması gerekliliği bulunmaktadır.

Günümüzde halen fetal genetik hastalıkların tanısında fetal örnekleme, girişimsel olarak elde edilen koryonik vilüs ve amniyosentez örneklerinden yapılmaktadır. Bu yöntemlerin hem anneye hem de fetüse önemli yan etkileri bulunmaktadır. Anne kanında bulunan “cell-free” fetal genetik materyallerle yapılan işlemlerde risklerin en aza indirilmesi, çalışmaların bu yönde ilerlemesine neden olmuştur. Genetik çalışmalarda rutin olarak girişimsel yöntemlerin yanısıra PCR temelli geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar genel olarak zaman alıcı ve pahalı yöntemlerdir. Bu nedenle fetüsün genetik profilinin belirlenebilmesi için daha kısa sürede, daha düşük maliyetle daha doğru ölçüm yapan sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Maternal kandan elde edilen “cell-free” fetal DNA’nın moleküler fetal tanıda kullanılması, doksanlı yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu alanda araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. İlk kez 1997’de Lo ve arkadaşları tarafından gebelerde kadınlarda olmaması gereken Y kromozomuna ait dizileri, maternal dolaşımdaki “cell-free” fetal DNA olarak tanımlanmıştır³³. Maternal dolaşımdaki “cell-free” fetal DNA, miyotonik distrofi, Rh faktörü, akondroplazi, konjenital adrenal hiperplazi ve β -talasemi gibi çeşitli kalıtsal hastalıklarda, annede bulunmayan fetal lokusların, girişimsel olmayan doğum öncesi tanı yöntemiyle saptanabilmesine olanak sağlamaktadır³⁴. Bu tez kapsamında anne kanından “cell-free” fetal DNA tayinini daha hızlı ve daha ucuz ölçümüne olanak sağlayacak genosensör alt yapısı geliştirildi. Geliştirilen bu genosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabakanın optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Çalışma koşullarının optimizasyonunda öncelikle tarama hızı ile çalışma aralığı belirlenerek en iyi pH, sıcaklık ve tampon derişimleri bulundu.

Optimize edilmiş genosensör deney koşullarında, fetal genotipin tanımlanması amacıyla çalışma hücresine maternal kaynaklı tam kan maternal 50 μ L konularak fetüsün genotipi saptanmıştır (Şekil 4.1). Gebelik haftasına bağlı olarak “cell-free” fetal DNA’nın niceliksel olarak değişebileceği bilgisi göz önüne alınarak çalışma hücresine eklenen maternal kökenli tam kan miktarı hacimselden öte derişimsel olarak optimize edilmesi gerekmektedir²³. Bu nedenle çalışmanın bir sonraki aşamasında konulacak maternal “cell-free” fetal DNA miktarına yönelik optimizasyon çalışması yöntemin verimliliği

açısından gereklidir. Buna rağmen temel amacımızın, mutasyona özgü bir genosensör tasarlanması olması nedeniyle bu tür ileri optimizasyon deneyleri bir üst basamak olarak değerlendirilmiştir.

Genosensörün duyarlılık ve özgüllük çalışmalarında elde edilen sonuçlar ARMS yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulunmuştur (Şekil 4.17).

Literatürde β -talasemi tayinine yönelik sensör çalışmaları incelendiğinde çalışmalarının sadece amplikon kullanarak yapıldığı görülmektedir^{120,-122}. Çalışmamızın literatüre göre en büyük artışı, “cell-free” fetal DNA’da mutasyon tayini yapmış olmamızdır. Bu avantaja sahip olunabilmesinde en büyük etmen biyoaktif tabaka hazırlaması sırasında nanopolimer kullanarak saptama etkinliğinin artırılmasıdır. Feriotto ve arkadaşlarının 2004 yılında altın yüzeye, biyotin aracılığıyla prob bağlanması gerçekleştirerek yaptığı çalışmada, mutasyon saptamak amacıyla kullandıkları amplikon miktarının daha fazla olmasının sebebi, biyoaktif tabakada nanomalzeme kullanmamış olmasıdır¹²².

