

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

KANDA DEMİR TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI

Ahmet İLHAN

**TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten DİKMEN**

ADANA-2020

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

KANDA DEMİR TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI

Ahmet İLHAN

**TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten DİKMEN**

Tez No:
ADANA-2020

KABUL ve ONAY

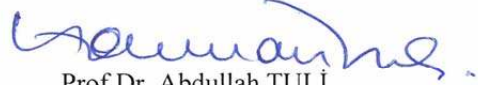
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“KANDA DEMİR TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 21 / 02 / 2020

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Nurten DİKMEN
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof Dr. Levent KAYRIN
Girne Üniversitesi
Üye


Prof Dr. Abdullah TULİ
Çukurova Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Serdar KARAKURT
Selçuk Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Güray KILINÇÇEKER
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / 2020 tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

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 aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 21/02/2020

Ahmet İLHAN

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyokimya
Tezin Konusu : Kanda Demir Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı
Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☐
Danışmanın Adı-Soyadı : Prof.Dr. Nurten DİKMEN

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 0532 747 0282
E-Posta : nrtn.dikmen@gmail.com

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 0505 766 7362
E-Posta : ahmetilhangenetik@gmail.com
Adresi : Belediye Evleri Mahallesi 84176 Sokak No:25 3.Blk. K.3
D.5

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

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her açıdan destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye, danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Levent KAYRIN'a ve sayın Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmam süresince her türlü desteği veren sayın Doç. Dr. Güray KILINÇÇEKER'e teşekkür ederim. Doktora eğitim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e, Prof. Dr. Tamer C. İNAL'a, Prof. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK'e ve Öğr. Gör. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında, büyük yardımlarını gördüğüm araştırma görevlileri Umut KÖKBAŞ, Kezban KARTLAŞMIŞ ile Fulden BOZKAYA'ya ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim elemanları ile personeline ayrıca teşekkürü borç bilirim. İstatistiksel analizlerde destek veren Selçuk Üniversitesi İstatistik Bölümü araştırma görevlisi Dr. Muslu Kazım KÖREZ'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarım sırasında yine çok büyük sabır ve yardımlarını gördüğüm, eşim Kevser İLHAN'a ve kızım Eylül Hatun İLHAN'a teşekkür ederim.

Ahmet İLHAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Demirin Fizyolojik İşlevleri	4
2.1.1. Hemoglobin	4
2.1.2. Miyoglobin	5
2.1.3. Transferrin	6
2.1.4. Ferritin	7
2.1.5. Sitokrom P450 Enzim Sistemleri	7
2.1.6. Miyeloperoksidaz	8
2.2. Demir Metabolizması	9
2.2.1. Demirin Emilimi	10
2.2.1.1. Non-hem Demirin Emilimi	11
2.2.1.2. Hem Demirinin Emilimi	11
2.2.2. Plazma Demirinin Hücreler Tarafından Alınması	12
2.2.3. Demir Metabolizmasının Regülasyonu	15
2.2.4. Demirin Depolanması	17
2.2.5. Hemoglobin yıkımı	18
2.2.6. Demir Toksisitesi	19
2.2.7. Demir Yüklenmesi	20
2.2.8. Demir Eksikliği Anemisi	21

2.3. Biyosensörlerin Temel Kuramları.....	23
2.3.1. Biyosensörler.....	23
2.3.2. Biyosensörlerin Tarihçesi.....	25
2.3.3. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu	26
2.3.3.1. Tanıma Elemanı (Biyoreseptörler)	28
2.3.3.2. Dönüştürücü (Transdüserler).....	28
2.3.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	29
2.3.5. Biyosensör Teknolojisinin Avantaj Ve Dezavantajları	29
2.3.6. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri.....	30
2.3.6.1. Kalibrasyon Gereksinimi.....	31
2.3.6.2. Yüksek Duyarlılık	31
2.3.6.3. Geniş Ölçüm Aralığı.....	32
2.3.6.4. Düşük Tayin Sınırı	32
2.3.6.5. Kararlılık.....	32
2.3.6.6. Tekrarlanabilirlik.....	33
2.3.6.7 Seçicilik	33
2.3.6.8. Hızlı Yanıt Zamanı	34
2.3.6.9. Hızlı Geriye Dönme Zamanı	35
2.3.6.10. Kullanım Ömrü.....	36
2.3.6.11. Basitlik ve Ucuzluk	36
2.3.6.12. Biyoyumluluk.....	36
2.3.6.13. Küçültülebilirlik ve Sterilize Edilebilirlik	37
2.3.7. Biyosensörlerin Performansını Etkileyebilecek Durumlar.....	37
2.3.8. Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	38
2.3.9. Voltametrik Teknikte Kullanılan Cihazlar	39
2.3.9.1. Çalışma Elektrodu	39
2.3.9.2. Referans Elektrot	40
2.3.9.3. Karşıt Elektrot	41
2.3.10. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri.....	41
2.3.10.1. Adsorpsiyon.....	41
2.3.10.2. Tutuklama.....	41
2.3.10.3. Çapraz Bağlama.....	42

2.3.10.4. Kovalent Bağlama	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM	43
3.1. Gereçler	43
3.1.1. Cihazlar	43
3.1.2. Kimyasallar	43
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	44
3.2. Örneklem.....	45
3.3. Yöntem.....	45
3.3.1. Kanda demir tayinine yönelik biyosensörün hazırlanması	45
3.3.1.1. Biyosensör temizliği.....	45
3.3.1.2. Biyosensörün hazırlanması.....	46
3.3.2. Kan Serumunda Demir Tayini İçin Geliştirilen Biyosensörün Ölçüm Prosedürü.....	47
3.3.3. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	49
3.3.3.1. pH Optimizasyonu.....	49
3.3.3.2. Enzim Derişimi Optimizasyonu	49
3.3.3.3. BSA Derişimi Optimizasyonu.....	50
3.3.3.4. Jelatin Derişimi Optimizasyonu	50
3.3.3.5. Glutaraldehit Derişiminin Optimizasyonu	50
3.3.3.6. Tampon Derişimi Optimizasyonu	51
3.3.3.7. H ₂ O ₂ Derişimi Optimizasyonu	51
3.3.3.8. UV Işık Süresi Optimizasyonu.....	51
3.3.3.9. Sıcaklık Optimizasyonu.....	52
3.3.3.10. Tarama Hızı Optimizasyonu.....	52
3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleme	52
3.3.5. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Verileri.....	53
3.3.6. Geliştirilen Demir Biyosensörünün Karakterizasyonu	53
3.3.6.1. Substrat Derişiminin Etkisi ve Çalışma Aralığının Belirlenmesi..	54
3.3.6.2. Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliği.....	54
3.3.6.3. Biyosensör Yanıtının Tekrarlanabilirliği.....	54
3.3.7. Kanda (İnsan serumunda) Demir Tayininlerinin Karşılaştırılması.....	54

4. BULGULAR	56
4.1. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	56
4.1.1. Çalışma Aralığının Belirlenmesi.....	56
4.1.2. Çalışma Tamponu ve Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	57
4.1.3 Optimum Enzim Derişiminin Belirlenmesi	59
4.1.4. Optimum BSA Derişiminin Belirlenmesi	61
4.1.5. Optimum Jelatin Derişiminin Belirlenmesi	62
4.1.6. Optimum Glutaraldehit Derişiminin Belirlenmesi.....	64
4.1.7. Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi	65
4.1.8. Optimum H ₂ O ₂ Derişiminin Belirlenmesi	67
4.1.9. Optimum UV Işık Süresinin Belirlenmesi	68
4.1.10. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	69
4.1.11. Optimum Tarama Hızı Değerinin Belirlenmesi.....	71
4.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi	72
4.3. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi	75
4.4. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular	78
4.4.1. Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliği	78
4.4.2. Biyosensör Yanıtlarının Tekrarlanabilirliği	80
4.4.3. Analiz Ölçüm Aralığı ve Sınırı	80
4.5. Kanda (Serumda) Demir Tayini.....	82
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	94
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Hemoglobin alt birimlerinin yapısı ve demir bağlanma bölgeleri ²³	5
Şekil 2.2. Miyogloblin molekülünün yapısı ²³	6
Şekil 2.3. A. Serum transferrinin yapısı (apo formda N lobu ve holo formda C lobu) B. Transferrinin N lobuna demir bağlaması ²⁵	6
Şekil 2.4. A. Demir depolama proteini olan ferritinin üç boyutlu yapısı. Ferritin küresel bir şekle sahiptir ve demir (kahverengi) kürenin içinde bir mineral olarak depolanır. B. Ferrihidrit mineralinin yapısı (Demir (III) iyonları kahverengi, oksijen (II) iyonları kırmızı ile gösterilmiştir) ²⁷	7
Şekil 2.5. Sitokrom P450 enziminin yapısı ²⁸	8
Şekil 2.6. A. Miyeloperoksidaz enziminin yapısı. B. Hem çekirdeğinin konumu ²⁹	9
Şekil 2.7. Vücutta demir emilimi ve metabolizması ³⁴	10
Şekil 2.8. Demiri farklı yollardan alan hücre tipleri ⁴³	13
Şekil 2.9. Demirin hücreler tarafından alınışı - Transferrin siklusu ⁴³	14
Şekil 2.10. Hepsidin moleküler yapısı. Peptid yapısı (gri), disülfid bağları (1-8, 2-4, 3-6 ve 5-7) (sarı), pozitif yüklü arginin ve lisin kalıntıları (mavi) ve negatif yüklü aspartik asit kalıntısı (kırmızı). ⁴⁶	15
Şekil 2.11. Hepsidin ekspresyonunun regülasyonu (BMP-6: Bone morphogenetic protein 6, BMPR: Bone morphogenetic protein receptor, HJV: Hemojuvelin, TfR2: Transferrin reseptörü 2, Tf-Fe ³⁺ : diferrik transferrin, TfR1: Transferrin reseptörü 1, IL-6: İnterlökin 6, IL-6R: İnterlökin 6 reseptörü.) ⁴⁸	17
Şekil 2.12. Hem grubunun yıkılarak demirin açığa çıkışı ⁵⁴	18
Şekil 2.13. (a) Analit, algılayıcı birim, transdüser ve ölçüm cihazı gibi bileşenleri olan biyosensörün şematik gösterimi (b) burnun bir sensöre benzetilmesi: olfactorius membran biyolojik algılayıcı, sinir hücresi transdüser, sinir lifi uyarıcı ve beyin ölçme bileşeni ⁶⁵	24
Şekil 2.14. Tipik bir biyosensör şeması ⁶⁷	25
Şekil 2.15. YSI 23A Glukoz Biyosensörü ⁷²	26
Şekil 2.16. Biyosensörlerin yapısı ⁷⁵	27
Şekil 2.17. Biyosensör bileşenleri ⁷³	28
Şekil 2.18. Biyosensörlerin tanıma bileşenleri ve transdüserlere göre sınıflandırılması ⁷⁸	29
Şekil 2.19. Bir biyosensör için çizilen kalibrasyon grafiği (Bu grafikte yer alan doğrusal cevap aralığı sembolle, tayin sınırının altında ve daha yüksek derişimlerde doğrusal olmayan aralık“●”sembolle	31
Şekil 2.20. Tekrarlanabilirlik grafiği örneği ⁸³	33
Şekil 2.21. Biyosensör cevabını etkileyen parametreler ⁶⁷	37

Şekil 2.22. Ag/AgCl elektrodun şematik gösterimi ⁹⁰	40
Şekil 2.23. Glutaraldehit ile enzimlerin amino gruplarının çapraz bağlanması ⁹⁴	42
Şekil 3.1. Biyosensör düzeneği	47
Şekil 3.2. Kan demiri biyosensörünün geliştirilmesinde izlenen basamakları gösteren şema.....	48
Şekil 4.1. Döngüsel voltammogram	57
Şekil 4.2. pH değişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.	58
Şekil 4.3. pH değişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.	59
Şekil 4.4. Enzim derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi	60
Şekil 4.5. Optimum enzim derişiminin bulunması amacıyla değişik enzim derişimlerinin biyosensör yanıt akımı üzerine etkisi	60
Şekil 4.6. BSA miktarının biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi	61
Şekil 4.7. BSA miktarındaki derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.	62
Şekil 4.8. Jelatin derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi	63
Şekil 4.9. Jelatin derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.10. Glutaraldehit derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep Gösterimi.....	64
Şekil 4.11. Glutaraldehit derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.12. Tampon derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi	66
Şekil 4.13. Optimum tampon derişiminin bulunması amacıyla değişik tampon derişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.	66
Şekil 4.14. H ₂ O ₂ derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.	67
Şekil 4.15. Geliştirilen biyosensör için H ₂ O ₂ derişimi eğrisi.	67
Şekil 4.16. UV ışık etkisi süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.	68
Şekil 4.17. Geliştirilen biyosensör için ultraviyole ışık etki süresi eğrisi.....	69
Şekil 4.18. Sıcaklığın biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.	70
Şekil 4.19. Biyosensörün aktivitesine sıcaklığın etkisi.	70
Şekil 4.20. Biyosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltammogramlar	71
Şekil 4.21. Biyosensörün aktivitesine tarama hızının etkisi.	72
Şekil 4.22. Tek kullanımlık altın elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü	73
Şekil 4.23. Tek kullanımlık Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine immobilize edilmiş HRP, BSA ve jelatinden oluşan biyoaktif tabakanın SEM görüntüsü (40 µm).	73
Şekil 4.24. HRP, BSA ve jelatinden oluşan biyoaktif tabakanın SEM görüntüsü (5 µm).....	74
Şekil 4.25. HRP, BSA, jelatin ve glutaraldehitten oluşan biyoaktif tabakanın SEM görüntüsü (5 µm).....	74
Şekil 4.26. HRP enzimin FTIR grafiği.....	76
Şekil 4.27. HRP-BSA-jelatin karışımının FTIR grafiği.	76

Şekil 4.28. HRP-BSA-jelatin-glutaraldehit karışımının FTIR grafiği.....	77
Şekil 4.29. HRP, HRP-BSA-jelatin karışımı ve HRP-BSA-jelatin-glutaraldehit karışımına ait FTIR grafiklerinin birlikte görüntüsü.....	78
Şekil 4.30. Biyosensörün tekrarlanabilirlik ölçümlerini gösteren döngüsel voltammogramlar.....	79
Şekil 4.31. Biyosensör aktivitesine ölçüm sayısının etkisi.....	79
Şekil 4.32. Geliştirilen demir biyosensörünün yanıt akımına substrat derişiminin etkisi.....	81
Şekil 4.33. Geliştirilen ksn demiri biyosensörü ile farklı ferröz sülfat derişim aralıklarında elde edilen kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 4.34. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarını karşılaştıran Bland-Altman grafiği	83
Şekil 4.35. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 2.1. Demir ve reaktif oksijen türleri arasındaki reaksiyonlar ⁵⁷	19
Çizelge 2.2. Herediter demir yüklenmesi hastalıkları ²⁴	20
Çizelge 2.3. Sekonder demir yüklenmesi hastalıkları. ⁵⁰	21
Çizelge 2.4. Demir eksikliğinin gelişim evreleri ⁶⁰	23
Çizelge 3.1. Bazı FTIR grup frekansları ⁹⁸	53
Çizelge 4.1. Biyosensör yanıtlarının tekrarlanabilirlik değerlerini gösteren çizelge	80
Çizelge 4.2. Serum numunelerinde hesaplanan demir miktarları.	82
Çizelge 4.3. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarına ilişkin tanımlayıcı istatistikler	83
Çizelge 4.4. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarını karşılaştıran Sperman rho tablosu.	84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Sığır Serum Albumin
BSS	: Bağlı Standart Sapma
C	: Analit Derişimi
ES	: Enzim Substrat Kompleksi
E_{ind}	: İndirgenmiş Enzim
E_{yük}	: Yükseltgenmiş Enzim
GA	: Glutaraldehit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
K_m	: Michaelis Menten Sabiti
LS	: Lineer Sweep Yöntemi
mM	: Mili Molar
nm	: Nanometre
QCM	: Kuartz Kristal Mikrobalans
SS	: Standart Sapma
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
VK	: Varyasyon Katsayısı
X	: Ortalama Değer
Tf	: Transferrin
IRP	: Iron Regulatory Protein
IRE	: Iron Responsive Element
DMT1	: Divalent Metal Transporter 1
HRP	: Yaban Turpu Hidrojen Peroksidaz Enzimi
Cp	: Seruloplazmin

ÖZET

Kanda Demir Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı

Demir bir çok proteinin ve enzimin yapısında bulunur, dokulara oksijen taşınmasında görev almakla birlikte, hücrelerin gelişmesinde ve farklılaşmasında kilit rol oynar, gerekli önlem alınıp tedavi edilmez ise ciddi sorunlara yol açabilir. Demir eksikliği WHO verilerine göre dünya nüfusunun %30'unu etkilemektedir. Demir fazlalığı demir eksikliği gibi tehlikeli bir tablodur. Bu nedenle kan/serum demir seviyesinin ölçümü tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır.

Vücuttaki demir düzeyi ile ilgili ortaya çıkan hastalıkları teşhis etmek için, gerekli anahtar parametrelerin izlenmesinde sürekli, hızlı ve duyarlı sistemler tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. Biyolojik bir tanıma elemanı ve uygun bir dönüştürücünün birleşmesinden meydana gelen biyosensörler; demir düzeyini saptamak için ihtiyaç duyulan sistemleri karşılayan araçlar arasındadır.

Bu çalışmada serum demir düzeyinin ölçümü için, biyoaktif tabakaya immobilize edilmiş Yaban Turpu Peroksidaz (HRP) enziminden yararlanılarak voltametrik bir biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Biyoaktif tabaka, altın elektrot üzerine HRP enzimi, Sığır Serum Albumini (BSA), jelatin ve glutaraldehit'in UV ışık yardımıyla immobilize edilmesiyle hazırlanmıştır.

Serum içerisindeki ferrik demirin (Fe^{3+}) transferrinden ayrılmasını sağlamak için, pH'sı 5,0 olan asetat tamponu tercih edildi. Daha sonra ferrik demiri (Fe^{3+}), ferröz demir (Fe^{2+}) haline indirgemek için hidroksilamin hidroklorür kullanıldı. İndirgenme sonucu oluşan ferröz demir (Fe^{2+}) HRP enziminin katalizlediği tepkime ile ölçüldü.

Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda sığır BSA 30 mg, glutaraldehit %3 ve jelatin miktarı 67,5 mg olarak bulundu. Optimum çalışma koşullarının belirlenmesinde, pH 5,0 ve 200 mM asetat tamponu derişiminde H_2O_2 miktarı 50 mg/dL olarak saptanırken, tarama hızı 0,06 V/s ve sıcaklık 40 °C olarak belirlendi.

Karakterizasyon çalışmalarında 25-200 µg/dL aralığında ferrik (Fe^{3+}) demir için doğrusal sonuçların alındığı belirlendi. Tekrarlanabilirlik için 200 µg/dL ferrik (Fe^{3+}) demir derişimi kullanılarak yapılan çalışmalarda (n=10) standart sapma (S.S) = ±14,35 ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 7,296 olarak bulundu. Daha sonra hazırlanan enzim elektrotla biyolojik sıvıda (kan/serum) demir tayini yapıldı ve karşılaştırma çalışmasında r: 0,865 ve P<0,05 pozitif korelasyon gözlemlendi.

Bu sonuçlar geliştirilen biyosensörün serum demir analizlerinde güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koydu.

Anahtar Kelimeler: Ferrik demir, peroksidaz, hidroksilamin hidroklorür, serum.

ABSTRACT

Design of a New Biosensor for the Determination of Iron in Blood

Iron is found in the structure of many proteins and enzymes. Iron is involved in the transport of oxygen to the tissues, however, it plays a key role in the development and differentiation of cells. The amount of iron deficiency affects 30% of the world population according to WHO data. Iron excess is a dangerous clinical disease as well as iron deficiency. Thus, the measurement of blood iron level is of great importance in terms of medicine.

To diagnose diseases related to iron levels in the body, continuous, rapid and sensitive systems are essential for the monitoring of key parameters. Biosensors, which consist of a combination of a biological recognition element and a suitable transducer, are among the tools that provide these systems.

This study aims to develop a voltammetric biosensor by using hydrogen peroxidase (HRP) enzyme immobilized to the bioactive layer for the measurement of serum iron amount. The bioactive layer was prepared by immobilizing HRP, Bovine Serum albumin (BSA), gelatin and glutaraldehyde on the gold electrode with UV light.

To ensure the separation of Fe^{3+} in the serum from the transferrin, acetate buffer having a pH of 5.0 was preferred. Hydroxylamine hydrochloride was then used to reduce the Fe^{3+} to Fe^{2+} . Fe^{2+} which is produced as a result of the reduction was measured by the reaction of hydrogen peroxidase enzyme.

In the optimization of the bioactive layer, the amount of BSA was 30 mg, the percentage of glutaraldehyde was 3% and the amount of gelatin was 67.5 mg. In determining the optimum working conditions, the concentration of H_2O_2 at the concentration of pH 5.0 and 200 mM acetate buffer was determined as 50 mg/dL, while the scanning rate was determined as 0.06 V/s and the temperature was 40 °C.

In the characterization studies, it was determined that linear results were obtained for ferric (Fe^{3+}) iron in the range of 25-200 $\mu\text{g/dL}$. In studies using ferric (Fe^{3+}) iron concentration of 200 $\mu\text{g/dL}$ for reproducibility ($n=10$), standard deviation (S.D) = ± 14.35 and % coefficient of variation (C.V) = 7.296. Determination of iron was carried out in biological fluid (in blood) by enzyme electrode. Then, iron was determined in a biological fluid (blood) by enzyme electrode and r : 0.865 and $P < 0.05$ positive correlation were observed in the comparison study.

These results showed that the developed biosensor was a reliable method in serum iron analysis.

Key words: Ferric iron, peroxidase, hydroxylamine hydrochloride, serum.

1. GİRİŞ

Demir organizmada esansiyel bir element olup temel metabolik süreçler için gereklidir¹. Enerji metabolizmasında görev alan birçok protein ve enzimde kofaktör olarak işlev görür². Bu işlevlerini elektron alıp verme yeteneği ile gerçekleştirir. Ayrıca oksijen metabolizmasında da önemlidir. Demir vücutta iki valans durumu olan ferröz (Fe^{2+}) veya ferrik (Fe^{3+}) şekilde bulunur ve bu değişim vücutta emilim, taşınma, depolanma fonksiyonları sırasında karşımıza çıkar. Demirin yükseltgenme indirgenme potansiyeli sağlıklı bir metabolizma için gerekliken, demir fazlalığı durumlarında artan serbest demir hücreler için zararlı olan serbest oksijen türevlerinin oluşmasına neden olur. Bu nedenle vücut demir dengesi; hücresel ve sistemik düzenleme ile sıkı şekilde denetlenmektedir. Bu mekanizmalarda çeşitli nedenlerle oluşacak dengesizlikler demir metabolizmasının bozukluklarına yol açar^{3,4}.

Kanda demir bulunduğu düşüncesi 1713'de Lemery ve Geoffroy tarafından ortaya koyulmuştur⁵. Menghini ise 1746'da kandaki demirin eritrositlerde yerleştiğini belirleyen ilk kişidir. Menghini ve arkadaşları memelilerden, kuşlardan, balıklardan ve insanlardan kan örneklerini inceleyerek çeşitli bileşenleri ayırdıktan sonra kurutup yakarak kalan kısımlarda mikroskobun altında manyetik uçlu basit bir bıçak kullanarak demir varlığını tanımladılar⁶.

Fonte ve Thivolle 1925'de kan serumunda demir olduğunu gösterdiler, atlardaki serum demir konsantrasyonunu belirlediler, demir eksikliği durumlarında azaldığını ve dolaşım sisteminde taşındığını ileri sürdüler. O zamana kadar, serumda gösterilen az miktardaki demirin hemoglobinden kaynaklandığına ya da hafif hemolizden kaynaklandığına inanılıyordu. Bu gelişmelerden yaklaşık 20 yıl sonra aynı araştırmacılar transferrinin taşıyıcı bir protein olduğunu tanımladılar ve düşük pH'da demirin transferrinden ayrıldığı gerçeğini ortaya koydular⁷.

İlk olarak 1937'de Laufberger tarafından keşfedilen primer demir depolama proteini olan ferritin, at dalağından izole edildi⁸. 1938'de McCance ve Widdowson vücuttan demir kaybının çok az olduğunu ^{59}Fe ve ^{55}Fe kullanılarak yapılan demir dengesi değerlendirmeleri ile teyit ettiler⁹.

1969-1971 yılları arasında Evan Morgan ve arkadaşları, transferrinin hücreler tarafından alınmasına ilişkin ilk kanıtı sağladılar. Bu keşif yalnızca demir

metabolizması için değil, bir bütün olarak hücre biyolojisi için de bir “paradigma kayması” nı temsil etmektedir¹⁰.

Dünyadaki araştırmaların en önemli amacı yaşam kalitesini geliştirmektir. Bütün bu alanlarda kontrol için gerekli anahtar parametrelerin izlenmesinde sürekli, hızlı ve duyarlı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Biyolojik bir tanıma elemanı ve uygun bir dönüştürücünün birleşmesinden meydana gelen biyosensörler; ihtiyaç duyulan bu sistemleri karşılayan araçlardır.

Son yirmi beş yılda enzimlerin biyolojik kapasitesi hakkında bilginin artması yeni ürünlerin doğmasına neden olmuştur. Biyosensörler, geleneksel analitik tekniklere alternatif en güçlü ürünlerdir. Bu teknoloji son yıllarda özellikle biyomedikal alanında aygıtların üretilmesi nedeniyle oldukça gelişme kaydetmiştir. Bu gelişmiş teknoloji çevre, tarım ve gıda gibi diğer sektörlerle de transfer edilmiştir. Biyosensörler gıda endüstrisinde gıda kalitesini ölçmek için hızlı ve ekonomik olmasının yanında, gıda güvenliğinin kontrolünü de sağlamaktadır¹¹.

Biyosensörlerin tarihsel gelişimine göz atıldığında, öncelikle enzim sensörlerinin kullanıldığı dikkat çekmektedir. Ayrıca biyosensörlerin kullanım alanları incelendiğinde; araştırma ve endüstriyel uygulamalarda değişik biyosensör türlerinde enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğünün olduğu göze çarpmaktadır¹². Elektrokimyasal temele dayalı olanlar, özellikle amperometrik biyosensörler en fazla çalışılan enzim biyosensörleridir¹³. Bu gelişimin sağlanmasında en önemli faktör, biyomoleküllerin incelenmesinde doğada binlerce enzimin saptanması, izolasyonu ve kullanılmasıdır¹².

Biyosensörler ilk kez L.C. Clark’ın 1950’li yıllarda Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında hastanın kanındaki O₂ miktarını bir elektrot yardımıyla takibi sonucu başladı. Clark ve Lyons 1962 yılında kanın glukoz düzeyini, oksijen elektroduna Glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek saptamayı başardılar¹⁴.

Biyosensör çalışmalarında, glukoz oksidaz enzimi ile beraber yaban turpu peroksidazı (HRP) en sık kullanılan enzimdir¹⁵. Biyolojik ortamda substratların ürünlere dönüştürülmesi protein yapısındaki güçlü katalizörler olan enzimlerle başarılır. Redoks enzimleri olarak tanımlanan enzimler, elektron alınan ve verilen tepkimeleri katalize ederler. Böylece substrat, antijen-antikor reaksiyonuna benzer şekilde enzimin katalitik

bölgesi tarafından tanınır. Bu tür özgün bağlayıcı katalitik bölgeye sahip enzimler, elektronların tespit edildiği enzimatik biyosensörlerde kullanılırlar¹⁶.

Sağlık sektöründe, hastalık ve biyolojik madde/molekül algılanması, izlenmesi ve tanımlanmasında güvenilir, hızlı ve düşük maliyetli sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Serumda demir tayini ise başta anemiler olmak üzere çeşitli hastalıkların teşhisi, taraması ve takibinde kullanılmaktadır.

Demir tayini, kolorimetrik ve atomik absorpsiyon spektroskopisi (A.A.S.) gibi yöntemlerle yapılmasına rağmen, daha ucuz, hızlı ve kolay tayin olanağı sağlayan serum ya da kanda demir tayini için yeni biyosensörlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada insan serumunda Fe^{3+} 'nın nicel tespiti için kısa sürede ve uygun maliyette bir biyosensör tasarlamayı, karakterizasyon ve güvenilirlik testleri ile kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demirin Fizyolojik İşlevleri

Organizmada demir birçok önemli işlevi yerine getirir. Öncelikle hemoglobinin yapısına girerek akciğerden dokulara oksijen transferinde, birçok önemli protein ve enzimin yapısında görev alır.

Vücuttaki toplam demir erişkin bir erkekte yaklaşık 3500 mg'dır (50 mg/kg). Vücuttaki demirin çoğu, hemoglobin yapısı içerisinde yer alır (%65-70; 2300 mg). Yaklaşık %10'u (350 mg) kas lifleri içinde (miyogloblin) yer almaktadır. Ayrıca %20-30'luk kısmı diğer dokularda; karaciğerde (yaklaşık 200 mg), retiküloendotelial sistem makrofajlarında (yaklaşık 500 mg), kemik iliğinde (yaklaşık 150 mg) ve özellikle enzimler ve sitokromlarda dağılmıştır¹⁷.

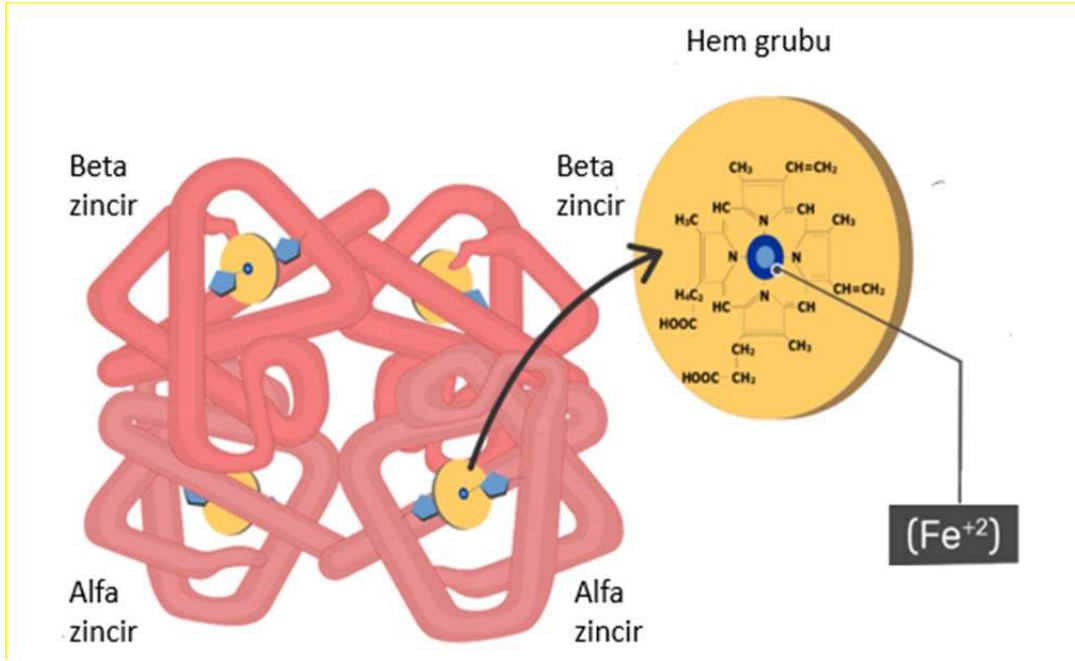
2.1.1. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) molekülü, eritrositlerin içinde yer almakta ve oksijenin taşınmasında görev yapmaktadır. Hemoglobin aracılığıyla oksijen akciğerlerden dokulara iletilirken karbondioksit ve protonları ise dokulardan akciğere taşımaktadır¹⁸.

Hemoglobin molekülü, eritrositte çözülmüş proteinlerin %95'ini oluştururken, tüm kan proteinlerinin yaklaşık 2/3'ünü teşkil etmektedir. Kanda hemoglobin konsantrasyonu erkeklerde ortalama 15 g/dL, kadınlarda ise 13 g/dL'dir¹⁹. Hemoglobinin moleküler ağırlığı 64,5 kDa' dur²⁰.

Hemoglobin, her biri içinde gömülü durumda hem grubu içeren ve globin olarak tanımlanan dört alt protein birimden oluşur. Yetişkin hemoglobininde (HbA), bu alt birimler iki tane özdeş alfa ve iki tane beta globin olarak tanımlanır²¹.

Hem grubu, globin peptitleri içerisinde yer alan hidrofobik bir cep bölgesinde yer alır. Demir atomu, her bir globin içerisinde bulunan hem çekirdeğinde kare-düzlemsel-koordinasyon kompleksini (square planar coordination complex) oluşturur²² (Şekil 2.1).

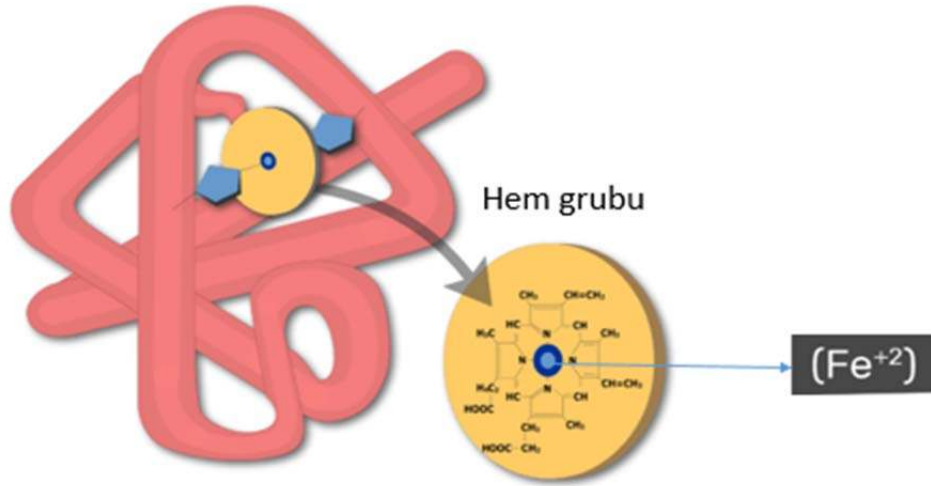


Şekil 2.1. Hemoglobin alt birimlerinin yapısı ve demir bağlanma bölgeleri²³.

2.1.2. Miyoglobin

Miyoglobin, düşük mol kütesine sahip (17,8 kDa) hemen hemen bütün memelilerde, başlıca kas dokusunda bulunan oksijen bağlayan bir proteindir. Miyoglobin, kas hücresi sitoplazmasında oksijeni depolar, mitokondrilerde oksijen ihtiyacı olduğunda oksijen aktarımını sağlar. Miyoglobin bir molekül hem, bir atom demir içeren 154 amino asitten oluşan tek bir polipeptit zinciridir (Şekil 2.2).

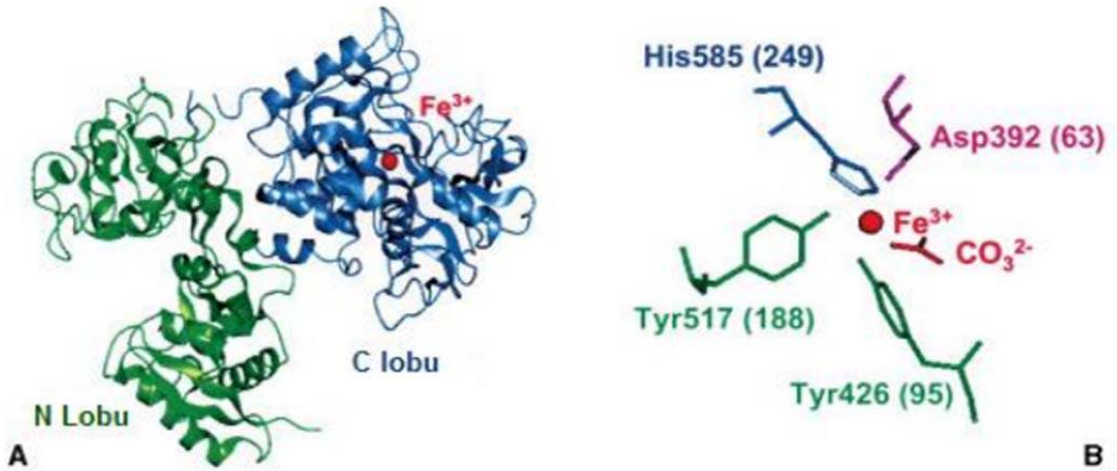
Hem grubu hemoglobin molekülünde olduğu gibi Fe^{2+} durumundaki tek bir demir atomunun bağlandığı halkalı heterosiklik bir yapıdır. Demir atomu, altı koordinasyon bağına sahiptir. Azot atomları (elektron verme özelliğine sahiptir) hem molekülündeki demirin Fe^{3+} duruma dönüşmesini önlemeye yardım eder. Fe^{2+} durumundaki demir, oksijeni geri dönüşümlü olarak bağlar, Fe^{3+} durumundaki demir oksijeni bağlayamaz²⁴.



Şekil 2.2. Miyoglobin molekülünün yapısı²³.

2.1.3. Transferrin

Plazmada ferrik demir taşınmasından sorumlu olan transferrin karaciğerde sentezlenir ve dolaşıma salgılanır. Yapısında 679 aminoasit bulunduran, yaklaşık 80 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Transferrin iki özdeş lobdan oluşur (Şekil 2.3). Normal bir plazmada, transferrinin toplam demir bağlama kapasitesinin yaklaşık %30'u demir bağlıdır²⁴⁻²⁵.

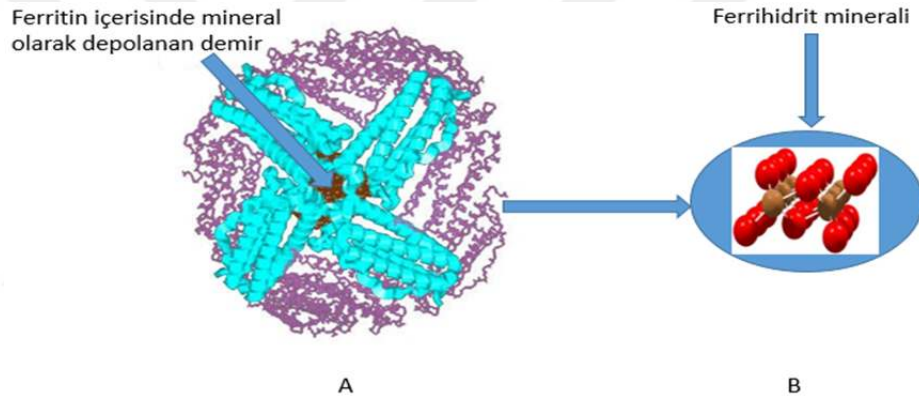


Şekil 2.3. A. Serum transferrinin yapısı (apo formda N lobu ve holo formda C lobu) B. Transferrinin N lobuna demir bağlaması²⁵.

2.1.4. Ferritin

Ferritin, demiri depolama ve işlev dışı demiri toksik olmayan halde tutma görevi olan bir proteindir. Ferritin molekülünün yapısı şekil 2.4’de görülmektedir.

Vücuttaki tüm hücrelerde ferritin bulunabilir. Ferritin dalak, karaciğer ve kemik iliğinde yüksek miktardadır. Yaklaşık 4500 demir atomu içeren bir ferritin molekülü, suda çözünebilir bir molekül olup ferrik hidroksifosfat yapısında bir çekirdek ve onun etrafını saran apoferritin kısımdan oluşur. Apoferritin kabuğun molekül ağırlığı yaklaşık 450 kDa’ dur ve her birinin molekül ağırlığı yaklaşık 18,5 kDa olan, 24 alt üniteden oluşmuştur. Ferritin öncelikle apoferritin olarak Fe^{2+} ’yi alır ve oksitler, Fe^{3+} ’ün çekirdekte depolanması sağlanır. Gerekğinde Fe^{3+} ’ün Fe^{2+} ’ye indirgenmesi ile demir salınımını gerçekleştirdiği için demir depo proteini olarak özgün niteliklere sahiptir²⁶⁻²⁷.