Hamidi-Asl ve arkadaşlarının karbon pasta elektrot kullanarak, altın ve platin kompozit nanomerlerle hazırladığı biyoaktif tabaka ile yaptığı çalışmada da amplikon kullanmışlardır. Doğrudan ölçüm alamamalarının ana sebeplerinden biri QCM kullanmamaları olduğunu düşünmekteyiz¹²³. Bunun aksine çalışmamızda QCM kullanılması literatürde de belirtildiği gibi daha hassas olarak nanomol düzeyinde “cell-free” fetal DNA’da mutasyon saptamamıza olanak sağlamıştır. Nanoteknolojiyle QCM kullanıldığı zaman bizim çalışmamızda olduğu gibi çok daha verimli olmaktadır^{122, 123}.

Değişik birçok işlemde ve özellikle de klinik süreçte tepkime gerçekleşmesi için analitik kimyasallar biyolojik materyallerle karıştırılır ve ölçüm yapıldıktan sonra analiz materyalleri geri kazanılamamaktadır. Bu duruma ekonomik açıdan bakıldığında hali hazırda rutin analizlerde kullanılan yöntemlerin oldukça maliyetli olduğu görülmektedir. Bu nedenle DNA primerlerinin immobilize edilerek defalarca kullanılmaları oldukça ekonomik olduğu ifade edilmektedir¹²⁴. Buna bağlı olarak DNA primerlerinin immobilizasyonu ile elde edilen biyoaktif tabaka; genosensörlerin kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Bütün bu veriler ışığında genosensörün diğer yöntemlerden kullanım kolaylığı, girişimsel olmaması, maliyeti, doğruluğu, hızı ve duyarlılığı açısından avantajlı olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda paternal mutasyonun belirlenmesi amaçlanması fetal DNA ile Maternal DNA'nın birbirine girişim yapmasını önlemesi içindir. Sistemin verimli olarak sonuç verebilmesi için maternal ve paternal mutasyon tiplerinin birbirinden farklı olması gerekmektedir. Bu durumda girişimsel olmadan maternal kan örneği babanın mutasyonunu fetüsün taşıyıp taşımadığını gösterebilecektir. Elde edilen sonuca göre konsültasyon desteğiyle, maternal mutasyon tayininin yapılmasına gerek olup olmadığı kararlaştırılacaktır. Geliştirilen genosensör tasarımı, gelecekte hem maternal hem paternal mutasyon tayinini gerçekleştirebilecek bir sistemin alt yapısını oluşturmaktadır. Bu çalışmanın elektrik-elektronik mühendisliği, biyomedikal mühendisliği ve bilgisayar mühendisliği alanlarla yapılacak multi disiplinler çalışmalar ile taşınabilen hasta başı test yapabilen bir araca dönüştürülebileceği ön görülmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamız β -talasemi prenatal tanısı için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'ye başvuran, fetüsün paternal moleküler tanısı IVS1-110 (G→A) mutasyonu konmuş, 20 örnekten oluşmaktadır. Örneklerde paternal mutasyon varlığı genosensör ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen genosensörde altın yüzeyli kuvars elektrot yüzeyinde nanopolimer tabanlı biyoaktif tabakada prob immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve prob dizinin eşleniği olan gen bölgesinin tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmada genosensör sistemini oluşturmak için prob Poli Hema-MAC nanopolimeri aracılığıyla elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Geliştirilen bu sistem salınım farklanmasıyla elektrik üreten kuvars kristalin oluşturduğu akımın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Tasarlanan genosensörün optimizasyon çalışmalarında ilk olarak biyoaktif tabaka için nanopolimer derişimi ve prob derişimi çalışıldı. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra çalışma koşullarının optimizasyonunda tarama hızı, pH, sıcaklık ve tampon konsantrasyonu belirlendi. Son olarak genosensör karakterizasyon çalışmalarıyla duyarlılık ve özgüllük çalışmaları yapıldı.

Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda nanopolimer miktarı 20 nmol, prob miktarı 100 nmol olarak bulundu. En iyi çalışma koşullarının belirlenmesinde fosfat tamponunu pH 7,5 ve 0,1 M, tarama hızı 0,6 V/s, bağlanma sıcaklığı 63 °C olarak belirlendi. Karakterizasyon çalışmalarında yapılan duyarlılık ve özgüllük çalışmalarında örneklem sayısı yetersiz (n=20) olmakla birlikte, elde edilen sonuçların girişimsel yöntem olan koriyonik vilüs örneğinden elde edilen fetal genetik materyalin moleküler analizleriyle uyumlu olduğu ROC eğrisi ile de gözlemlendi.

Geleneksel moleküler yöntemlerde kullanılan kimyasal ve biyolojik ayıraçlar geri kazanılamadığından dolayı elde edilen sonuç, literatür ile karşılaştırıldığında hazırlanan genosensörün tekrar kullanılabilirliği önemli bir avantaj yaratmaktadır².

Örneklem sayısının arttırılıp çalışmalara devam edilmesi ve elde edilen yüksek vaka sayısı ile özgüllük ve duyarlılık testleri yinelenebilir.

Sonuç olarak bu doktora tezi kapsamında, altın kaplama kuvars elektrot ile “cell-free” fetal DNA tayinine yönelik tasarlanan genosensörün ileri çalışmaları, elektrik elektronik mühendisliği, bilgisayar mühendisliği ve biyomedikal mühendisliği gibi

bölümlerle multidisipliner geliştirme çalışmalarından sonra aile sağlığı merkezleri, tarama merkezleri gibi birinci kademe sağlık kuruluşlarında kullanılabilecek şekilde geliştirilebilir. Elde edilen sonuçlar taşınabilir genosensörler için iyi bir prototip oluşturacak, mevcut yöntemlere kıyasla daha ucuz, hızlı sonuç, doğruluk ve duyarlılık bakımından daha avantajlı, özgün bir yöntem olduğunu göstermektedir.



KAYNAKLAR

1. **Goode, J.A., Rushworth J.V., and Millner P.A.** Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*, **2015**; 31: 6267-76.
2. **Kökbaşı, U., Kayrın L. and Tuli A.** Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları (Biosensors and their Medical Applications). *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal)*, **2013**; 22: 499-513.
3. **Hooda, V., et al.** Recent trends and perspectives in enzyme based biosensor development for the screening of triglycerides: a comprehensive review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **2018**; 46: 626-635.
4. **Sotillo, A., et al.** Clinical evaluation of a disposable amperometric magneto-genosensor for the detection and identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods*, **2014**; 103: 25-8.
5. **Minamimoto, H., et al.** Polymerization of room-temperature ionic liquid monomers by electron beam irradiation with the aim of fabricating three-dimensional micropolymer/nanopolymer structures. *Langmuir*, **2015**; 31: 4281-9.
6. **Motamed F., P., et al.** Synthesis and Characterization of PMBN as A Biocompatible Nanopolymer for Bio-Applications. *Cell J*, **2017**; 19: 269-277.
7. **Abdul Rasheed, P. and Sandhyarani N.** Quartz crystal microbalance genosensor for sequence specific detection of attomolar DNA targets. *Anal Chim Acta*, **2016**; 905: 134-9.
8. **Shi, X., J. Zhang, and He F.** A new aptamer/polyadenylated DNA interdigitated gold electrode piezoelectric sensor for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosens Bioelectron*, **2019**; 132: 224-229.
9. **Vijayan, A., et al.** Multiple cargo deliveries of growth factors and antimicrobial peptide using biodegradable nanopolymer as a potential wound healing system. *Int J Nanomedicine*, **2019**; 14: 2253-2263.
10. **Luo, L.Q., et al.** Label-free electrochemical impedance genosensor based on 1-aminopyrene/graphene hybrids. *Nanoscale*, **2013**; 5: 5833-40.
11. **Williams, E., et al.** Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode. *Biosens Bioelectron*, **2003**; 19: 165-75.
12. **Singhal, C., et al.** Impedimetric genosensor for detection of hepatitis C virus (HCV1) DNA using viral probe on methylene blue doped silica nanoparticles. *Int J Biol Macromol*, **2017**; 98: 84-93.
13. **Torelli, E., et al.** DNA origami nanorobot fiber optic genosensor to TMV. *Biosens Bioelectron*, **2018**; 99: 209-215.
14. **Daneshpour, M., et al.** Femtomolar level detection of RASSF1A tumor suppressor gene methylation by electrochemical nano-genosensor based on Fe₃O₄/TMC/Au nanocomposite and PT-modified electrode. *Biosens Bioelectron*, **2016**; 77: 1095-103.
15. **Fortunati, S., et al.** Novel amperometric genosensor based on peptide nucleic acid (PNA) probes immobilized on carbon nanotubes-screen printed electrodes for the determination of trace levels of non-amplified DNA in genetically modified (GM) soy. *Biosens Bioelectron*, **2019**; 129: 7-14.
16. **Magrina, I., et al.** Electrochemical genosensor for the direct detection of tailed PCR amplicons incorporating ferrocene labelled dATP. *Biosens Bioelectron*, **2019**; 134: 76-82.
17. **Pividori, M.I., Merkoci A. and Alegret S.** Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens Bioelectron*, **2000**; 15: 291-303.
18. **Bakker, M.K., et al.** Prenatal diagnosis and prevalence of critical congenital heart defects: an international retrospective cohort study. *BMJ Open*, **2019**; 9: e028139.
19. **Bijok, J., et al.** [Non-invasive prenatal diagnosis of the most common aneuploidies with cell-free fetal DNA in maternal serum--preliminary results]. *Ginekol Pol*, **2014**; 85: 208-13.
20. **Chitty, L.S., et al.** New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet Gynecol*, **2011**; 37: 283-9.
21. **Dhallan, R., et al.** A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet*, **2007**; 369: 474-81.
22. **Yang, H., et al.** Systematic review of noninvasive prenatal diagnosis for abnormal chromosome genetic diseases using free fetal DNA in maternal plasma. *Genet Mol Res*, **2015**; 14: 10603-8.