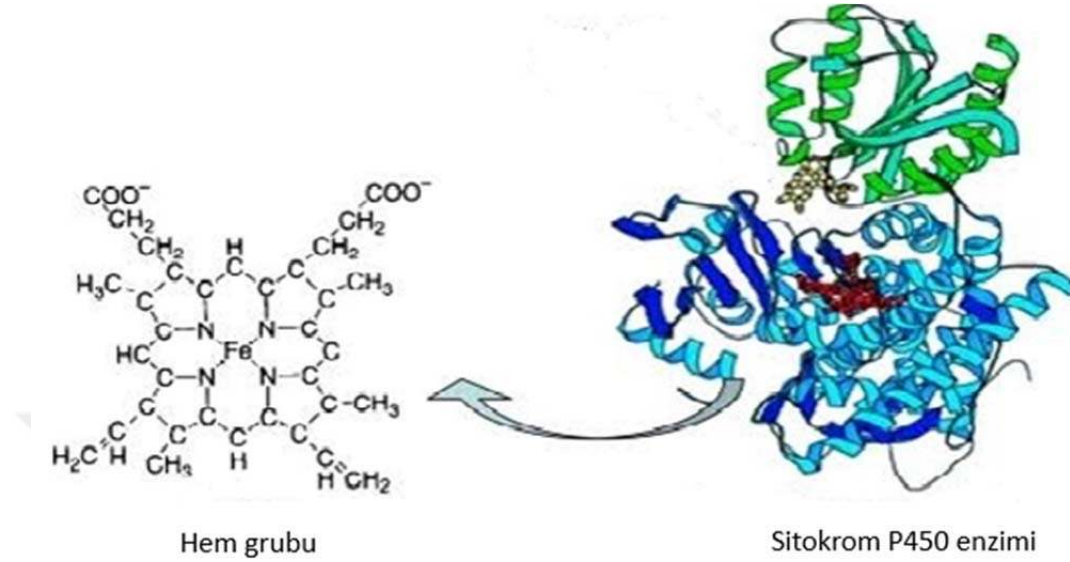


Şekil 2.4. A. Demir depolama proteini olan ferritinin üç boyutlu yapısı. Ferritin küresel bir şekle sahiptir ve demir (kahverengi) kürenin içinde bir mineral olarak depolanır. B. Ferrihidrit mineralinin yapısı (Demir (III) iyonları kahverengi, oksijen (II) iyonları kırmızı ile gösterilmiştir)²⁷.

2.1.5. Sitokrom P450 Enzim Sistemleri

Sitokrom P450 (CYP450) enzimleri, 400-530 amino asitten oluşan proteinlerdir (Şekil 2.5). CYP450 monooksijenaz enzim sistemleri, matüre eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde bulunan hem-protein ailesidir. Bu enzimler, yapısal olarak farklı bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederler. Endojen sentezlenen birçok biyomolekül, CYP450 enzimlerinin substratı durumundadır. Bu bileşikler: prostaglandin ve lökotrienler, yağ asitleri, steroidlerdir; ayrıca CYP450 enzimleri yiyecek, katkı maddeleri ve ilaçlar yanında besinleri, enjeksiyonla, havadan

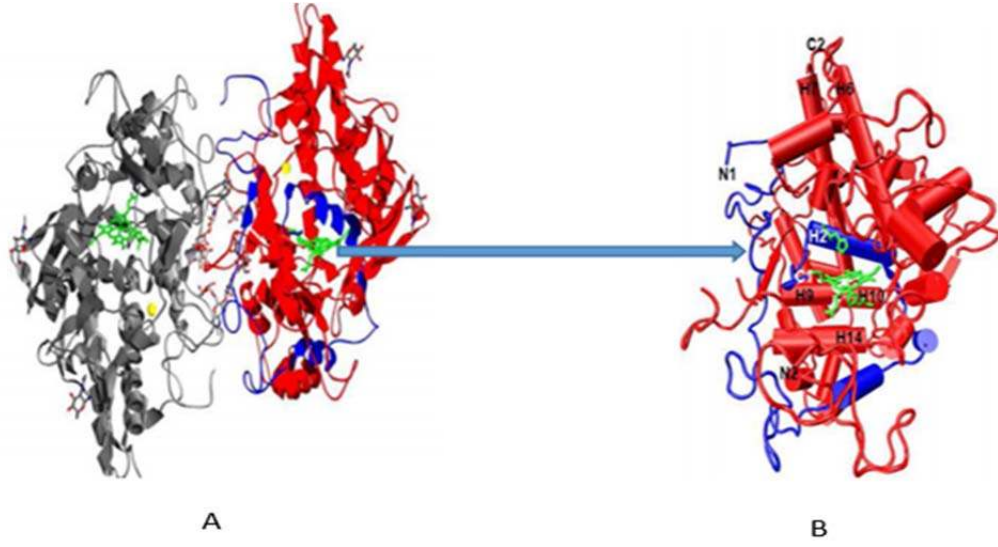
inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerin hidroksilasyonunu katalizler²⁸.



Şekil 2.5. Sitokrom P450 enziminin yapısı²⁸.

2.1.6. Miyeloperoksidaz

İnsan miyeloperoksidazı (MPO) iki ağır ve iki hafif peptit yapıdan oluşan 140 kDa moleküler ağırlıkta bir hemoproteindir. Her MPO molekülü katalitik reaksiyonda temel rol oynayan iki prostetik porfirin grubu içerir. Miyeloperoksidaz nötrofillerin primer granüllerinde depo edilir (Şekil 2.6). Nötrofillerin bakterisit etkisini göstermesi, MPO'nun güçlü bir oksidan molekül olan hipokloröz asit (HOCl) üretimini katalizleme kapasitesinden ileri gelir. Çeşitli inflamatuvar durumlarda MPO hücre dışına salındığından, plazmada ölçümü nötrofil aktivitesi için bir gösterge olarak kullanılabilir²⁹.



Şekil 2.6. A. Miyeloperoksidaz enziminin yapısı. B. Hem çekirdeğinin konumu²⁹.

2.2. Demir Metabolizması

Diyetle alınan demir ancak dökülen intestinal mukoza hücreleri ve menstruasyon gibi kan kayıplarıyla oluşan bazal demir kaybını kompanse edebilir. Eritropoez ve fizyolojik süreçler için gerekli olan demirin %90-95'i makrofajlardaki demir döngüsüyle sağlanır³⁰⁻³¹. Demir; gıdalarda ferrik hidroksit, ferrik protein ve hem-protein kompleksleri halinde bulunur. Demirin miktarı ve bağırsaktan emilim oranı gıdadan gıdaya değişkenlik gösterir. Et, özellikle de karaciğer; sebze, yumurta ve süt ürünlerine göre demir kaynağı açısından çok daha zengindir. Günlük alınan demirin normalde %5-10'luk kısmı emilirken gebelik, demir eksikliği anemisi gibi durumlarda bu oran %20-30'a kadar çıkabilir. Fakat bu durumlarda dahi diyetteki demirin büyük bir kısmı emilemez²⁴.

Vücuttaki miktarı, intestinal emilim ile düzenlenen bu elementin fazlası toksiktir. Aşırı miktarda demir birikimi olan hastalarda, kanamalar ve gastrointestinal sistem epitel hücrelerinin dökülmesiyle oluşan demir kaybından başka organizmada demir atılımını sağlayacak farklı bir mekanizma yoktur¹⁷.

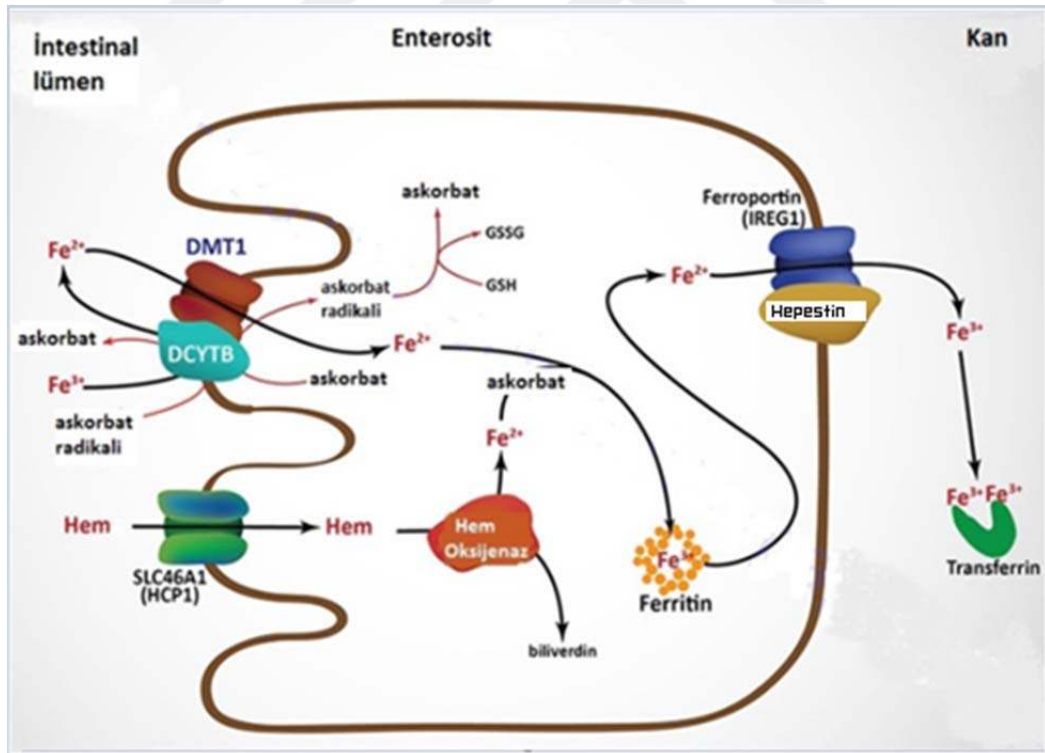
Demir, insan vücudunda daima iki oksidasyon durumu olan Fe^{3+} veya Fe^{2+} şekilde bulunur. Demirin bu elektron değişimi (redoks aktivitesi) bir taraftan gerekli ve yararlı olurken, diğer taraftan demir fazlalığı durumlarında oluşan serbest demirin prooksidan özellik göstermesiyle, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Antioksidanlar tarafından yeterince detoksifiye edilemeyen serbest oksijen

radikalleri, özellikle de hidroksil radikali hücresel elemanlar için oldukça zararlı ve toksiktir (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları). Bunu önlemek için, vücutta demir hiçbir zaman serbest bırakılmamalıdır³².

Proteinden zengin besinler özellikle sırasıyla sakatatlar, karaciğer ve dalak, et hem-demirinden zengin besinlerdir, bu demir formunun emilimi yüksektir. Etlerden başka iyi pişmiş olan kurubaklagiller, soya fasulyesi, yumurta, kuru meyveler (özellikle kuru üzüm, kuru kayısı), pekmez, yeşil sebzeler (ıspanak), fındık, fıstık, susam ve tahin gibi yiyecekler bol miktarda demir içerir³³.

2.2.1. Demirin Emilimi

Diyet demiri çoğunlukla duodenumdan ve jejunumun proksimal kesiminden emilir. Et kaynaklı hem-demiri ile et dışı gıdalardan alınan inorganik demirin emilimi birbirinden farklıdır (Şekil 2.7). Bu nedenle hem demiri ağırlıklı batı diyetiyle beslenen Kuzey Amerika ve Avrupa toplumlarında demir eksikliği az görülür³⁴.



Şekil 2.7. Vücutta demir emilimi ve metabolizması³⁴.

2.2.1.1. Non-hem Demirin Emilimi

Non-hem demirin emilim sürecinde; demirin ferröz duruma indirgenmesi, apikal alım, hücre içi depolama ya da bazolateral salıverme olmak üzere çeşitli basamaklar yer alır³⁵. Diyetteki hem dışı demir Fe^{3+} formdadır, emilmek için öncelikle duodenal sitokrom B (DCYTB) olarak tanımlanan trans membranel ferriredüktaz ve intrasellüler vitamin C tarafından kolaylaştırılan bir tepkime ile Fe^{2+} forma dönüştürülmelidir. Ferröz demir enterositin apikal membranında yer alan divalent metal transporter (DMT-1) ile hücre içine alınır³¹.

Demir enterosite girdikten sonra iki yol izleyebilir; ya hücre içinde kullanılmak üzere ferritin olarak depolanır. Bu form kullanılmazsa enterositin yaşlanıp dökülmesiyle lümeniden kaybedilir, ya da bazolateral membranda bulunan ferroportin isimli protein aracılığıyla plazmaya aktarılır^{30,34,36}. Retiküloendotelyal sistem makrofajlarında, hepatositlerde ve plasental sinsityotrofoblastlarda da bulunan ferroportin vücuttaki hücre içi demirin hücre dışına aktarılmasını sağlayan tek proteindir. Bu sırada ferröz formda olan demir öncelikle yine membran bağlı hefestin proteini ile ferrik forma dönüştürülüp plazmada transferrine bağlanması sağlanır³⁷.

Vitamin C, fruktoz, sitrat ve aminoasitler ile non-hem demirin absorpsiyonu artar. Tetrasiklin, proton pompa inhibitörleri, fitatlar (yüksek lifli diyet), kalsiyum, fosfat, tanenler, oksalat ve fenolik bileşikler (çay, kahve) ise non-hem demirinin absorpsiyonunu engeller. *Helicobakter pylori* enfeksiyonunun yaptığı gastrik atrofinin H^+ iyonu salgısı azalmasına bağlı olarak, demir eksikliği anemisine yol açabildiği bilinmektedir³⁸.

2.2.1.2. Hem Demirinin Emilimi

Hayvansal ürünlerde bulunan hemoglobin molekülü, barsakta intestinal enzimlerle hem ve globinlere ayrılmakta, globin yıkım ürünleri hem ve inorganik demiri çözünür halde tutarak absorpsiyonu kolaylaştırmaktadır. Hem demirinin emilimi için, duodenal düşük pH ve emilimi kolaylaştıran askorbik asit, sitrik asit gibi faktörlere gereksinim yoktur. Besinlerde bulunan demir bağlayıcılardan da etkilenmez.

Hem, duodenal enterosite 'hem taşıyıcı protein 1' denilen özel bir taşıyıcı ile girer. Hem enterosit içine girdiğinde, hem oksijenaz tarafından Fe^{2+} molekülü açığa çıkarılır. İntestinal epitelyum hücresine giren çoğu Fe^{2+} , ferroportin-1 tarafından

bazolateral membrandan salınıp hefestin tarafından Fe^{3+} 'e çevrildikten sonra plazmada transferine (Tf) bağlanırlar³⁹.

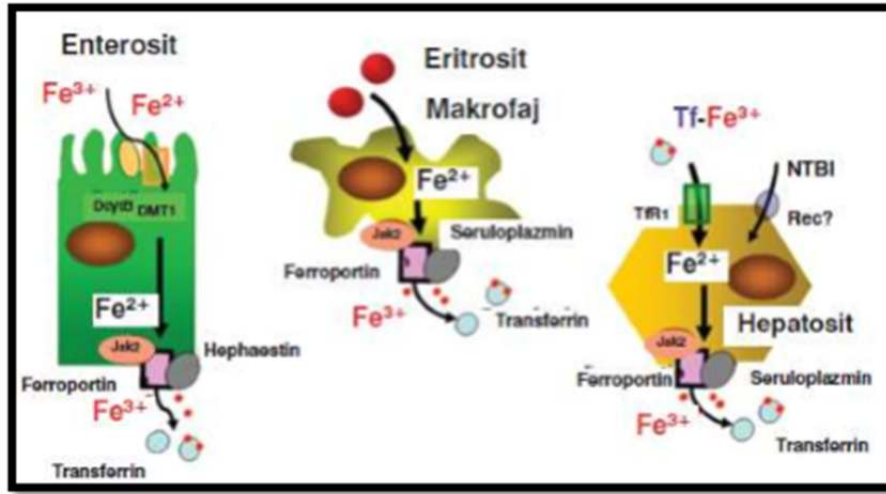
2.2.2. Plazma Demirinin Hücreler Tarafından Alınması

Demir, plazmada karaciğerde sentezlenen ve salınan, yarılanma ömrü 8 gün olan ve glikoprotein yapısında olan transferrin tarafından taşınır⁴⁰. Enterositin bazolateral tarafından ferroportin ile hücre dışına verilen ve hefestin ile okside edilerek Fe^{3+} hale geçirildikten sonra transferrine yüklenen demir portal dolaşımdan, çoğu kemik iliğindeki eritrosit öncü hücrelerine olmak üzere, hücrelere taşınır. Her transferrin molekülü, iki tane Fe^{3+} 'ü güçlü bir şekilde bağlar. (Hefestin eksikliğinde, duodeonal enterositlerde demir fazlalığı ve demir emilim bozukluğuna bağlı hipokrom mikrositer anemi olduğu gösterilmiştir.) Transferrin her biri birer demir atomu bağlayabilen iki bölgeye sahiptir. Plazmada apotransferrin (demir bağlı olmayan transferrin), monoferrik ve diferrik transferrin olmak üzere üç formda bulunur²⁴. Fizyolojik şartlarda transferrinin demir bağlama kapasitesinin yaklaşık üçte biri doymuş haldedir³⁸. Transferrine bağlı demir redoks olarak inert durumdadır. Demir yüklenmesinde tüm transferrin bölgeleri doyduğunda transferrin bağlı olmayan demir (non transferrin bound iron - NTBI) oluşmaya başlar ve transferrinin tamponlayıcı etkisi sona erdiği için bu demir oksidatif hasara yol açar⁴¹.

Hücreler, tipine göre demiri farklı yollardan alırlar:

1. Enterositler; diyet demirini apikal tarafta bulunan DMT1 ile alınırken,
2. Makrofajlar; Eritrosit lizisi ile makrofajlarda açığa çıkan hemoglobinden hemoksijenaz ve biliverdin redüktaz enzimleri ile sırasıyla demir ve bilirubin oluşur. Makrofajların vakuolar membranlarından demir transportu DMT1 ile olmaktadır. Makrofajlarda açığa çıkan demir, ya tekrar organizmada dolaşan demir olarak makrofaj ferroportini ile plazmaya verilir ya da makrofaj içinde ferritin şeklinde depolanır. Ferroportin enterositte olduğu gibi hücre dışına tek demir taşıyıcısıdır. Makrofajdan demir plazmaya verilirken transferrine yüklenebilmesi için yine Fe^{3+} şekline getirilmeli okside edilmelidir. Bu oksidasyon ve transferrine yüklenme işinde plazmada bakıra bağlı ferrooksidaz olan ve karaciğerde sentezlenen plazma proteini seruloplazmin rol alır⁴².

3. Hepatositlerin demir alımı; TfR1 ve TfR2 ile olur. Plazmadaki transferrin-demir kompleksi, TfR1'e bağlanır³⁶. Hücreler demir ihtiyacıyla orantılı şekilde reseptör sentezleyip hücre yüzeyine yerleştirirler. Transferrin-TfR1 kompleksi hücre içine reseptör aracılı endositoz ile alınır. Kompleks, hücre zarının klatrin kaplı bölümünün invajine olmasıyla endozom içine girer. Klatrinler ayrıldıktan sonra endozom içi, proton girişiyle asidifiye edilir. Asidik ortam transferrin-TfR1 kompleksinde yapısal değişikliğe neden olur ve serbest demirin açığa çıkmasına yol açar. Ferrik demir endozomal ferriredüktaz ile redükte edildikten sonra DMT1 aracılığı ile sitoplazmaya geçer³⁰. Bu demir ya eritrosit öncülü hücrelerde mitokondriye geçerek hem sentezine katılır ve ya ferritin şeklinde depolanır ya da diğer metabolik süreçlerde kullanılır³. Geriye kalan endozomu takiben lizozom oluşmaz ve böylece demirini bırakmış transferrin-reseptör kompleksi sindirilmeyerek tekrar kullanılmak üzere hücre membranına yönlendirilir. Böylece transferrin siklusu tamamlanmış olur (Şekil 2.8 ve Şekil 2.9)⁴³.