23. **Yenilmez, E.D., Tuli A. and Evruke I.C.** Noninvasive prenatal diagnosis experience in the Cukurova Region of Southern Turkey: detecting paternal mutations of sickle cell anemia and beta-thalassemia in cell-free fetal DNA using high-resolution melting analysis. *Prenat Diagn*, **2013**; 33: 1054-62.
24. **Chen, E.Z., et al.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One*, **2011**; 6: e21791.
25. **Curtis, A., et al.** Confirmation of prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA typing of fetal tissues. *J Med Genet*, **1988**; 25: 79-82.
26. **Ridha J., et al.** Detection of IVS 1-110 and IVS 1-5 Mutations in β -Thalassemia Major Patients in Babylon Province. *Medical Journal of Babylon*, **2015**; 12: 357-362.
27. **Chauhan, A. and Prasad M.** Outcome of Pregnancy with Hemoglobinopathy in a Tertiary Care Center. *J Obstet Gynaecol India*, **2018**; 68: 394-399.
28. **Kanchan K. et al.** A multiplex ARMS PCR approach to detection of common β -globin gene mutations. *Analytical Biochemistry*, **2017**; 537: 93-98.
29. **Gholivand, M.B. and Akbari A.** A sensitive electrochemical genosensor for highly specific detection of thalassemia gene. *Biosens Bioelectron*, **2019**; 129: 182-188.
30. **Zafari, M., et al.** Non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia by detection of the cell-free fetal DNA in maternal circulation: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*, **2016**; 95: 1341-50.
31. **Sirichotiyakul, S., Charoenkwan P. and Sanguanserm Sri T.** Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*, **2012**; 32: 45-9.
32. **Galbiati, S., et al.** Fetal DNA in maternal plasma: a noninvasive tool for prenatal diagnosis of beta-thalassemia. *Expert Opin Biol Ther*, **2012**; 12 Suppl 1: S181-7.
33. **Lo, Y.M., et al.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, **1997**; 350: 485-7.
34. **Lo, Y.M., et al.** Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, **1998**; 62: 768-75.
35. **Verma, N. and Bhardwaj A.** Biosensor technology for pesticides--a review. *Appl Biochem Biotechnol*, **2015**; 175: 3093-119.
36. **Uniyal, S. and Sharma R.K.** Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of Organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: A review of status and prospects. *Biosens Bioelectron*, **2018**; 116: 37-50.
37. **Ozkan, D., et al.** Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor. *Anal Chem*, **2002**; 74: 5931-6.
38. **Singhal, C., Pundir C.S. and Narang J.** A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites. *Biosens Bioelectron*, **2017**; 97: 75-82.
39. **Dundar Yenilmez, E., et al.** A new biosensor for noninvasive determination of fetal RHD status in maternal blood of RhD negative pregnant women. *PLoS One*, **2018**; 13: e0197855.
40. **Xu, X., et al.** Electrochemical genosensor for detection of human mammaglobin in polymerase chain reaction amplification products of breast cancer patients. *Anal Bioanal Chem*, **2013**; 405: 3097-103.
41. **Clark, L.C., Jr. and Lyons C.** Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, **1962**; 102: 29-45.
42. **Fernandes, A.M., et al.** Development of highly sensitive electrochemical genosensor based on multiwalled carbon nanotubes-chitosan-bismuth and lead sulfide nanoparticles for the detection of pathogenic Aeromonas. *Biosens Bioelectron*, **2015**; 63: 399-406.
43. **Civit, L., et al.** Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. *Anal Chim Acta*, **2012**; 715: 93-8.
44. **Shajaripour Jaber, S.Y., Ghaffarinejad A., and Omidinia E.** An electrochemical paper based nano-genosensor modified with reduced graphene oxide-gold nanostructure for determination of glycated hemoglobin in blood. *Anal Chim Acta*, **2019**; 1078: 42-52.
45. **Pividori, M.I., Merkoci A. and Alegret S.** Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of beta-lactamase resistance in Staphylococcus aureus. *Analyst*, **2001**; 126: 1551-7.
46. **Pividori, M.I., Merkoci A. and Alegret S.** Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor. *Biosens Bioelectron*, **2001**; 16: 1133-42.
47. **Yean, C.Y., et al.** Enzyme-linked amperometric electrochemical genosensor assay for the detection of PCR amplicons on a streptavidin-treated screen-printed carbon electrode. *Anal Chem*, **2008**; 80: 2774-9.