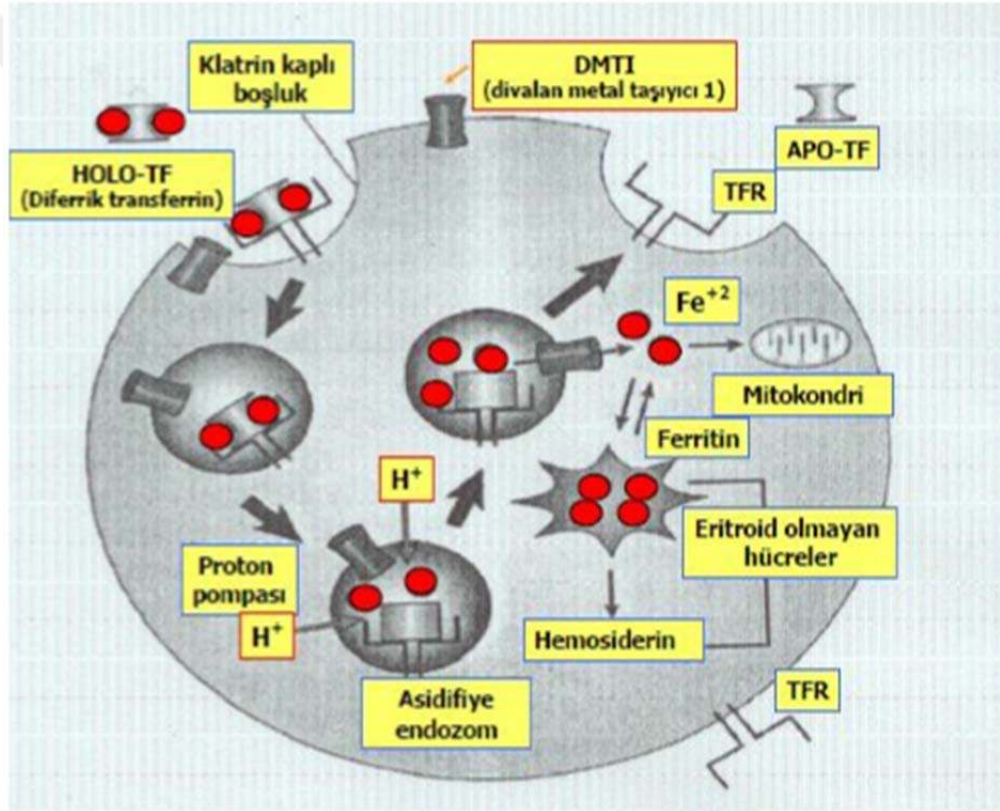


Şekil 2.8. Demiri farklı yollardan alan hücre tipleri⁴³.

Vücuttaki birçok hücre demir ihtiyacına göre TfR1 sentezler. Bunlar arasından bazı hücre tipleri demir alımı için transferrin siklusuna sıkı sıkıya bağlıdır. TfR1 geni hasarlı farelerde birçok hücrenin gelişiminin normal olduğu görülse de nöroepitelyal, eritrosit ve lenfosit öncülü hücrelerin farklılaşması için TfR1'e gereksinimi olduğu görülmüştür. Eritropoez sürecinde hemoglobin üretimi için TfR1 ve transferrin

siklusunun rolü eritrosit öncülü hücreler için aşıkâr olsa da lenfopoez ve nöroepitelyal sistem için neden bu kadar gerekli olduğu ise řu an için net değildir.

Transferrin reseptör 2'nin (TfR2) vücuttaki dağılımı ise hepatositler ve farklılaşmış eritroblastlarla sınırlıdır. Transferrin reseptör 2'nin, TfR1'e göre transferrini 30 kat daha düşük kuvvetle bağlaması; demirin hücreler tarafından alınmasında küçük bir pay sahibi olduğunu düşündürmektedir. Dolaşımdaki demir yüklü transferrine duyarlı olduğu ve hepsidin ekspresyonunun kontrolünde görevli olduğu, dolayısıyla TfR2'nin asıl görevinin regülasyonla alakalı olduğu tahmin edilmektedir⁴⁴.

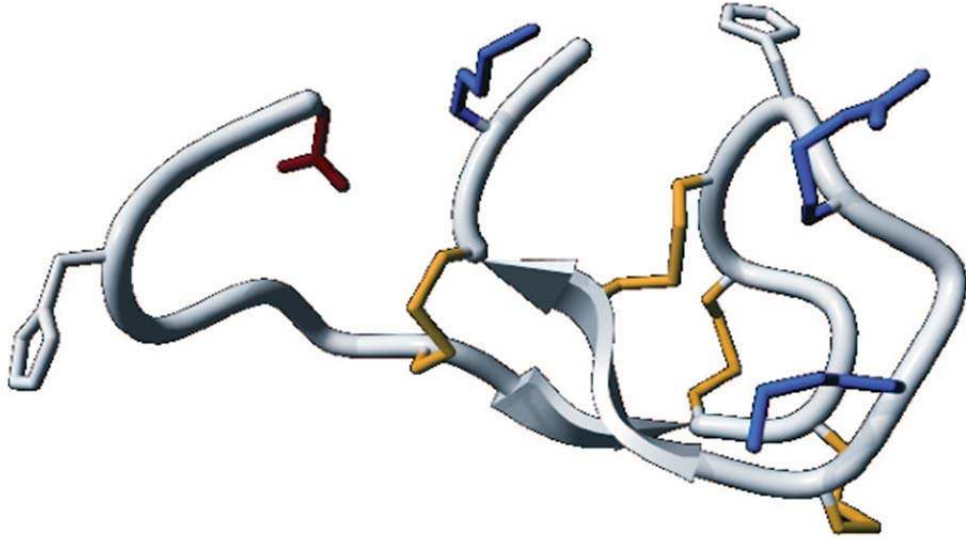


Şekil 2.9. Demirin hücreler tarafından alınışı - Transferrin siklusu⁴³.

Bunlar dışında tüm hücreler, demiri yüzeylerinde bulunan transferrin reseptörlerini kullanarak plazma transferrininden almaktadırlar. Transferrinin demir bağlama kapasitesi tamamen dolduğunda plazmada transferrine bağlı olmayan serbest demir oluşur. Bu demir özellikle karaciğer ve kalp hücrelerine kolaylıkla girebilir ve hücresel düzeyde hasara yolaçabilir⁴⁴.

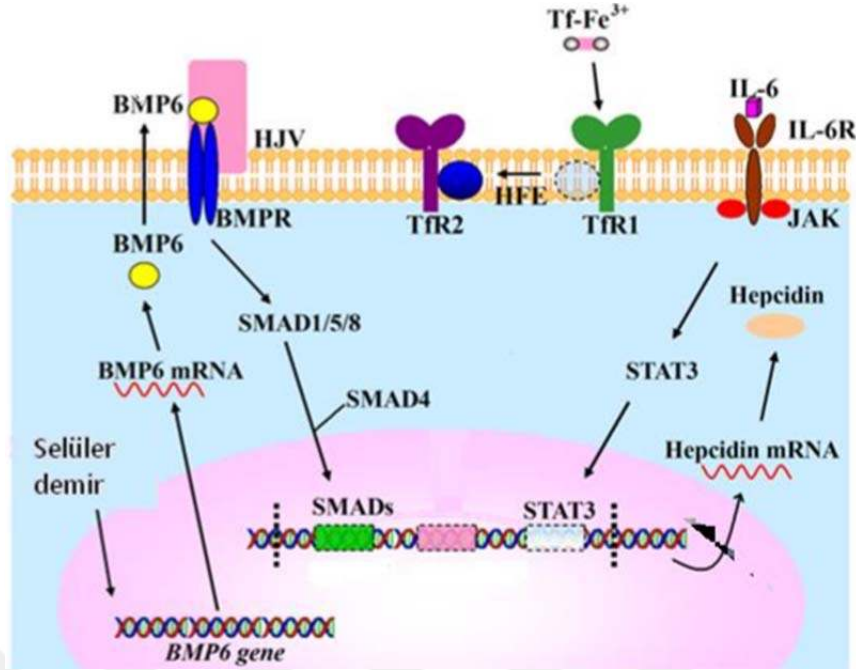
2.2.3. Demir Metabolizmasının Regülasyonu

Demir homeostazının kontrolünde; DMT1, ferroportin, hepsidin, TfR2 ve HFE proteininin anahtar rolü vardır, öyle ki; DMT1 haricinde, diğerlerinin mutasyonu durumunda hereditör hemokromatozisin farklı tipleri ortaya çıkar.⁴⁵ Vücuttan aktif demir atılım sisteminin olmaması nedeni ile demir homeostazı öncelikle intestinal demir emilimi düzeyinde regüle edilir. Hepatositlerde sentezlenen 25 amino asitlik bir polipeptid olan hepsidin, demir homeostazının major regülatörüdür (Şekil 2.10). Plazmaya olan demir trafiği başlıca hepsidin tarafından kontrol edilmektedir. Hepsidin, intestinal demir emilimini ve retiküloendotelyal sistem makrofajlarında gerçekleşen demir siklusunu düzenler. Bunu; enterosit, makrofaj, hepatosit ve diğer hücrelerin membranındaki ferroportinin internalizasyonuna ve lizozomal yıkımına sebep olarak yapar. Memeli hücrelerindeki demirin hücre dışına tek çıkış yolu olan ferroportinin yıkımı, intrasellüler demir retansiyonuna yol açar. Hepsidin, DMT1'in proteozomal yıkımına da katkıda bulunur. Hepsidin; demirin dolaşıma ferroportin aracılı salınımını azalttığı için hipoferremi hormonu olarak görev yapar. Sonuç olarak gelişen demir retansiyonu; duodenal enterositlerde diyet demiri emiliminin, retiküloendotelyal makrofajlarda ise demir döngüsünün azalmasına yo açar.⁴⁶



Şekil 2.10. Hepsidin moleküler yapısı. Peptid yapısı (gri), disülfid bağları (1-8, 2-4, 3-6 ve 5-7) (sarı), pozitif yüklü arginin ve lisin kalıntıları (mavi) ve negatif yüklü aspartik asit kalıntısı (kırmızı).⁴⁶

Hepsidin üretimi; vücuttaki demir durumu, inflammatuar sitokinler, hipoksi ve eritropoetik talep doğrultusunda düzenlenir (Şekil 2.11). Plazmadaki demir seviyesinin yüksekliğinin göstergesi olan yüksek diferrik transferrin düzeyi, benzer şekilde yüksek karaciğer demir içeriği ve inflammatuar durumlarda mikroorganizmaları demirden mahrum bırakmak için IL-6 gibi sitokinlerin yükselmesi; hepsidin ekspresyonunu uyarır. Tip 2 akut faz reaktanı olan hepsidin, defensinlere benzeyen yapısı nedeniyle ilk kez antimikrobiyal olarak tanımlanmıştır. Fakat antimikrobiyal etki gösterebilmesi için hepsidinin dolaşımda bulunan konsantrasyonundan çok daha yüksek konsantrasyonda olması gerekmektedir. Demir eksikliği, hipoksi ve artmış eritropoetik aktivite ise hepsidin transkripsiyonunu inhibe eder. Karaciğer demir depoları, ekstraselüler sinyal molekülü olan “bone morphogenetic protein-6” (BMP-6)’nın hepatik ekspresyonunu etkiler. BMP-6’nın, hepatosit BMP reseptörleriyle etkileşimi, SMAD proteinleri yoluyla intraselüler sinyal iletimini başlatarak hepsidin transkripsiyonunu artırır. Hemojuvelin, BMP-6’nın başlattığı sinyal yolağını, BMP koreseptörü olarak güçlendirir. Dolaşımdaki demir ise hepsidini, transferrinle ve her iki reseptöründe “high Fe” HFE proteiniyle olan etkileşimiyle regüle eder. Plazma demir seviyesi azaldığında; TfR1; HFE ve TfR2’nin etkileşimini engelleyerek hepsidine giden sinyali bloklar. Plazma demir seviyesi ve transferrin saturasyonu yükseldiğinde ise; holotransferrin, HFE ve TfR1’i ayırarak, HFE/TfR2 sinyal kompleksinin oluşmasına izin verir. Hipoksi durumunda ise “hypoxia inducible factor” (HIF) transkripsiyon faktörü, membran proteazı olan matriptaz-2’nin ekspresyonunu artırır. Matriptaz-2, hemojuvelini hepatoselüler yüzeyden ayırarak BMP-6 sinyal yolağını zayıflatır. Flebotomi, hemoliz ve eritropoetin verilmesi gibi durumlarda artan eritropoez ise, belki de eritroid öncüllerden salınan moleküller aracılığıyla oluşan sinyalle, hepsidin ekspresyonunu önemli derecede azaltır. Eritropoetik aktivitenin hepsidin ekspresyonu üzerinde vücut demir durumuna göre daha fazla etkisi olduğu bilinmektedir^{40,47}.



Şekil 2.11. Hepcidin ekspresyonunun regülasyonu (BMP-6: Bone morphogenetic protein 6, BMPR: Bone morphogenetic protein receptor, HJV: Hemojuvelin, Tfr2: Transferrin reseptörü 2, Tf-Fe³⁺: diferrik transferrin, TfR1: Transferrin reseptörü 1, IL-6: İnterlökin 6, IL-6R: İnterlökin 6 reseptörü.)⁴⁸.

2.2.4. Demirin Depolanması

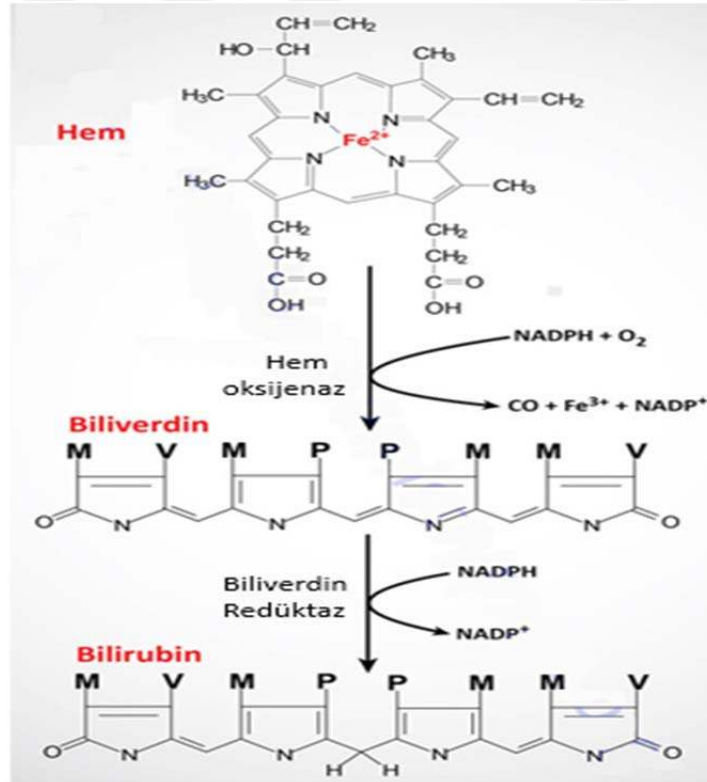
İhtiyaçlar dışında kalan hücre demiri ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanır. Vücudun ana depo demiri olan ferritin, 4500 demir atomunu bağlayabilmektedir. H (ağır) ve L (hafif) olmak üzere 2 farklı ferritin alt ünitesi vardır. Bir ferritin molekülü 24 adet alt ünitelerden oluşmaktadır. Bu alt ünitelerin farklı oranlardaki birleşimi, dokudan dokuya değişkenlik göstermektedir. H-ferritin gelen ferröz demirin oksidasyonu için gerekli ferrooksidaz aktivitesine sahipken, L-ferritin etkili nükleasyon ve mineralizasyondan sorumludur. L-ferritin daha çok demir depolayan dokularda bulunurken, H-ferritin ise demiri hızlı alıp veren hücrelerde bulunur. Demir ferritin şeklinde depolanarak; çözünür, toksik ve redoks aktif olmayan, biyoyararlanımı yüksek formda bulunur. Böylece ferritin, hücreleri demir aracılı oksidatif strese karşı korumuş olur²⁸. Plazma ferritin konsantrasyonunun vücut depo demiri ile korelasyonunun olmasından dolayı demir metabolizması hastalıklarının tanısında serum ferritin değerini ölçmek önemlidir. Vücut demirinin küçük bir kısmını depolayan hemosiderin, ferritinin lizozomlarda kısmi yıkımı ile oluşur. Ağırlığının yaklaşık %25 ila 30'u kadar demir

içerir. Çoğunlukla makrofajlarda bulunsa da patolojik durumlarda vücudun birçok organında birikebilir⁴⁹⁻⁵⁰.

Ferritin yıkılınca ya protein ve demir açığa çıkar ya da hemosiderin oluşur. Lizozomal zarlarda ferritin molekülleri %50 oranında demir içeren agregatlar şeklinde bir araya gelebilirler, bunlara hemosiderin adı verilir. Hemosiderin suda erimez, normalde monosit ve makrofajlar içerisinde oluşturulur. Ama patolojik durumlarda her dokuda fazla miktarda birikebilir. Hemosiderinin içerdiği demir ferritinden daha fazladır, genellikle apoferritin sentezinin ve demir tarafından tutulmasının maksimum olduğu aşırı demir yüklenmesi durumlarında görülür. Hemosiderinin içindeki demir hemoglobin yapımı için kullanılabilirse de demirin hemosiderinden mobilizasyonu ferritine göre çok daha yavaştır⁵¹⁻⁵².

2.2.5. Hemoglobinin yıkımı

En önemli demir içeren protein hemoglobindir. Bir gram hemoglobinden 34 mg bilirubin üretilir. Erişkinlerde günde 3-4 mg/kg (yaklaşık 250-400 mg) bilirubin üretilmektedir. Bu miktar yeni doğanlarda günde 6-10 mg/kg'a kadar çıkabilir⁵³.



Şekil 2.12. Hem grubunun yıkılarak demirin açığa çıkışı⁵⁴.

Retiküloendotelyal sistem hücrelerinde hem halkası nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve moleküler oksijene gereksinim duyan, hız kısıtlayıcı bir enzim olan mikrozomal “hem oksijenaz (HO)” enzimi ile biliverdine okside olur (Şekil 2.12). Bu reaksiyon sonucunda karbonmonoksit ve demir ortaya çıkar. Karbonmonoksit akciğerlerden solunum ile atılırken, demir vücutta tekrar kullanılır⁵⁵.

Biliverdin sitozolik biliverdin redüktaz enzimi ile bilirübine indirgenir. Biliverdin redüktaz bir serin/treonin/tirozin kinaz, çatı proteini, transkripsiyon faktörü ve hücre içi taşıyıcı regülatördür. Saflaştırılmış biliverdin redüktaz enzimi hem kofaktör hem de pH bağımlı katalizördür ve bu aktivite biliverdin redüktaza özgüdür⁵⁶.

2.2.6. Demir Toksisitesi

Demir her ne kadar yaşam için vazgeçilmez de olsa, fazlalığı durumunda dokulara zarar verir. Aerobik ortamlarda serbest oksijen radikallerini üretebilmesiyle demir; potansiyel zararlı bir ögeye dönüşür. Serbest radikaller, normal hücresel mekanizmalar gereği üretilirler. Bununla birlikte, süperoksit ($\bullet\text{O}^{2-}$) ve hidroksil ($\bullet\text{OH}$) radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (reactive oxygen species - ROS) aşırı üretimi sonucu hücresel hasar meydana gelebilir. Hücrelerin metabolik ihtiyacını aşan demir, bazal ROS konsantrasyonunun artmasına ve dolayısıyla oksidatif strese sebep olur. Demir ve ROS arasındaki reaksiyonlar Çizelge 2.1’de gösterilmektedir⁵⁷.

Çizelge 2.1. Demir ve reaktif oksijen türleri arasındaki reaksiyonlar⁵⁷.

REDÜKSİYON
$\bullet\text{O}^{2-} + \text{Fe}^{3+} \longrightarrow \text{O}^{2-} + \text{Fe}^{2+}$
FENTON REAKSİYONU
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$
HABER-WEISS REAKSİYONU
$\bullet\text{O}^{2-} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

2.2.7. Demir Yüklenmesi

Demir yüklenmesi ifadesi, doku hasarı yapıp yapmadığına bakılmaksızın, vücuttaki demirin arttığı durumlar için kullanılır. Hemokromatozis ise, doku demirinin artması sonucu hastalık durumunun oluşmasıdır. Demir emiliminin regülasyonunda defekt ya da bypass (Örn. kan transfüzyonu) olduğunda demir fazlasını atacak aktif sistem bulunmadığı için demir yüklenmesi gelişir⁵⁰.

Demir yüklenmesi hastalıkları; tipik olarak sinsi ve progresif seyrederek, klinik semptom gelişmeden geri dönüşümü olmayan organ hasarına neden olabilirler. Hastalığın tanımlanmasını müteakip demir toksisitesinin sonuçları önlenabilir veya azaltılabilir. Demir yüklenmesinden şüphelenildiğinde tarama testi olarak serum ferritin ve transferrin saturasyonu değerlerine bakılır. Demir yüklenme durumunun altın standart tanı yöntemi ise karaciğer biyopsisidir. Sistemik demir yüklenmesinin başlıca tedavi seçenekleri; anemi yokluğunda flebotomi, anemi ile seyreden demir yüklenmelerinde ise şelasyon tedavisidir⁵⁷.