48. **Kucherenko, D.Y., et al.** A highly selective amperometric biosensor array for the simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate. *Bioelectrochemistry*, **2019**; 128: 100-108.
49. **Becker, M.M., et al.** Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. *Talanta*, **2019**; 204: 626-632.
50. **Uliana, C.V., Riccardi C.S. and Yamanaka H.** Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20: 15476-91.
51. **Seo, D.H., et al.** Single-step ambient-air synthesis of graphene from renewable precursors as electrochemical genosensor. *Nat Commun*, **2017**; 8: 14217.
52. **Low, S.S., et al.** Sensitivity enhancement of graphene/zinc oxide nanocomposite-based electrochemical impedance genosensor for single stranded RNA detection. *Biosens Bioelectron*, **2017**; 94: 365-373.
53. **Das, R., et al.** An electrochemical genosensor for Salmonella typhi on gold nanoparticles-mercaptosilane modified screen printed electrode. *J Biotechnol*, **2014**; 188: 9-16.
54. **Farabullini, F., et al.** Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosens Bioelectron*, **2007**; 22: 1544-9.
55. **Ye, K., et al.** Development of a chemiluminescent DNA fibre optic genosensor to Hepatitis A Virus (HAV). *Talanta*, **2017**; 174: 401-408.
56. **Zarei-Ghobadi, M., et al.** A genosensor for detection of HTLV-I based on photoluminescence quenching of fluorescent carbon dots in presence of iron magnetic nanoparticle-capped Au. *Sci Rep*, **2018**; 8: 15593.
57. **Rahman, M.M. and A.M. Asiri.** Development of penicillin G biosensor based on penicillinase enzymes immobilized onto bio-chips. *Biomed Microdevices*, **2015**; 17: 9.
58. **Abdalthai, M.H., et al.** Electrochemical Genosensor To Detect Pathogenic Bacteria (Escherichia coli O157:H7) As Applied in Real Food Samples (Fresh Beef) To Improve Food Safety and Quality Control. *J Agric Food Chem*, **2015**; 63: 5017-25.
59. **Kalimuthu, P., et al.** A sensitive and stable amperometric nitrate biosensor employing Arabidopsis thaliana nitrate reductase. *J Biol Inorg Chem*, **2015**; 20: 385-93.
60. **Guo, X.** Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *J Biophotonics*, **2012**; 5: 483-501.
61. **Huang, C., et al.** Label-free genosensor based on immobilized DNA hairpins on gold surface. *Biosens Bioelectron*, **2011**; 26: 3121-6.
62. **Pascale, M., Zezza F. and Perrone G.** Surface plasmon resonance genosensor for the detection of Fusarium culmorum. *Methods Mol Biol*, **2013**; 968: 155-65.
63. **Crulhas, B.P., et al.** Electrochemical aptamer-based biosensor developed to monitor PSA and VEGF released by prostate cancer cells. *Anal Bioanal Chem*, **2017**; 409: 6771-6780.
64. **Daems, D., et al.** Competitive inhibition assay for the detection of progesterone in dairy milk using a fiber optic SPR biosensor. *Anal Chim Acta*, **2017**; 950: 1-6.
65. **Epstein, J.R., Lee M. and Walt. D.R.** High-density fiber-optic genosensor microsphere array capable of zeptomole detection limits. *Anal Chem*, **2002**; 74: 1836-40.
66. **Olgac, R., et al.** Zinc(II) phthalocyanine fused in peripheral positions octa-substituted with alkyl linked carbazole: Synthesis, electropolymerization and its electro-optic and biosensor applications. *Biosens Bioelectron*, **2017**; 98: 202-209.
67. **Tsai, M.Z., et al.** Real-time CRP detection from whole blood using micropost-embedded microfluidic chip incorporated with label-free biosensor. *Analyst*, **2018**; 143: 503-510.
68. **Zhang, J., et al.** Rapid detection of Escherichia coli based on 16S rDNA nanogap network electrochemical biosensor. *Biosens Bioelectron*, **2018**; 118: 9-15.
69. **Kekedy-Nagy, L., Sorensen K.D. and Ferapontova E.E.** Picomolar sensitive and SNP-selective "Off-On" hairpin genosensor based on structure-tunable redox indicator signals. *Biosens Bioelectron*, **2018**; 117: 444-449.
70. **Byrou, S., et al.** Fast Temperature-Gradient COLD PCR for the enrichment of the paternally inherited SNPs in cell free fetal DNA; an application to non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassaemia. *PLoS One*, **2018**; 13: e0200348.
71. **Rolim, T., Cancino J. and Zucolotto V.** A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension. *Biomed Microdevices*, **2015**; 17: 3.
72. **Sharma, S., et al.** Piezoelectric needle sensor reveals mechanical heterogeneity in human thyroid tissue lesions. *Sci Rep*, **2019**; 9: 9282.