Demir yüklenmesi hastalıkları; primer (herediter) ve sekonder (akkiz) olmak üzere ikiye ayrılır (Çizelge 2.2 ve 2.3). Primer demir yüklenmesi, demir dengesinin regülasyonu ile ilgili kalıtsal bozukluklarla ilgiliyken, sekonder demir yüklenmesi hemen her zaman diğer genetik veya akkiz hastalıkların sonucu gelişir⁵⁸.

Çizelge 2.2. Herediter demir yüklenmesi hastalıkları²⁴.

Tip	Kalıtım	Tanı	İlgili gen
I	OR	Klasik herediter hemokromatozis	HFE
II	OR	Jüvenil hemokromatozis	Hemojuvelin
A B			Hepsidin
III	OR	Herediter hemokromatozis	TfR2
IV	OD	Ferroportin hastalığı Herediter hiperferritinemi – katarakt sendromu	Ferroportin Ferritin

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant, TfR2: Transferrin reseptörü 2

Çizelge 2.3. Sekonder demir yüklenmesi hastalıkları.⁵⁰

Hereditör hastalıklar	Akiz hastalıklar
Talasemiler	Aplazi
Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği	Sideroblastik ve diseritropoetik anemiler
Pirüvat kinaz eksikliği	Miyelodisplastik sendrom
Konjenital diseritropoetik anemiler	Karaciğer hastalıkları
Ciddi hemolitik anemiler	Diyet kaynaklı demir yüklenmesi
Sideroblastik anemiler	Uygun olmayan demir tedavisi
Porfiriler	Lösemiler, kemik iliği nakil alıcıları
Aplazi	Portakaval şant sonrası

2.2.8. Demir Eksikliği Anemisi

Demir eksikliği; vücuttaki demir miktarının normalden daha az olması durumudur. Demir eksikliği anemisinin klinik belirtilerinin çok eski zamanlarda tanımlandığı bilinmektedir.

Demir eksikliği anemisi muhtemelen dünyada en sık görülen anemi şeklidir. Her yaşta ve bütün sosyoekonomik gruplarda görülmekle birlikte çocuklarda ve gençlerde, fakir diyetle beslenenlerde ve doğurganlık çağındaki kadınlarda daha sıktır. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre; demir eksikliği anemisi dünya nüfusunun %30'unu etkilemektedir. Okul öncesi çocukların yaklaşık %43'ü, okul çağı çocuklarının %37'si ve gebe kadınların %51'i anemiktir. Kadınların %50'sinde ve gebelerin %90'ında henüz anemi başlamamış olmakla beraber demir depolarının ileri derecede azaldığı saptanmıştır. Erkeklerde ve postmenapozal kadınlarda demir eksikliği anemisi %2–5 oranında görülür ve daha çok GİS kanaması ve malabsorbsiyona bağlı olarak gelişir.

Demir eksikliği diyetle yetersiz demir alımına, demir malabsorbsiyonuna, kronik kan kaybına, gebelikte ve emzirme döneminde demirin fetus ve infant eritropoezi için

kullanılmasına, hemoglobüri ile birlikte intravasküler hemolize ya da bütün bu faktörlerin kombinasyonuna bağlı olarak gelişebilir.

Demir eksikliği anemisinin patogeneğinde başlıca üç faktör rol oynar:

1. Fizyolojik olarak artan demir ihtiyacı
2. Kanamalara bağlı kan kaybı
3. Yetersiz demir alımı

Demir deplesyonu: Demir eksikliğinin en erken safhasıdır. Bu safhada depo demiri azalmıştır ya da tükenmiştir. Fakat serum demir konsantrasyonu ve kan hemoglobin seviyesi normaldir.

Anemi olmadan demir eksikliği: Azalmış veya tükenmiş depo demiri, genellikle düşük serum demir konsantrasyonu ve transferrin saturasyonu ile karakterizedir.

Demir eksikliği anemisi: Azalmış ya da tükenmiş demir depoları, düşük serum demir düzeyi, düşük transferrin saturasyonu, düşük hemoglobin konsantrasyonu ve hematokrit değeri ile karakterizedir.

Kemik iliğinde hemoglobin sentezi için gereken demir miktarı yetersiz olduğu zaman demir eksikliği anemisi gelişir. Kan kaybı, artan ihtiyaç veya emilim bozukluğu nedeniyle demir eksikliği meydana geldiğinde depolardaki demirin mobilize olması ile bu eksiklik giderilir ve hemoglobin yapımı için gerekli demir sağlanmış olur. Dokulardaki demir depoları boşaldığı zaman, kemik iliğinde hemoglobin sentezi için gerekli demir miktarı yetersiz hale gelir ve hipokrom mikrositer anemi gelişir⁵⁹. Çizelge 2.4’de demir eksikliğinin gelişim evreleri serum değerlerindeki değişiklikler özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Demir eksikliğinin gelişim evreleri⁶⁰.

	Normal Dönem	Prelatent Dönem	Latent Dönem	Demir eksikliği erken dönem	Demir eksikliği ileri dönem
Serum ferritin	N	Düşük	<12	<12	<12
Transferrin saturasyonu (%)	N	Düşük	<16	<16	<16
PEP (%g)	N	N	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Hb	N	N	N	8-14	<8
MCV (fl)	N	N	N	N-Düşük	Düşük

FEP: Eritrosit serbest protoporfirini. N: Normal.

2.3. Biyosensörlerin Temel Kuramları

2.3.1. Biyosensörler

Sağlık sektöründe, hastalıklarda biyolojik moleküllerin algılanması, izlenmesi ve tanımlanmasında güvenilir, hızlı ve düşük maliyetli sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır⁶¹. Elbette bu ihtiyaç sadece tıp alanı ile sınırlı değildir, ayrıca çevre kirliliğinin izlenmesinde, gıda analizlerinde ve biyoterörizmin ortaya çıkartılmasında da mevcuttur. Bundan dolayı, fizik, kimya, biyoloji, mühendislik ve tıp gibi birçok farklı alanda araştırma yapan bilim adamları daha etkin ve güvenilir sensör cihazlarının yapılandırılması, geliştirilmesi ve üretilmesi için çabalanmaktadır⁶²⁻⁶³.

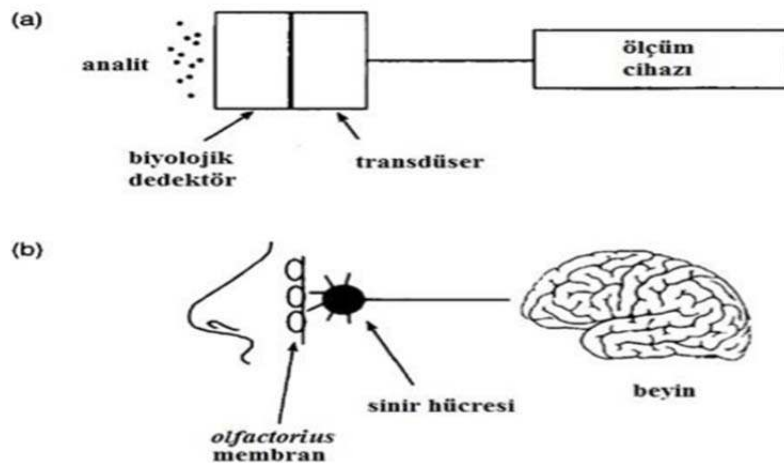
Sensörler, fiziksel bir özelliği algılayan veya ölçen sonra kayıt altına alan, gösteren ya da başka bir şekilde cevap oluşturan cihazlardır. Burun, kulak, göz, dil ve parmaklarımız sensörü ifade eden en temel biyo örneklerdir. Laboratuvarlarda kullanılan turnusol kağıdı en iyi bilinen sensör türüdür, ortamın asitlik ve bazlığı hakkında bilgi verir. Daha kesin bir pH ölçümü için spesifik indikatörler kullanılır. Bununla beraber, ortamın asitliğini ölçen en iyi metot elektriksel cevapla pH yı ölçen bir pH metredir. Sonuçta bu yöntemlerde asitliğin derecesine göre cevap veren sensör, ya bir kimyasal madde ya da pH metredeki cam membran elektrottur. Oluşan kimyasal ya da elektriksel cevaplar genellikle gözlerimizle görebileceğimiz bir sinyale dönüştürülür. Turnusol kağıdındaki renk değişiminin sebebi, kimyasal tepkime sonucu görünür bölge ışığın absorbansındaki değişimdir ve bu değişim aydınlık bir ortamda

gözlerimiz tarafından algılanmaktadır. pH metrede ise, oluşan elektriksel cevap (potansiyel değişiminden kaynaklanan) gösterge ibresinin hareketine ya da dijital göstergede görülebilen bir cevaba dönüştürülmüştür. Sensör cihazının bu dönüşümünü gerçekleştiren kısmına “transdüser” denmektedir. Sensörler üç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar:

1. Basınç, sıcaklık, kütle, uzaklık gibi özellikleri ölçen **fiziksel sensörler**.
2. Kimyasal ya da fiziksel cevaplar ile kimyasal maddeleri ölçen **kimyasal sensörler**.
3. Biyolojik bileşenleri kullanarak kimyasal maddeleri ölçen **biyosensörler**’ dir.

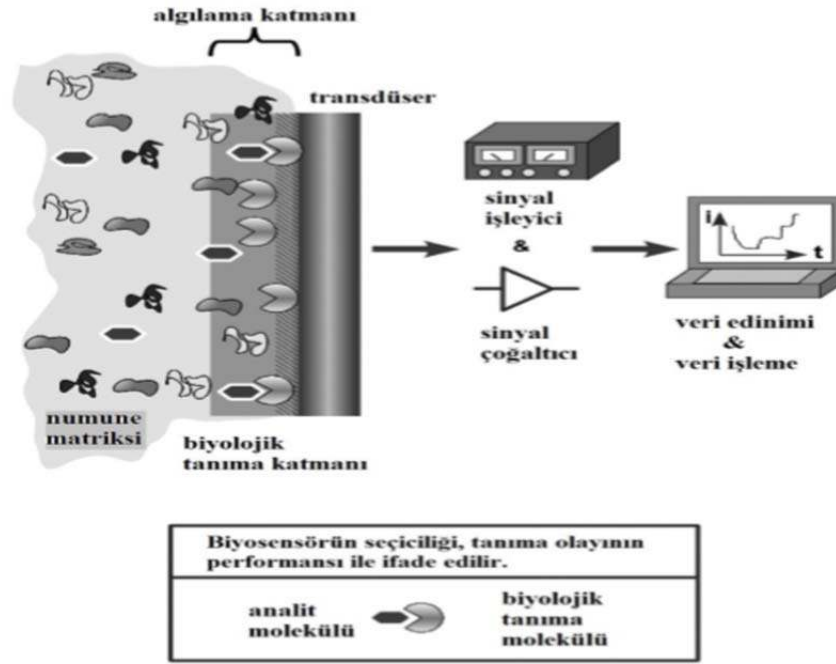
Gözle görülebilen cevapların oluşabilmesi için bu üç tip cihazın da transdüsere bağlanması gereklidir. Biyolojik bileşenlerinin yokluğu ya da varlığına göre sınıflandırılan kimyasal sensör ve biyosensörler, “substrat”, ya da daha genel bir terimle “analit” olarak adlandırılan özel kimyasal maddeleri algılar ve ölçerler.

Şekil 2.13’de burun-koklama sistemine ait şematik diyagram sensör diyagramı ile karşılaştırılarak gösterilmiştir. Burun delikleri yardımıyla toplanan koku örnekleri, koku olfactorius membranı (algılayıcı bileşen) tarafından algılanır. Sonra bu reseptörlerin cevapları koku sinir hücreleri (transdüser) tarafından elektriksel sinyale dönüştürülür ve değerlendirilmek üzere sinirler yardımıyla beyne iletilir. Beyin bu sinyali koku dediğimiz algı dönüştürdüğünden bir mikroişlemci olarak davranır⁶⁴.



Şekil 2.13. (a) Analit, algılayıcı birim, transdüser ve ölçüm cihazı gibi bileşenleri olan biyosensörün şematik gösterimi (b) burnun bir sensöre benzetilmesi: olfactorius membranı biyolojik algılayıcı, sinir hücresi transdüser, sinir lifi uyarıcı ve beyin ölçme bileşeni⁶⁵.

IUPAC'a (International Union of Pure and Applied Chemistry) göre bir biyosensör, bir elektrokimyasal dönüştürücü ve bununla temas halindeki biyolojik tanıma elemanı (biyokimyasal reseptör) sayesinde, spesifik nicel yada yarı nicel analitik bilgi sağlayabilen aygıt olarak tanımlanmaktadır⁶⁶. Genel olarak bir biyosensör şeması Şekil 2.14'de gösterilmiştir.



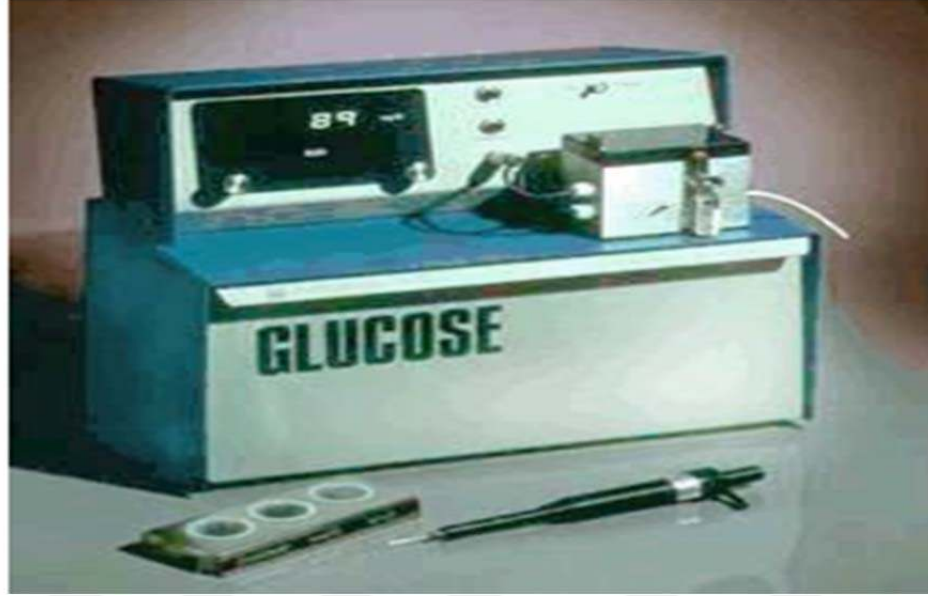
Şekil 2.14. Tipik bir biyosensör şeması⁶⁷.

Biyosensörler; biyoloji, kimya, biyokimya ve mühendislik gibi pek çok bilim alanından yararlanılarak biyolojik algılayıcı moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilir⁶⁸. En basit tanımıyla da biyolojik katalizör taşıyan sensörler olarak bilinmektedirler⁶⁹.

2.3.2. Biyosensörlerin Tarihçesi

Biyosensörlerin tarihi ilk olarak 1950'lerde L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde bir ameliyat esnasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamaktadır. 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından glukoz oksidaz enzimi oksijen elektrot üzerine bir membran yardımıyla hapsedilerek kandaki glukoz derişimi ölçülmüştür⁷⁰.

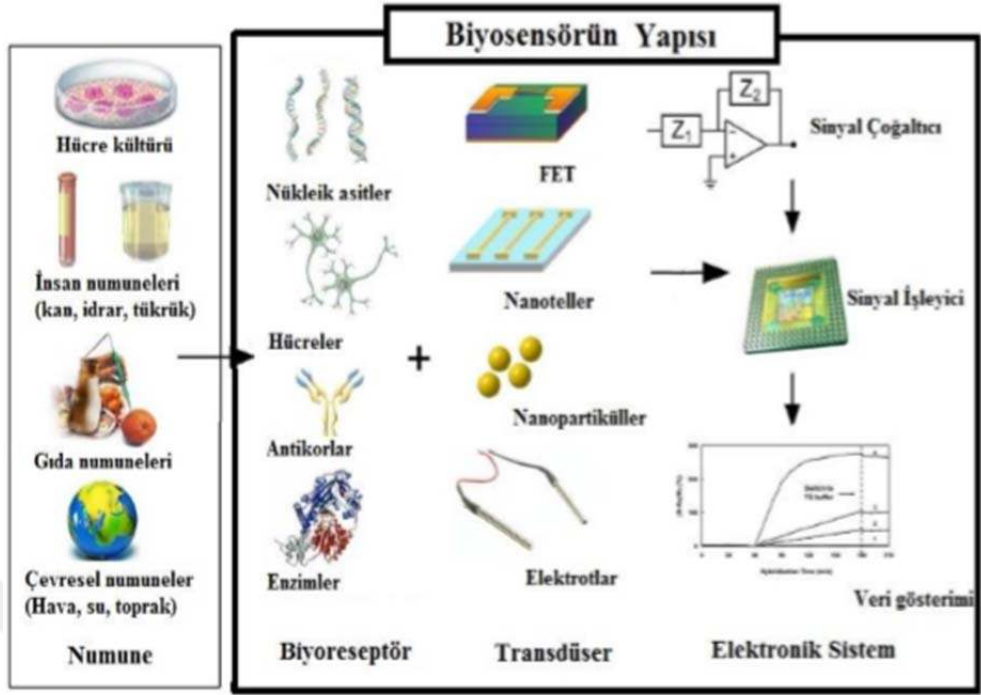
İlk ticari biyosensör 1975 yılında piyasaya sunulmuştur (Yellow Springs Instruments Glukoz biyosensörü, Şekil 2.15). Bu cihaz, ilk biyosensör temelli laboratuvar analizörüdür ve glukoz oksidazın katalizlediği tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'in amperometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır⁶⁹.



Şekil 2.15. YSI 23A Glukoz Biyosensörü⁷².

2.3.3. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensörün fonksiyonu, biyolojik bir olayın ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesidir⁷³. Biyosensör sistemleri, seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyoreseptör”, biyoreseptörün analit ile etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen “transdüser” ve “elektronik” bölümlerden meydana gelmektedir (Şekil 2.16)⁷⁴.

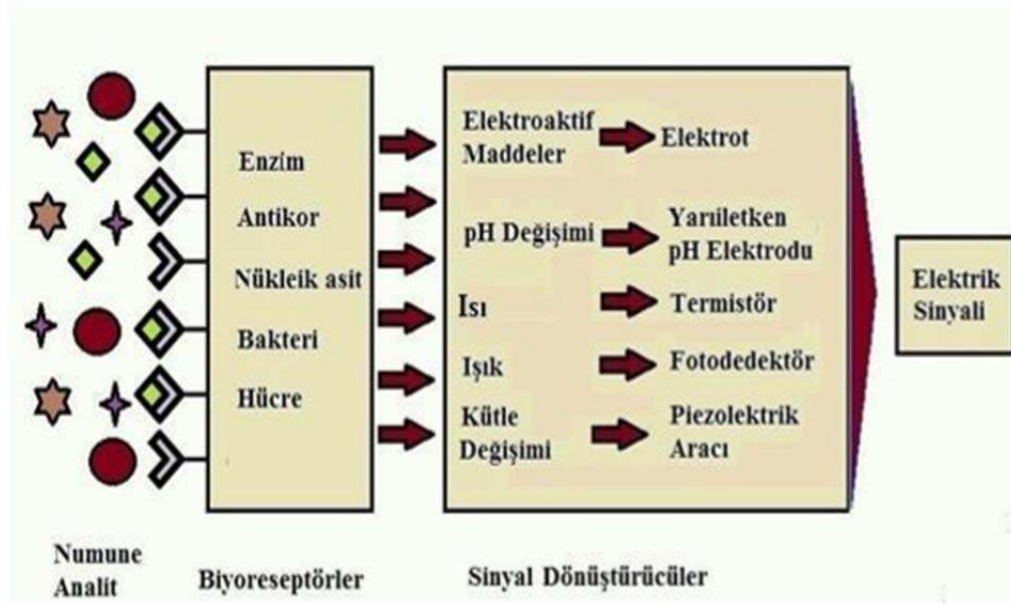


Şekil 2.16. Biyosensörlerin yapısı⁷⁵.

Biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkan tanıyan bir ölçme sistemi olarak bilinen biyosensörler, birbirleri ile temas halinde olan biri **biyokimyasal** diğeri **elektrokimyasal** özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analit ile etkileşerek onu tanımadır. Bu etkileşme sonucunda gerçekleşen farklanmalar,

- Oluşan ürün veya başlangıçta ortamda bulunan ve tepkime süresince tükenen substrat tarafından oluşturulan bir elektrokimyasal değişiklik,
- Tepkime sonucunda ortaya çıkan ya da kaybolan ısı,
- Tepkime sonucunda optik özellikteki veya kütledeki değişim' dir.

Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısmı ise bu tanıma olayını ölçülebilir bir sayısal değere çevirir(Şekil 2.17)⁷⁴⁻⁷⁷.



Şekil 2.17. Biyosensör bileşenleri⁷³.

2.3.3.1. Tanıma Elemanı (Biyoreseptörler)

Tanıma elemanı herhangi bir sensörün anahtar bileşenlerinden biridir ve belirli bir analite karşı sensörün seçici olarak davranmasını sağladıklarından seçicilikteki en önemli paya sahiptirler. Biyosensörlerde kullanılan en yaygın biyoreseptörler genellikle enzimlerdir. Diğer tanıma bileşenleri arasında antikorlar, nükleik asitler, doku, mikroorganizmalar ve yapay biyolojik reseptörler yer almaktadır⁶⁴.

2.3.3.2. Dönüştürücü (Transdüserler)

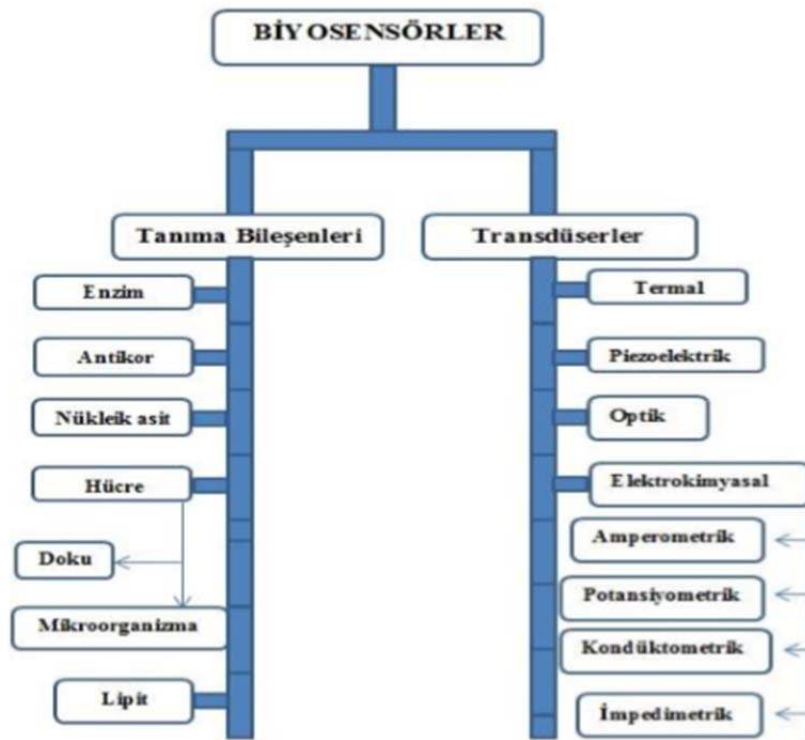
Transdüserler, biyoreseptörlerin tepkimesini ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren bileşenleridir. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır. Biyokimyasal etkileşimin türüne göre uygun bir transdüser seçilir⁷¹. Elektrokimyasal tepkimeler sonucunda, genellikle elektrotlar arasındaki ortamın iletkenliğinde bir değişiklik (kondüktometri), ölçülebilir bir akım (amperometri) veya ölçülebilir bir potansiyel (potansiyometri) meydana gelmektedir⁸¹. Optik transdüserlerde hedef ışık, piezoelektrik transdüserlerde kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi nedeniyle meydana gelen değişimdir ve termistörlerde ise ısı değişimidir⁶⁵.

Ölçülen madde cinsi, yayınlanan makale sayısı ve ticari olarak üretilen tür ve sayılar dikkate alındığında, elektrokimyasal bazlı sistemlerin diğer sistemlere göre çok daha fazla ilgi gördüğü anlaşılmaktadır⁷⁷. Bu durumda; elektrokimyasal çeviricilerin

ucuz olmaları, kullanım kolaylıkları ve basit bir şekilde yapılabilmeleri ile açıklanmaktadır⁶⁷. Elektrokimyasal algılayıcılardan en yaygın olarak kullanılanlar ise potansiyometrik ve amperometrik olarak bilinenlerdir⁷³.

2.3.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, kullanıldıkları alanlara göre ya da tanıma elemanı (enzim, antikor, vb.) ve transdüserin türüne göre (optik, elektrokimyasal, vb.) (Şekil 2.18) sınıflandırılır⁷⁸. Bir biyosensörü tanımlamanın en iyi yolu hem tanıma elemanı hem de transdüser tipini tarif etmektir, örneğin; “amperometrik DNA biyosensörü”^{63,79}.



Şekil 2.18. Biyosensörlerin tanıma bileşenleri ve transdüserlere göre sınıflandırılması⁷⁸.

2.3.5. Biyosensör Teknolojisinin Avantaj Ve Dezavantajları

Biyosensörün avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir^{73,80}.

- Pratik,
- Cevap zamanı kısa,
- Hızlı,

- Sürekli ölçüm olanağı,
- Biyoalgılayıcı bileşenlerinden dolayı yüksek seçicilik özelliği,
- Diğer cihazlarda ölçülemeyen nonpolar molekülleri ölçme,
- Ucuz,
- Basit,
- Analiz öncesi numunelere ön işlem gerektirmeme,
- Düşük analit derişimlerini tayin etme,
- Aletsel olarak minyatürizasyona uygun,
- Renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçüm,
- Rutin analizlerde kişinin kendi kendine ölçüm yapabilme olanağı,
- Türüne göre kullanıp atılabilir olması,
- Aynı anda birden fazla analit derişimini ölçme,
- Düşük numune hacmi,
- Üretiminin kolay olmasıdır.

Biyosensörlerin dezavantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir.^{71,73,80}

- biyolojik materyalin denatürasyonundan dolayı ısı ile sterilizasyonun mümkün olmaması,
- biyolojik materyalin (enzim, hücre, antikor, doku, vb.) kararlılığının ortam şartlarından (pH, sıcaklık, iyonlar, vb.) etkilenmesi,
- biyosensördeki hücrelerin, membran yüzeyine difüzlenebilen diğer moleküller tarafından etkisizleştirilmeleri,
- biyoyumluluk sorunlarıdır.

2.3.6. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri

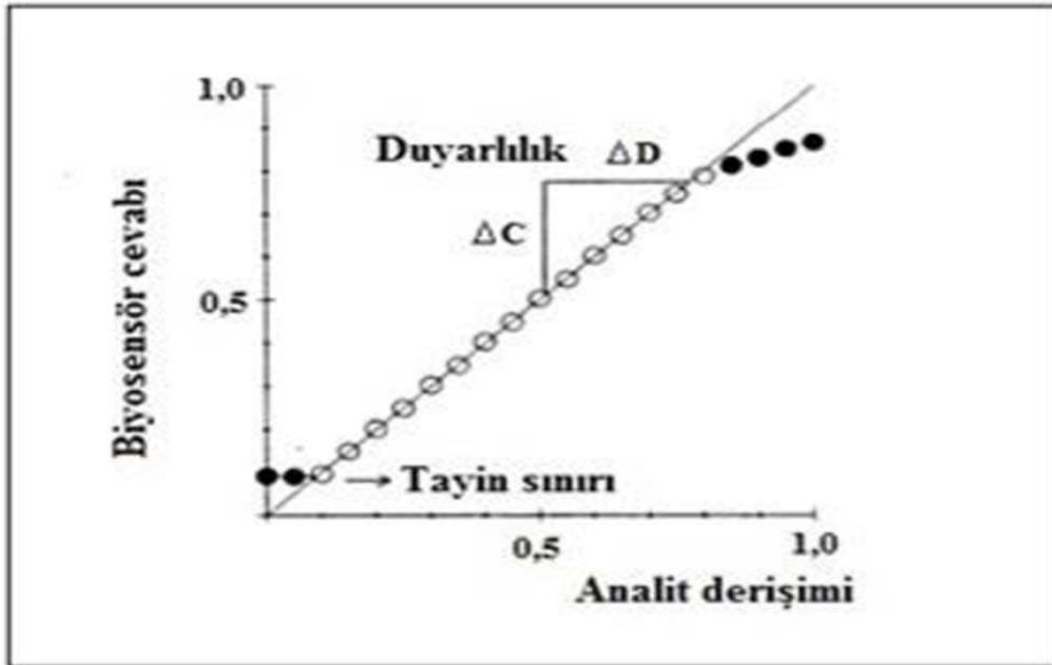
Elektrokimyasal, optik ve diğer biyosensör türlerini en uygun bir şekilde tasarlayabilmek için, ölçüm sisteminin bir takım temel fiziksel özelliklere sahip olması gerekmektedir. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken bu özellikler ve karakteristik davranışlar aşağıda sıralanmaktadır⁸¹.

2.3.6.1. Kalibrasyon Gereksinimi

Kalibrasyon grafiği, bir denge akımına göre düzeltilmiş kararlı hal cevaplarının ölçülmesi ve analit derişimine veya logaritmasına karşı grafiğe geçirilmesi ile çizilir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile biyosensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına doğrusal çalışma aralığı adı verilir. İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gerek duyması istenir. Fakat bu özellik uygulamada gerçekleştirilememiştir. Biyosensör yanıtını etkileyen parametrelerin sensör kalibrasyonunu etkileyeceği bilinmelidir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörlerin, sıklıkla kalibre edilmesi gerekmektedir⁸².

2.3.6.2. Yüksek Duyarlılık

Duyarlılık, genellikle analit derişimindeki değişime (ΔD) bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen değişimin (ΔC) ölçüsü olarak ($\Delta C/\Delta D$) tanımlanmaktadır (Şekil 2.19). Başka bir ifade ile duyarlılık, biyosensörün ne kadar küçük bir değişimi ölçebildiğinin ölçüsüdür. Aynı analit derişimine karşılık ne kadar büyük yanıt elde edilirse duyarlılığın o kadar iyi olduğu bilinmektedir. Duyarlılık akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır yani eğim değeri büyüdükçe duyarlılık da artmaktadır^{73,81,83}.



Şekil 2.19. Bir biyosensör için çizilen kalibrasyon grafiği (Bu grafikte yer alan doğrusal cevap aralığı sembolle, tayin sınırının altında ve daha yüksek derişimlerde doğrusal olmayan aralık“●”sembolle gösterilmektedir.)⁸¹.

Hedef analite yönelik olarak hazırlanan bir biyosensörün etkin duyarlılığını belirleyen pek çok etken vardır. Bunlar; sensörün fiziksel boyutu, membran kalınlığı, örnekten algılayıcı bölgeye kimyasal türlerin kütle transferi ve biyosensörün aktivitesini düşüren çeşitli işlemlerdir. İdeal olarak, bir biyosensörün duyarlılığı kullanım ömrü boyunca değişmemeli ve dönüştürücünün çıkış sinyalinin belirlenebilmesine yetecek kadar yüksek olmalıdır⁷⁶.

2.3.6.3. Geniş Ölçüm Aralığı

Belli bir derişimde standart çözelti ilavesinden sonra ortam kararlılığının bozulması, enzim aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikallerle dolması gibi nedenlerle biyosensör cevabı azalır ve ileriki derişimlerde eklemelerden sonra biyosensör cevabı gözlenmez. Kalibrasyon grafiğinde analit derişimi ile sensör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “**doğrusal aralık**” denir. Doğru ölçümün yapılabilmesi için biyosensör cevabının doğrusal eğilim gösterdiği doğrusal bölgeyi tanımlamak gereklidir. Biyosensör için ölçüm aralığı tanımlanan bu doğrusal aralıktır. Doğrusal aralığın geniş olması biyosensör için avantajdır^{73,83}.

2.3.6.4. Düşük Tayin Sınırı

Biyosensörün cevap verebildiği en küçük derişim değeri tayin sınırı olarak adlandırılır. Belirleme limiti “10 s/m” formülü ile verilir. Burada “m” analit için hazırlanmış kalibrasyon grafiğinin doğrusal bölgedeki eğimini, “s” aynı derişimdeki analitin tepkime ortamına art arda eklenmesiyle oluşan biyosensör cevapların arasındaki standart sapma değerini verir. Düşük tayin sınırı biyosensör için bir avantajdır⁸³. Tayin sınırı, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin analite karşı ilgisi ve biyolojik materyalin immobilizasyonunda kullanılan polimerin kalınlığından etkilenir⁸². Doğrusal tayin aralığının ve tayin sınırının çalışma için uygunluğu, analitin analiz ortamındaki miktarı ve girişim yapabilecek diğer maddelerle birlikteliğinden önemli ölçüde etkilenmektedir⁷³.

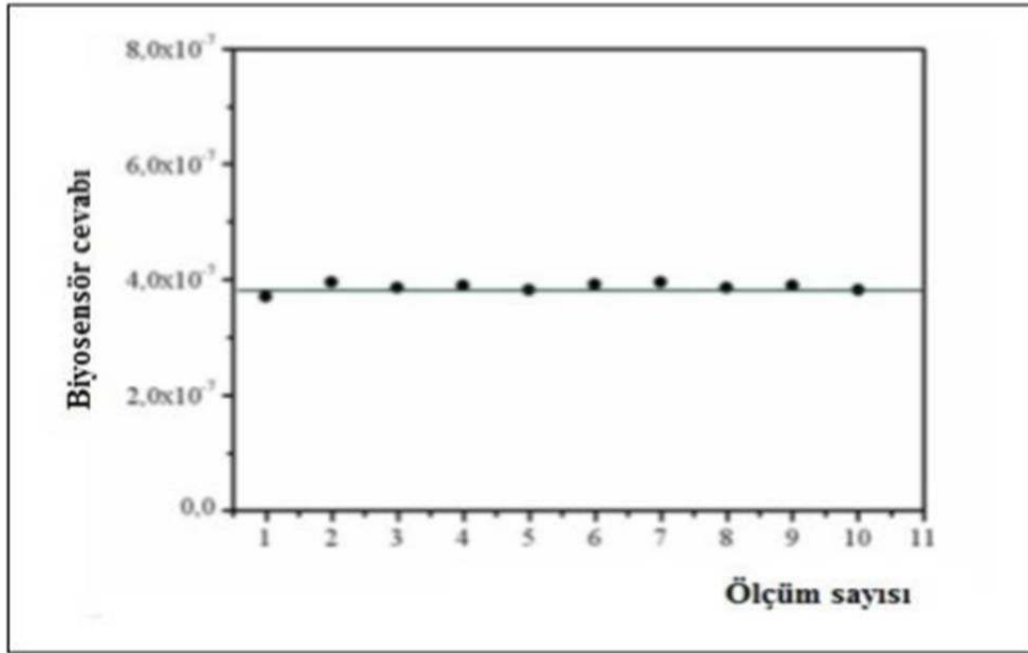
2.3.6.5. Kararlılık

Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH,

sıcaklık, nem, ortam, O₂ derişimi ve enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir⁸².

2.3.6.6. Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan bir biyosensör ile tekrarlanabilirlik çalışması, aynı koşullar altında aynı analit derişimi ile art arda ölçüm yapılması ve elde edilen değerlerden standart sapmanın hesaplanmasını içerir. İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir (Şekil 2.20). Uygulamada pek başarılamayan bu durum göz önüne alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik ölçütü mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensör uygulamalarının o denli iyi olduğun düşünülebilir^{73,84-85}.



Şekil 2.20. Tekrarlanabilirlik grafiği örneği⁸³.

2.3.6.7 Seçicilik

İdeal bir biyosensörde olması gereken en önemli özelliklerden biri de seçiciliktir. Çünkü bu özellik, biyosensörün kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanabilmesine olanak sağlamaktadır. Seçimlilik parametresi diğer analiz sistemleriyle karşılaştırıldığında biyosensörlerin varlık nedenlerinin en ön sıralarında gelmektedir. İdeal bir biyosensör sadece hedef analit derişimindeki değişime

cevap vermeli ve diğer kimyasal türlerin varlığından etkilenmemelidir. Aksi takdirde hedef analit derişiminin tayininde hata meydana gelir. Bu hatayı engellemek için ya girişim yapan madde bir önışlemlerle uzaklaştırılır ya da girişim yapan maddenin etkilemediğı bir sensör geliştirilir. Örneğın; kanda üreyi ölçmek için tasarlanan bir biyosensörde sensör olarak NH_4^+ 'a duyarlı bir iyon seçici elektrodun kullanılması ortamda bulunan Na^+ ve K^+ iyonlarının girişimine neden olur. Buna karşılık sensör olarak NH_3 'a duyarlı bir sensör kullanılması bu sorunu engelleyebilir^{73,81,82}.

Ortaman pH'sı da seçimlilik parametresini etkileyen önemli parametrelerden biridir. pH etkisi hem enzime hem de sensöre değişik şekillerde etkir. Bilindiğı gibi her enzim en yüksek düzeyde aktivite gösterdiği bir optimum pH'ya sahiptir. Bunun yanı sıra ilgili enzimatik tepkimede yüklü substratların söz konusu olması durumunda pH'ya bağılı olarak bu substratların yük durumlarındaki değişimler de seçimlilik üzerine etki edebilir. Ayrıca sensörün de, özellikle bazı tür elektrotlarda optimum cevap için belirli pH gereksinimleri vardır. Ölçüm aralığının da seçimlilik üzerinde bir etkisi vardır. Örneğın; bir ölçüm yapılacak ortamda analit hedef maddenin yanında girişim yapabilecek bir başka maddenin var olması durumunda, hedef maddeye ilişkin tayin aralığı büyük önem taşır. Oldukça düşük derişimlere inebilen bir tayin aralığında, örnekteki hedef maddenin önemli ölçüde seyreltilerek tayinine olanak varsa, girişim yapan maddenin derişimini bu işlemler sonucunda tayin sınırları dışına çıkarılması mümkün olabilmektedir. Bu durum sonuçta seçimliliğe önemli bir katkı sağlar⁷³. Girişim etkisini en aza indirgemenin başka diğer yolları:

- mümkün olabilecek en düşük potansiyelin uygulanması,
- optimal immobilizasyon matrikslerinin ve çapraz bağlayıcılarının kullanılması,
- enzim elektrodun önüne girişimi engelleyen membranların yerleştirilmesi,
- negatif yüklü membranların yerleştirilmesidir⁷¹.

2.3.6.8. Hızlı Yanıt Zamanı

Bir biyosensör ile pratik bir işlem sonucunda kısa sürede sonuç alınabilmesi biyosensörlerin hızla yaygınlaşmasını sağlamıştır. Çok sayıda örneğın söz konusu olduğu rutin analizlerde mümkün olan en az ön işlemlerle en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem arz etmektedir⁷³. Amperometrik uygulamalarda analizi yapılacak bir

madde örneğini çalışma ortamına ilave edilmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir (durgun hal). Akım sabit kaldıktan sonra analit ortama ilave edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir ilaveden önce akım değerinin gene sabit kalması beklenir. Tepkime ortamına analit eklemesi yapıldığı andan akım değişiminin olduğu ve tekrar kararlı hal akımına ulaşıldığı ana kadar geçen zamana “yanıt zamanı” denir. Bir biyosensör elektrodunun yanıt zamanı, elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir⁸².

Bir biyosensörün yanıt süresi aşağıda belirtilen üç aşama tarafından etkilenmektedir. Bunlar;

- substratın analiz ortamından membran yüzeyine difüzyon hızı,
- substratın membran içine difüzyon hızı ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı tepkime verdiği,
- elde edilen ürünün sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzyon hızıdır.