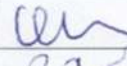
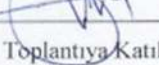
73. **Ueno, H.** A Piezoelectric Sensor Signal Analysis Method for Identifying Persons Groups. *Sensors (Basel)*, **2019**; 19:
74. **Gu, T., et al.** Absolute quasi-static calibration method of piezoelectric high-pressure sensor based on force sensor. *Rev Sci Instrum*, **2019**; 90: 055111.
75. **Fritz, J.** Cantilever biosensors. *analyst*, **2008**; 133: 855-863.
76. **Ai, C., et al.** Fabrication and Characteristic of a Double Piezoelectric Layer Acceleration Sensor Based on Li-Doped ZnO Thin Film. *Micromachines (Basel)*, **2019**; 10:
77. **Fras, L.J., et al.** Piezoelectric bimorph as a high-sensitivity viscosity resonant sensor to test the anisotropy of magnetorheological fluid. *Rev Sci Instrum*, **2018**; 89: 105-111.
78. **Rasheed, A., et al.** An Active Self-Driven Piezoelectric Sensor Enabling Real-Time Respiration Monitoring. *Sensors (Basel)*, **2019**; 19:
79. **Kweon S., et al.** Low-temperature sintering of (1-x)Pb(Zr0.53Ti0.47)O3-xBiYO3 ceramics with nano-powder for piezo. *Japanese Journal of Applied Physics*, **2019**; 58:138-146.
80. **Wu, Y., et al.** Self-Polarization of PVDF Film Triggered by Hydrophilic Treatment for Pyroelectric Sensor with Ultra-Low Piezoelectric Noise. *Nanoscale Res Lett*, **2019**; 14: 72.
81. **Yang, Z., et al.** A Simple Wireless Sensor Node System for Electricity Monitoring Applications: Design, Integration, and Testing with Different Piezoelectric Energy Harvesters. *Sensors (Basel)*, **2018**; 18:
82. **Li, Q., et al.** A Flow Velocity Measurement Method Based on a PVDF Piezoelectric Sensor. *Sensors (Basel)*, **2019**; 19:
83. **Song, K., et al.** Pneumatic actuator and flexible piezoelectric sensor for soft virtual reality glove system. *Sci Rep*, **2019**; 9: 8988.
84. **Kokbas, U., et al.** Detection of beta-thalassemia Cd 39 mutation by using piezoelectric biosensor for non-invasive prenatal diagnosis. *FEBS OPEN BIO*. **2018**; 48: 196-208.
85. **Miura, S., et al.** Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J Hum Genet*, **2006**; 51: 412-7.
86. **Li, S., et al.** Fabrication Technology and Characteristics Research of the Acceleration Sensor Based on Li-Doped ZnO Piezoelectric Thin Films. *Micromachines (Basel)*, **2018**; 9:
87. **Ozsoz, M., et al.** Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Anal Chem*, **2003**; 75: 2181-7.
88. **Abdelazim, I.A., et al.** Prenatal diagnosis of single umbilical artery complicated by intrauterine growth retardation and preterm labor: Case report. *J Family Med Prim Care*, **2019**; 8: 2151-2154.
89. **Biard, J.M., et al.** Antenatal diagnosis of cardio-facio-cutaneous syndrome: Prenatal characteristics and contribution of fetal facial dysmorphic signs in utero. About a case and review of literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2019**; 240: 232-241.
90. **Cohen, E.F., et al.** Prenatal diagnosis and perinatal management of a bilateral anterior congenital diaphragmatic hernia. *Lung India*, **2019**; 36: 361-363.
91. **Charafeddine, F., et al.** The first Fetal Echocardiography experience for Prenatal diagnosis of Congenital Heart Disease in Lebanon: Successes and challenges. *J Saudi Heart Assoc*, **2019**; 31: 125-129.
92. **Mahdavi, S., Karami F. and Sabbaghi S.** Non-invasive prenatal diagnosis of foetal gender through maternal circulation in first trimester of pregnancy. *J Obstet Gynaecol*, **2019**; 1-4.
93. **Rafi, I. and L. Chitty.** Cell-free fetal DNA and non-invasive prenatal diagnosis. *Br J Gen Pract*, **2009**; 59: e146-8.
94. **Chitty, L.S., et al.** Safe, accurate, prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and free fetal DNA. *Prenat Diagn*, **2013**; 33: 416-23.
95. **Bischoff, F.Z., et al.** Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*, **2002**; 8: 493-500.
96. **Gajic B., et al.** Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in Varroa destructor mites using ARMS and PCR-RFLP methods. *Springer*, **2016**; 70: 287-297.
97. **Uzun L., et al.** Cysteine functionalized poly(hydroxyethyl methacrylate) monolith for heavy metal removal. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2008**; 330: 161-167
98. **Risnes S., et al.** Scanning Electron Microscopy (SEM) Methods for Dental Enamel. *Odontogenesis*, **2019**; 22: 307-311.
99. **Nakomato K.** Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. *EKUAL*, **2006**; 4: 41-59.