Bu üç olayı etkileyen başlıca unsurlar da çözeltinin karıştırma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi, optimum pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde veya biyoaktif tabaka yüzeyinde herhangi bir membranın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa membranın niteliği, kalınlığı ve morfolojisidir. Bu unsurlardan karıştırma hızının artışı cevap süresini azaltırken, substrat derişimindeki artış uzamasına yol açar. Enzim miktarının artışı ve optimum pH’ya yaklaşma cevap süresini kısaltır. Ancak enzim miktarı artışı biyoaktif tabaka kalınlaşmasına yol açacağı için difüzyon problemini arttırabilir ve cevap süresini uzatır. Bu problem spesifik aktivitesi yüksek enzim preparatlarının kullanımıyla giderilebilir. Sıcaklık difüzyonu olumlu yönde etkileyerek cevap süresinin kısılmasına yol açar. Ancak enzimin optimum sıcaklığından uzaklaşmasının enzim aktivitesinde bir düşmeye sebep olacağı bilinmelidir⁷³.

2.3.6.9. Hızlı Geriye Dönme Zamanı

Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin eklenmesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnekte aynı süre sonra eklenebilecektir⁸⁴.

2.3.6.10. Kullanım Ömrü

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli unsur, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca biyosensörün, kalibrasyon sıklığı, kararlılık, tekrarlanabilirlik gibi diğer ölçütlerini de etkilemektedir⁸². Biyosensörün önemli bir özelliği, normal koşullar altında duyarlılığını koruyabildiği uzun bir kullanım ömrüne sahip olmasıdır. Kullanım ömrü, yapılan toplam ölçüm sayısına veya ölçülen analit derişiminin büyüklüğüne bağlıdır. Yüksek derişimler duyarlılığın daha hızlı bir şekilde düşmesine sebep olabilir. Ayrıca, analit derişimine bağlı olmaksızın, numunelerin içinde deaktivasyon işlemini hızlandıran diğer kimyasal türler de bulunabilir. Bir diğer önemli özellik ise biyosensörün muhafaza edilmesi ve kullanılması arasında geçen zamanın uzunluğudur. Biyosensörün bir buzdolabı ortamında muhafaza edilmesi gerektiği gibi biyolojik bileşenin biyoaktivitesini koruyabilmesi için özel bir kimyasal ortamda saklanması da belirtilmektedir^{80,86}.

2.3.6.11. Basitlik ve Ucuzluk

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler tasarlamak biyosensör yapımında oldukça önemlidir. Maliyet genelde biyosensörün hazırlanması giderleri ile söz konusu biyosensörle yapılan bir analizin giderlerinin toplamıdır. Hazırlanma giderlerinin az olması durumunda genelde analiz başına gelecek gider katkısı azalacaktır⁷³. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş, olabildiğince maliyeti düşürülmüştür. Buna, ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan medyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılması örnek olarak verilebilir⁸².

2.3.6.12. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, akut izleme ve uzun süreli implantasyon gibi tıbbi uygulamalarda kullanılan biyosensörlerde aranan en önemli özelliktir. Bu cihazlar, çeşitli organların dokularına uygulandığında istenmeyen inflamatuvar yanıtlar ve fibröz dokular oluşturabilir. Bu anlamda daha iyi biyouyumluluk gösterebilen biyomateriyallerin geliştirilmesi araştırmaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır⁸¹. Ayrıca biyolojik sıvılarla direkt temas halinde olan biyosensörlerin yüzeyinde

oluşabilecek matriks etkisinden kaynaklanan kirlilik, immobilize biyotabakaya substratın difüzyonunu zorlaştıracığından cevabın yanlış olmasına neden olmaktadır⁷¹.

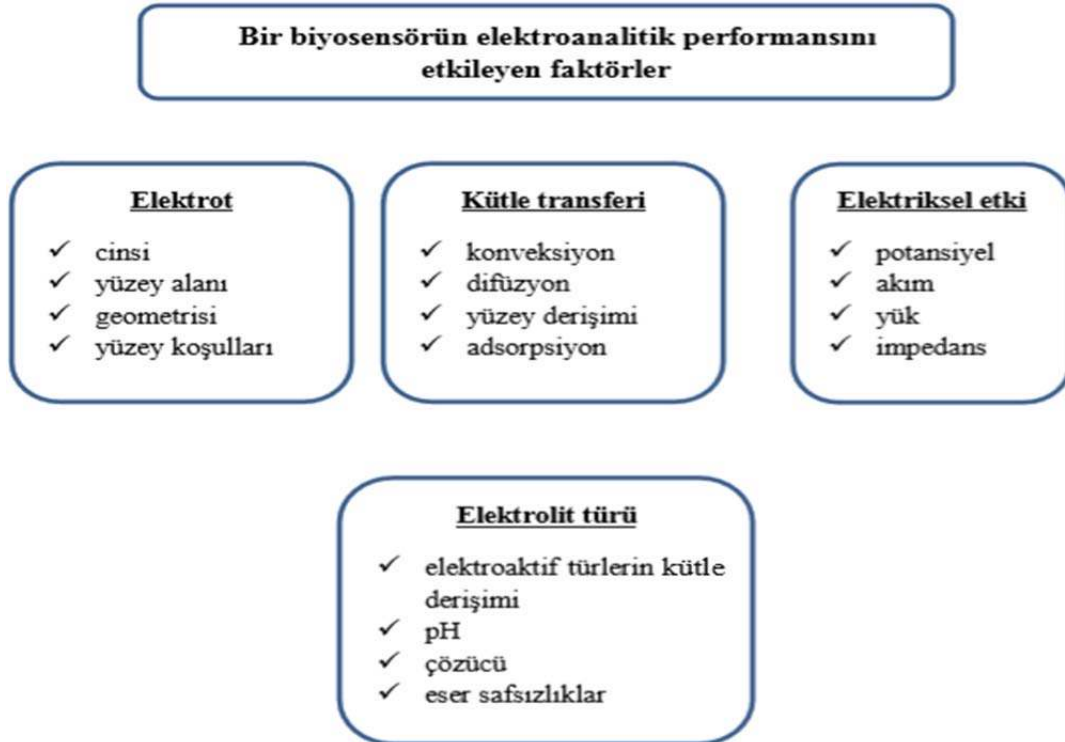
2.3.6.13. Küçültülebilirlik ve Sterilize Edilebilirlik

Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında büyük önem taşımaktadır. Bununla beraber, biyosensör elektrotlarının yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir^{84,87}. Enzim tabakasının koruyucu bir membran tabakasıyla kaplanmasıyla sterilizasyon yapılabilir⁸⁸.

Doğal olarak tüm biyosensörlerin bu özelliklerin hepsine sahip olması olası değildir. Ancak doğru, duyarlı, seçici ve tekrarlanabilir sonuçlar kesinlikle olması gereken özelliklerdir. Bunların dışındaki parametrelerdeki değişiklikler hazırlanan biyosensörün diğer yöntemlere göre avantaj ve dezavantajları olarak düşünülür⁷¹.

2.3.7. Biyosensörlerin Performansını Etkileyebilecek Durumlar

Bir biyosensörün ölçüm sonucu birçok unsurdan etkilenmektedir, bunlar Şekil 2.21’de özetlenmiştir



Şekil 2.21. Biyosensör cevabını etkileyen parametreler⁶⁷.

2.3.8. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler ile; metabolitler, peptitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerin yanında bakteriler, virüsler gibi biyopartiküllerin ve birçok çevre kirleticisi veya gıda kontaminantının yüksek seçicilik ve duyarlılıkla analizi yapılabilmektedir.

Biyosensörlerin kullanım alanları:

- gıda üretimi ve analizleri,
- kalite kontrol,
- endüstriyel proses kontrolü,
- ilaç üretimi ve analizi,
- kriminal analizler,
- klinik diyagnostik, biyomedikal sektör analizleri
- çevre analizleri (endüstriyel atık su kontrolü, hava kirliliğinin kontrolü, vb.),
- tarım ve veterinerlik,
- biyolojik silah ajanlarının tespiti,
- yapay organlar,
- madencilik,
- askeri uygulamalar,
- mekanistik çalışmalar olarak özetlenebilir⁷³.

Bu alanların herhangi birinde kullanılacak biyosensörün tasarımı, ölçüm yaklaşımının amacına bağlıdır. Birçok durumda numune türü biyosensör tasarımını belirlemektedir. Örneğin, kan, kontamine atık su gibi potansiyel zararlı numunelerde, tek kullanımlık sensör türleri tercih edilmektedir. Tek kullanımlık cihazların gereksinimleri çok analiz yapan cihazlara göre farklıdır⁶⁷.

Özellikle biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda piyasaya arz edilen ilk biyosensör şeker hastaları için tasarlanan glukoz biyosensörleridir. Daha sonraki yıllarda, vücuda implant edilebilen biyosensörler geliştirilmiştir. Bu tip biyosensörler biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler ki, özellikle ameliyat esnasında analiz bilgilerinin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Sonuç olarak, sağlık alanında biyosensörler

diyabetten kansere kadar birçok hastalığın tespit edilmesinde ve izlenmesinde kullanılmaktadır.

Çevre için gerekli olan toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır. Gelecekte ilaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörlerin kullanılması söz konusu olacaktır. Bu durumda biyosensörler uyuşturucu arayan köpeklerin yerini alabilir. Bakteriyolojik silahlardaki virüs, bakteri ve toksik ajanlar biyosensörler sayesinde algılanmaktadır. Örneğin, kimyasal savaş maddelerinde bulunan organofosfor bileşikleri, kolinesteraz enzim sensörleri ile tespit edilir.

Enzim sensörleri, biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere monosakkaritler, disakkaritler, amino asitler, organik asitler (laktik asit), üre ve alkol tayinlerinde sıkça kullanılmaktadır. Gıdalardaki yabancı maddeleri (pestisitler, toksinler, yabancı hormonlar vb.) tespit etmenin yanında ayrıca bu sensörler bir de aroma ve tazelik gibi özelliklerin incelenmesinde de kullanılırlar. Günümüzde de gıda zehirlenmelerinin gittikçe artması ile toksik ve mikrobiyal kontaminantların daha hızlı tayinlerine olanak sağlayan biyosensörlere ihtiyaç duyulmaktadır⁷³.

2.3.9. Voltametrik Teknikte Kullanılan Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılan sistem; elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen çözelti içerisine daldırılmış üç elektrottan oluşan sistemin potansiyostata bağlanmasıyla oluşturulur. Bu üç elektrot; tepkimenin gerçekleştiği çalışma elektrodu, potansiyel kontrolünün gerçekleştirildiği referans elektrot ve çalışma elektrodundaki ohm'luk düşmeden kaynaklanan potansiyel değişmesini önlemek için kullanılan yardımcı elektrottan (karşıt elektrot) oluşmaktadır⁸⁹.

2.3.9.1. Çalışma Elektrodu

Yüzeyinde analitin yükseltgenlik veya indirgenlik gösterdiği, potansiyeli analitin derişimine göre değişkenlik gösteren elektroda “çalışma elektrodu” denir.

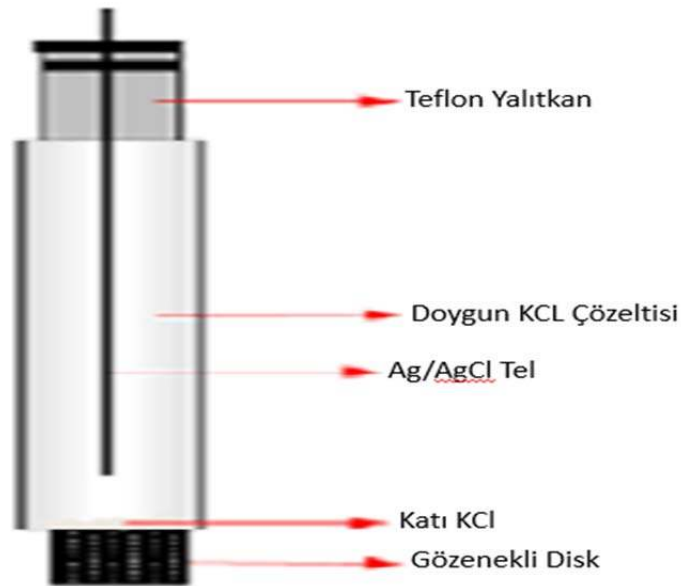
Son zamanlarda platin, gümüş, rutenyum, bakır, palladyum ve altın gibi metaller yaygın bir biçimde katı elektrot olarak elektroanalitik kimyada kullanılmaktadırlar. Geniş potansiyel aralıkları, zengin yüzeyleri ve tekrarlanabilir sonuçları sayesinde birçok maddeyi tanımak ve ortamdaki miktarını tayin etmek için kullanılırlar⁸⁹.

2.3.9.2. Referans Elektrot

Analit çözeltisinin bileşiminden bağımsız sabit bir elektrot potansiyeline sahip bir yarı hücredir ve anot olarak ele alınır. Elektrik direnci çok büyük olduğu için hemen hemen hiç akım geçmez. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrot kullanılır. Bir referans elektrot, kolay hazırlanabilmeli, potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalıdır. Polarize edilemeyen bir elektrot olmalı, potansiyeli zamanla değişmemeli, doğru ve tekrarlanabilir bir potansiyel değerini hızlı bir şekilde gösterebilmelidir⁸⁷.

Referans elektrot olarak “gümüş–gümüş klorür”

Gümüş–gümüş klorür elektrodu, $AgCl + e^- \rightleftharpoons Ag + Cl^-$ tepkimesine dayanır. Bir tüpün en alt kısmında cam veya plastikten yapılmış poroz bir tıpa, bunun üstünde çözelti sızmalarını önlemek için potasyum klorürce doymuş bir köprü, onun üstünde katı potasyum klorür ve en üstte de içine 1–2 damla gümüş nitrat damlatılmış doymuş potasyum klorür çözeltisi mevcuttur (Şekil 2.22). Bu çözeltiye ucu AgCl ile kaplanmış gümüş bir tel daldırılır. Bu elektrodun doymuş kalomel elektroda göre üstünlüğü daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmesi ve daha az analitle tepkimeye girmesidir⁹⁰.



Şekil 2.22. Ag/AgCl elektrodun şematik gösterimi⁹⁰.

2.3.9.3. Karşıt Elektrot

Bu elektrot, çalışma elektroduyla bir çift oluşturmakta ve onu elektronlarla beslemektedir. Ayrıca ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine olanak sağlar. Karşıt elektrot, elektronların elektriğin sinyal kaynağından gelip, çözeltinin içinden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. Karşıt elektrot genellikle helezon şeklinde bir platin tel veya bir civa havuzudur.

Karşıt elektrot olarak “platin tel”

Akım çalışma elektrodu ile platin tel ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında tespit edilir⁸⁹.

2.3.10. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyokomponent, uygun bir immobilizasyon yöntemiyle transdusere bağlanır. Bunun için çok çeşitli immobilizasyon yöntemleri vardır. Seçilecek olan immobilizasyon yöntemi biyokomponent yapısına uygun olarak belirlenir. Genel olarak adsorpsiyon, tutuklama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama yöntemleri tercih edilir.

2.3.10.1. Adsorpsiyon

Bu yöntem, enzim immobilizasyonunda kullanılan en basit ve en eski yöntemlerden biridir. Kararlılığı çok az olduğundan tercih edilmemektedir. Ancak, immobilizasyon işleminin basit oluşu ve immobilizasyon sırasında enzim saflaştırmasına da olanak sağlaması bu yöntemin avantajıdır. Bu yöntemde, biyokomponentin transdüre nonkovalent etkileşimler (hidrojen bağı, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile adsorplanması prensibine dayanır⁹¹.

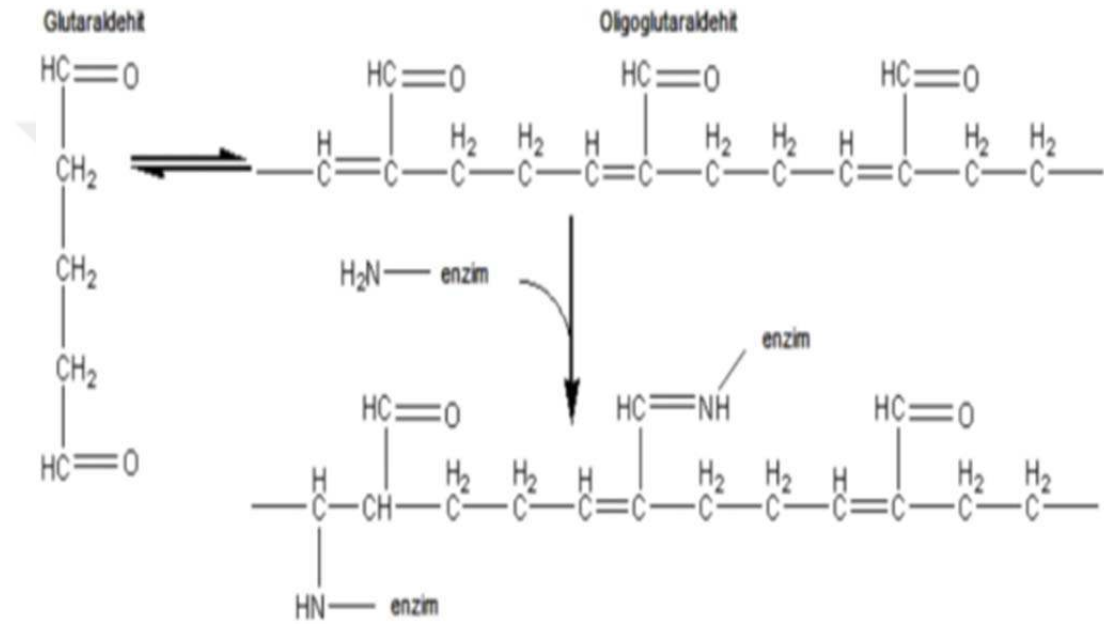
2.3.10.2. Tutuklama

Büyük molekül kütleli biyomoleküllerin, bir membran veya tabaka içinde hapsedilmesi ile yapılan immobilizasyon işlemidir. Enzimler, polimer jel tabakalarda, akrilamit polimerlerinde, silikon ve PVC (Polivinil Klorür)’de tutuklanabilirler⁹².

2.3.10.3. Çapraz Bağlama

Biyomoleküllerin, glutaraldehit ve hekzametilen diizosiyanat gibi reaktiflerin kullanılarak biyokomponent ile absorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturmalarıdır. Aralarında en çok kullanılan çapraz bağlama ajanı glutaraldehittir⁹³.

Kovalent bağlama ile enzim veya protein yapısındaki gibi birçok biyoaktif bileşenlerin önemli immobilizasyon reaksiyonlarından birisi olan glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyon mekanizması şekil 2.23’de görülmektedir.



Şekil 2.23. Glutaraldehit ile enzimlerin amino gruplarının çapraz bağlanması⁹⁴.

2.3.10.4. Kovalent Bağlama

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında bağlanma, enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olmayan gruplar (Tiyol, hidroksil, amino grup, karboksil gibi nükleofilik özelliği olan gruplar) üzerinden gerçekleşir. Bağlanma, molekül içi bağlanma olduğu için oldukça kuvvetli ve sağlamdır. Biyokomponentlerin bu yöntemle immobilizasyonu sıcaklık, pH ve iyon şiddeti gibi dış etkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır⁹².

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıdaki gibidir.

3.1.1. Cihazlar

- Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) Çalışma Elektrodu (CHI, A.B.D)
- Palm Sens Biyosensör (Hollanda)
- Platin Tel Yardımcı Elektrot (CHI 115, A.B.D)
- Ag/AgCl Referans Elektrot (CHI 111, A.B.D)
- P1000 ve P20 Otomatik Pipetleri (Gilson, Fransa)
- Termostatlı su banyosu (Nuve, TR)
- Manyetik Karıştırıcı (Tüv Bayern, Almanya)
- pH Metre (Mettler Toledo)
- Hassas Terazî (Mettler AJ100)
- Sonikatör (Resonik 1016, Türkiye)
- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (QUANTA FEG 650, A.B.D)
- Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR) (Jasco 6700, Japonya)

3.1.2. Kimyasallar

- Monosodyumdihidrojenfosfat NaH_2PO_4 (Merck)
- Disodyumhidrojenfosfat Na_2HPO_4 (Merck)
- Sodyum asetat trihidrat (Merck)
- Asetik asit (%100) (Merck)
- Distile/Bidistile su
- Glutaraldehit (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- HCl (%37) (Sigma)
- Alümina (Sigma)
- Alümina solüsyonları
- %96 Etanol (Sigma)
- Sığır serum albümini (BSA) (Sigma)

- Jelatin (Sigma)
- Demir sülfat (Merck)
- HRP (*Horse radish*-yaban turpu peroksidaz'ı) (256 U/mg) (Sigma P8375)
- H₂O₂ (Hidrojen peroksit) (Tıpkimsan) (%35)
- Hidroksilamin hidroklorür (Merck)

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu: 100 mM Fosfat tamponu hazırlandı (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, Disodyumhidrojenfosfat ve monosodyumdihidrojenfosfat) ve çözeltinin pH'sı 100 mM NaOH ve HCl kullanılarak 7,0'a ayarlandı. Farklı derişimlerdeki ve pH daki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Asetik asit/asetat tamponu: 100 mM Asetik asit/asetat tamponu hazırlandı (Sodyumasetat trihidrat ve asetik asit) ve çözeltinin pH'sı 100 mM NaOH ve HCl kullanılarak 6,0'a ayarlandı. Farklı derişimlerdeki ve pH daki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

HRP enzimi: HRP, yaban turpu köklerinden (*Amoracia rusticana*) izole edilir. Bir çözelti içindeki glukoz ve peroksit miktarlarını belirlemek için geniş kullanım alanı bulmuştur⁸¹.