100. **Qui P., et al.** Process Monitoring ROC Curve for Evaluating Dynamic Screening Methods. *Technometrics*, **2019**; 17: 416-429.
101. **Galina I.** FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*, **2000**; 53: 233-246.
102. **Bayden R.** The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. *Chemical Society Reviews*, **2016**; 7: 127-133.
103. **Andrew D., et al.** PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. *Scientific Reports*, **2019**; 209: 254-262.
104. **Mobini, S., et al.** Advances in ex vivo models and lab-on-a-chip devices for neural tissue engineering. *Biomaterials*, **2019**; 198: 146-166.
105. **Chan, C.Y., et al.** Dielectrophoretic deformation of breast cancer cells for lab on a chip applications. *Electrophoresis*, **2019**; 14: 442-449.
106. **Jacky F.C., et al.** Integrated Printed Microfluidic Biosensors. *Trends in Biotechnology*, **2019**; 4: 218-224.
107. **Agostini M., et al.** Full-SAW Microfluidics-Based Lab-on-a-Chip for Biosensing. *IEEE*, **2019**; 7: 901-909.
108. **Meysam T., et al.** Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators. *Advanced Materials*, **2019**; 8: 181-187.
109. **Guoxin R., et al.** Recent Developments in Nanosensors for Imaging Applications in Biological Systems. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2019**; 12: 109-128.
110. **Shiang F., et al.** Atomic electrostatic maps of 1D channels in 2D semiconductors using 4D scanning transmission electron microscopy. *Nature Communications*, **2019**; 10: 127-135.
111. **Stuart B.** Infrared Spectroscopy. *Chemical Technology*, **2015**; 7:193-202.
112. **Biliah K. Y.** Resonance, Tacoma Narrows bridge failure, and undergraduate physics. *American Journal of Physics*, **1991**; 59: 118-133.
113. **Byler D. and Susi H.,** Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, **2016**; 25: 469-487.
114. **Singh H., et al.,** Novel mode of contraception using polymeric hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, **2012**; 31: 103-112.
115. **Schönhoff M.** Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2003**; 8: 86-95.
116. **Tarun N., et al.** Protein functionalised self assembled monolayer based biosensor for colon cancer detection. *Talanta*, **2019**; 205: 118-124.
117. **Ye Y., et al.** Ultrasensitive electrochemical genosensor for detection of CaMV35S gene. *Talanta*, **2019**; 206: 209-217.
118. **Jiang X., et al.** Amperometric genosensor for culture independent bacterial count. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2019**; 299: 944-951.
119. **Dziak J.J., et al.** Sensitivity and Specificity of Information Criteria. *Biorxiv*, **2019**; 41: 304-316.
120. **Feriotto G., et al.** Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. *Laboratory Investigation*, **2004**; 8: 4796-803
121. **Minunni M., et al.** Detection of β -thalassemia by a DNA piezoelectric biosensor coupled with polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta*, **2003**; 481: 55-64.
122. **Feriotto G., et al.** Surface Plasmon Resonance and Biosensor Technology for Real-Time Molecular Diagnosis of β^{39} Thalassemia Mutation. *Molecular Diagnosis*, **2004**; 8:33-41.
123. **Hamidi-Asl E., et al.** A bimetallic nanocomposite modified genosensor for recognition and determination of thalassemia gene. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2016**; 98: 400-408.
123. **Ulianas A.,** A regenerable screen-printed DNA biosensor based on acrylic microsphere-gold nanoparticle composite for genetically modified soybean determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2014**; 190: 694-701.

**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Toplantı Sayısı		Tarih
62		3 Mart 2017

KARAR NO 39- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Levent Kayrın yönetiminde, Umüt Kökbaş tarafından yürütülmesi öngörülen, "Fetal Cell-Free DNA Tayinine Yönelik Genosensör Çalışması" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Bilgilendirme ve Rıza Olur Formu

Araştırmanın Yürütücüleri:

Prof. Dr. Levent KAYRIN

Doktora Öğrencisi Umut KÖKBAŞ

Prof. Dr. Abdullah Tuli ve Doktora Öğrencisi Umut KÖKBAŞ tarafından yürütülen “Fetal CellFree DNA tayinine yönelik Genosensör Çalışması” başlıklı Çukurova Üniversitesi Bireysel Araştırma Projesi tarafından desteklenen çalışmada siz katılımcı olarak yer alacaksınız.

Bu çalışma çerçevesinde vereceğiniz kanlarda kan fetal mutasyon tayini tasarladığımız genosensör ile belirlenecektir. Alınacak biyolojik materyal yukarıda bahsedilen amaçların dışında bir amaç için kullanılmayacaktır. Çalışma bilimsel bilgi birikimine katkı sağlamayı amaçlamakta olup, katılımcıya doğrudan bir yarar sağlamayacaktır. Elde edilen sonuçlar sadece bilimsel amaç için kullanılacak, kişisel bilgiler gizli tutulacaktır. Çalışmaya katılmama hakkınız ve istediğiniz zaman çalışmadan çekilme hakkınız bulunmaktadır.

Yukarıda, bana araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırma hakkında bana yeterli yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırma'ya rızamızla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Kişinin

Adı Soyadı :

İmzası :

Adresi :

Açıklamayı yapan araştırmacının

Adı Soyadı :

İmzası :

ÖZGEÇMİŞ

1986 Adana doğumlu olan Umut KÖKBAŞ, ilköğretim ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 2006 yılında Ege Üniversitesi. Fen Fakültesi Biyokimya bölümünde üniversite hayatına başladı. 2011 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı ve yine aynı yıl aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2014 yılında Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. 2014 yılının Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Doktora Programında öğrenimine başladı. Evli ve bir kız çocuğu sahibidir.