Deney sırasında kullanılacak olan HRP enziminden 2 mg/dL derişimde stok çözelti hazırlandı ve buzdolabında bekletildi. Çözelti uzun süre kullanılmadığı zaman derin dondurucuda saklandı.

Demir sülfat çözeltisi: Çalışmamızın ilk aşamasında 100 mM ve pH 'sı 6.0 olan asetat tamponunda derişimi 200 µg/dL olan demir sülfat (Ferröz demir) çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra pH ve tampon derişimi optimizasyonları tamamlanarak demir sülfat çözeltisi (Ferröz demir) belirlenen optimum değerlerde hazırlanmış ve kullanılmıştır.

100 mM ve pH'sı 6.0 olan asetat tamponunda, 800 µg/dL ferröz demir içeren ferröz sülfat stok çözeltisinden 200 ml hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde 100 mM asetat tamponu ile seyreltilerek farklı derişimlerde demir sülfat çözeltileri yapıldı. Çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Hidroksilamin hidroklorür çözeltisi (100 mg/dL): Katı haldeki hidroksilamin hidroklorür, optimum derişimi 200 mM ve pH'sı 5,0 olan asetat tamponunda çözölerek derişimi 100 mg/dL olacak şekilde hazırlanmıştır.

Sodyum hidroksit çözeltisi (100 mM): Katı haldeki sodyum hidroksit saf suda çözölerek 100 mM derişimde çözelti hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi (100 mM): Derişik HCl saf su ile seyreltilerek 100 mM derişimde çözelti hazırlandı.

3.2. Örneklem

Tez çalışmamız için, Çukurova Üniversitesi Tıp Faköltesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 3 mart 2017 tarihinde, 62 toplantı sayılı araştırma etiğı izni alındı.

Karşılaştırma deneyi için, Çukurova Üniversitesi Tıp Faköltesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'ndan gerekli tetkikleri yapılarak işlemleri tamamlanmış kan serumu örneklerinden yararlanıldı. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, geliştirdiğimiz kan-serum demiri biyosensörü ile bu örnekler üzerinde deneysel ölçümler gerçekleştirildi. Çukurova Üniversitesi Tıp Faköltesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) kromojenden yararlanılan, spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçölen analizör serum-demir değerleriyle sonuçlarımız karşılaştırıldı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Kanda demir tayinine yönelik biyosensörün hazırlanması

3.3.1.1. Biyosensör temizliğı

Öncelikle Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle temizlendi.

Temizlik aşamaları aşağıda belirtildiğı gibidir.

1. Bir miktar gama alümina solüsyonu kadife yüzey üzerine damlatıldı. Daha sonra Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot, kadife yüzey üzerine hafif bir şekilde halkalar

izerek gezdirildi. Böylece yüzeydeki tabaka veya herhangi bir kirlilik mekanik olarak giderilmiş oldu.

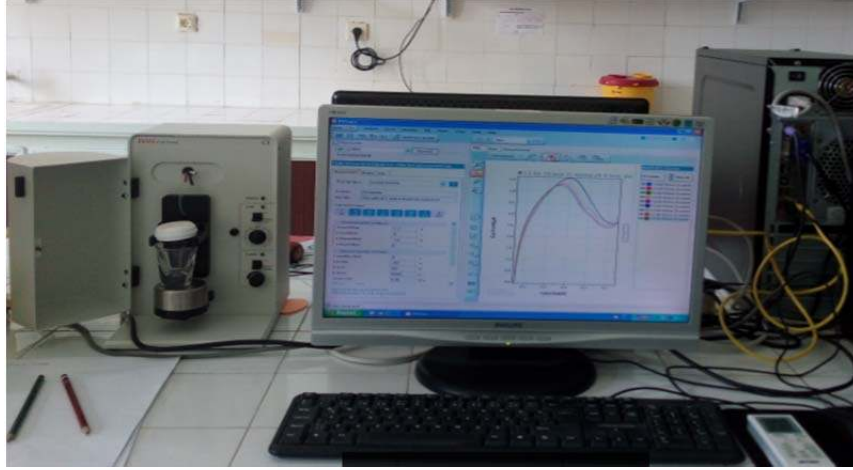
2. $Au(Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-)$ elektrot distile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için 5-10 dk %96'lık etanolde ve sonikatör içinde bekletildi. Tekrar distile suyla durulandı ve sonra 10 dk distile su içerisinde sonikatörde bekletildi.
3. $Au(Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-)$ elektrot yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N HCl zeltisi içerisinde +1,0 ve -1,0 potansiyelleri arasında en az onbeş tane döngüsel voltammogram alındı.

3.3.1.2. Biyosensörün hazırlanması

Biyosensörün biyoaktif tabakasını oluştırmak için;

1. 30 mg BSA ve 45 mg jelatin, pH'sı 6,0 ve derişimi 100 mM olan 300 μ L asetat tamponu içerisinde zlp 35 $^{\circ}$ C'de 20 dakika bekletildi.
2. Karışımın 10 μ L'si, 10 μ L daha önce hazırlanan enzim çözeltisi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 20 μ L olarak altın çalışma elektrodu üzerine yayıldı. Daha sonra zerine 5 μ L %2,5'lik glutaraldehit eklendi ve 1 saat UV ışık altında bekletildi.
3. Son olarak elektrot, pH'sı 6,0 ve derişimi 100 mM olan 5 mL asetat tamponunun bulunduğu tepkime hücresine alındı. Bütün optimizasyon deneyleri aynı koşullarda hazırlanan $Au(Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-)$ elektrot kullanılarak yapıldı.

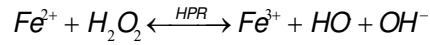
Hazırlanan biyosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzeneğin fotoğrafı şekil 3.1'de verilmiştir.



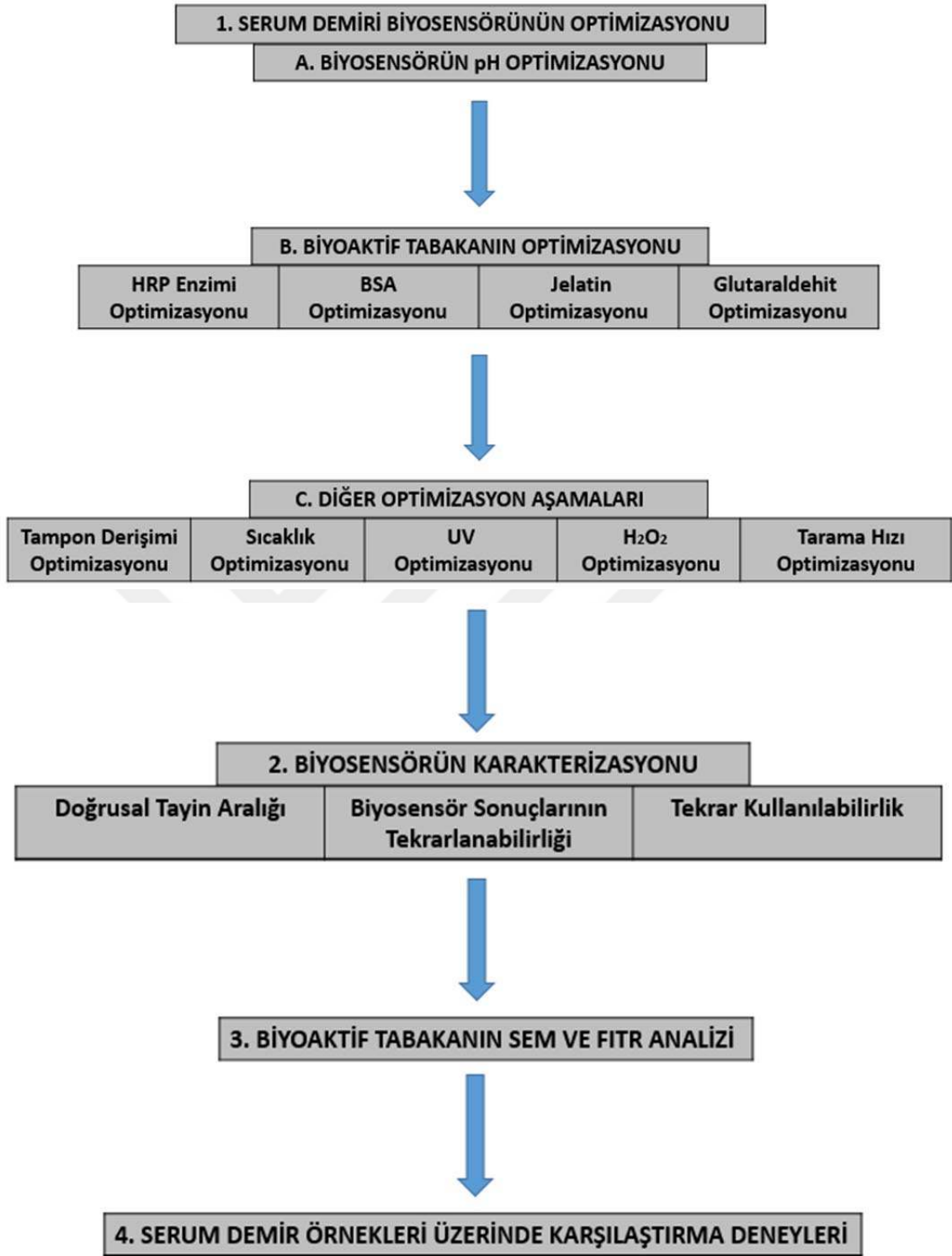
Şekil 3.1. Biyosensör düzeneği

3.3.2. Kan Serumunda Demir Tayini İçin Geliştirilen Biyosensörün Ölçüm Prosedürü

Kan serumu demir tayini için geliştirilen biyosensörün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrottur. Demir tayini için, enzimatik tepkime sonunda ortamdaki arta kalan H_2O_2 derişiminden yararlanılmıştır. H_2O_2 indirgenmesi aşağıda gösterilmiştir¹⁵.



İndirgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında, devreden geçen anodik akım arta kalan H_2O_2 derişimi ile doğru, Fe^{2+} derişimi ile ters orantılıdır. Geliştirdiğimiz kan serum demiri biyosensörü tepkime sonunda arta kalan H_2O_2 derişimini ölçerek analiz etmektedir.



Şekil 3.2. Kan demiri biyosensörünün geliştirilmesinde izlenen basamakları gösteren şema

3.3.3. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Kanda demir tayini için geliştirilen biyosensör için öncelikle en iyi yanıtın elde edilebileceği immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi hedeflendi. Bu amaçla sırası ile pH, enzim derişimi, BSA, jelatin, glutaraldehit, tampon derişimi, H₂O₂ derişimi, ultraviyole ışık süresi ve sıcaklığın biyosensör yanıtı üzerine etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada optimum tampon pH'sı belirlenirken, transferrinin Fe⁺³ serbest bıraktığı pH'lardaki yanıt akımları değerlendirildi. Plazmada taşıyıcı bir protein olan transferrin, pH 5,6'nın altındaki değerlerde Fe³⁺ serbest bırakmaktadır⁹.

Başlangıçta 0,5 mg/mL enzim, pH değeri 6,0 olan 100 mM asetat tamponu, 30 mg BSA, 45 mg jelatin, %2,5 glutaraldehit derişimi, 100 mg/dL H₂O₂, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ (Ferröz sülfat) stok çözeltisi ve 60 dakika ultraviyole ışık süresi sabit tutularak oda sıcaklığında çalışıldı. İmmobilizasyonun her bir parametresinin optimum miktarının belirlenmesi için, diğer değişkenler sabit tutularak sadece optimizasyonu belirlenecek parametre değiştirildi ve hazırlanan biyosensörle ölçümler alındı.

Her bir optimizasyon aşaması için, içerisinde 5 mL 100 mM asetat tamponu bulunan hücreye 200 µg/dL demir içerecek şekilde hazırlanan FeSO₄ (Ferröz sülfat) çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden sırası ile 5'er µL ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiş, optimizasyon sağlandıkça yeni optimizasyon değerleri ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.3.3.1. pH Optimizasyonu

pH değeri 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 ve 6,0 olan 5 mL, 100 mM asetik asit/asetat tampon çözeltileri ile pH değeri 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 8,5 olan 5 mL, 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltileri hazırlandı. Daha sonra her bir pH değeri için ayrı ayrı olmak üzere, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL ölçüm hücresi içerisine, sırası ile ilave edildi. Tampon pH değeri ile yanıt akımı değerlerini gösteren grafik çizilerek optimum biyosensör yanıtının hangi pH'da olduğu gösterildi.

3.3.3.2. Enzim Derişimi Optimizasyonu

Enzim derişimi miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi için, diğer değişkenler sabit tutulmak sureti ile biyoaktif tabakası 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1

mg/mL ve 2 mg/mL enzim derişimi içeren biyosensörler hazırlandı. Daha sonra içerisinde 5 mL, pH'sı 5,0 olan 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edildi. Hazırlanan elektrotlarla yapılan ölçümlerden elde edilen yanıt akımı değerleri ve enzim derişimi arasındaki grafikten optimum enzim derişimi miktarı gösterildi.

3.3.3.3. BSA Derişimi Optimizasyonu

BSA miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi için diğer değişkenler sabit tutulmak sureti ile 15 mg, 30 mg ve 60 mg BSA içeren biyosensörler hazırlandı. Daha sonra içerisinde 5 mL, pH değeri 5,0 olan 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL, sırası ile ilave edildi. Hazırlanan elektrotlarla yapılan ölçümlerden elde edilen yanıt akımı değerleri ve BSA derişimleri arasındaki grafikten optimum BSA miktarı gösterildi.

3.3.3.4. Jelatin Derişimi Optimizasyonu

Hazırlanan biyosensör ile en uygun jelatin miktarının biyosensör yanıtı üzerine etkisini incelemek için, 22,5 mg, 45 mg, 67,5 mg ve 90 mg jelatin derişimi içeren biyosensörler hazırlandı. Daha sonra içerisinde 5 mL, pH'sı 5,0 olan 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edildi. Hazırlanan her bir elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen yanıt akımı değerleri ve jelatin derişimi arasındaki grafikten optimum jelatin miktarı gösterildi.

3.3.3.5. Glutaraldehit Derişiminin Optimizasyonu

Glutaraldehit derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek için diğer değişkenler sabit tutulmak sureti ile %2, %2,5, %3 ve %3,5 oranında glutaraldehit derişimlerinden 5'er µL kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Daha sonra içerisinde 5 mL, pH değeri 5,0 olan 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile

ilave edildi. Elde edilen yanıt akımı değerleri ve glutaraldehit derişimleri arasındaki grafikten optimum glutaraldehit miktarı gösterildi.

3.3.3.6. Tampon Derişimi Optimizasyonu

Hazırlanan biyosensörün optimum pH değeri ve bu pH değerindeki uygun tampon sisteminin belirlenmesinden sonra, tampon derişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisinin saptanması için, farklı derişimlerdeki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi. Bu amaçla bir önceki çalışmada en uygun tampon sistemi olarak belirlenen asetat tamponundan pH'sı 5,0 olan 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 400 mM derişimlerde tamponlar hazırlandı. Daha sonra bu tamponlardan sırası ile ölçüm hücresi içerisine 5 mL alınarak, her bir tampon için ayrı ayrı 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 100 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edildi. Elde edilen yanıt akımı değerleri, tampon derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek optimum tampon derişimi gösterildi.

3.3.3.7. H₂O₂ Derişimi Optimizasyonu

Hazırlanan biyosensörün optimum H₂O₂ derişimi değerinin belirlenmesi için, içerisinde 5 mL, pH değeri 5,0 olan 200 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile her bir ölçüm için ayrı ayrı olmak üzere 10, 50 ve 100 mg/dL H₂O₂ derişimleri kullanılarak 5'er µL eklemelerle bu derişimden uygulandı. Elde edilen yanıt akımı değerleri, H₂O₂ derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek optimum H₂O₂ derişimi gösterildi.

3.3.3.8. UV Işık Süresi Optimizasyonu

Ultraviyole ışık süresinin optimizasyonu için, biyoaktif tabakası 30, 40, 50 ve 60 dk UV ışık sürelerinde hazırlanan biyosensörler kullanıldı. Her bir UV ışık süresi için, içerisinde 5 mL, pH değeri 5,0 olan 200 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 50 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edilerek ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler sonunda elde edilen yanıt akımı değerleri, UV ışık süresine karşı grafiğe geçirilerek optimum UV ışık süresi gösterildi.

3.3.3.9. Sıcaklık Optimizasyonu

Hazırlanan demir biyosensörü ile sıcaklığın biyosensör yanıtı üzerine etkisini incelemek için 30, 35, 40 ve 45 °C'da ölçümler gerçekleştirildi. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için, içerisinde 5 mL, pH değeri 5,0 olan 200 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 50 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL, sırası ile ilave edilerek yanıt akımları elde edildi. Elde edilen yanıt akımları sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek optimum sıcaklık değeri gösterildi.

3.3.3.10. Tarama Hızı Optimizasyonu

Hazırlanan demir biyosensörü ile tarama hızının biyosensör yanıtı üzerine etkisini incelemek için 0,05, 0,06 ve 0,07 V/s tarama hızlarında ölçümler gerçekleştirildi. Optimum tarama hızının belirlenmesi için, içerisinde 5 mL, pH değeri 5,0 olan 200 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 50 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edilerek yanıt akımları elde edildi. Elde edilen yanıt akımları tarama hızına karşı grafiğe geçirilerek optimum tarama hızı değeri gösterildi.

3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleme

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşmelerin sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi prensibine dayanarak görüntü elde eden elektrooptik prensipler kapsamında tasarlanmış bir cihazdır.

Taramalı elektron mikroskobu katı yüzeyinin çok ince bir tabakasının incelenmesi için geliştirilmiştir. Bu incelemeler sonucunda, maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında çok önemli bilgiler elde edilir. Bunun için katı maddenin yüzeyi, çok iyi odaklanmış bir elektron demetiyle ince tabakalar halinde taranır⁹⁵.

Tek kullanımlık $Au(Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-)$ elektrot ve $Au(Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-)$ elektrot üzerine immobilize edilen HRP, BSA ve jelatinden oluşan tabakanın, taramalı elektron mikroskobu ile yüzey fotoğrafları çekildi.

3.3.5. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Verileri

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) proteinler, karbonhidratlar, yağ asitleri, nükleik asitler ve polisakkaridler gibi birçok kimyasal bileşiklerin belirlenmesi ve yapılarının aydınlatılması için kullanılan yöntemlerden biridir.

IR (İnfrared) spektrumlarındaki absorpsiyon bandlarını tanımak için, çeşitli titreşim şekillerine verilen isimleri bilmek gerekir (IR alanda, gönderilen ışınların absorplanmasına temel oluşturan ve enerji gereksinimini yaratan hareketler de bu titreşim hareketleridir). Bunlar gerilme titreşimleri ve eğilme titreşimleri olarak iki grupta toplanırlar. Gerilme titreşimleri: İki atomun ortak eksenleri boyunca birbirine yaklaşma ve uzaklaşma hareketleridir. Eğilme titreşimleri: Atomlar arasındaki bağ açıları değişmelerinden ibarettir^{96,97}

Çizelge 3.1. Bazı FTIR grup frekansları⁹⁸

Grup	Gösterim	Titreşim dalga sayısı aralığı (cm ⁻¹)
O-H gerilme	$\nu(\text{OH})$	3640-3600
N-H gerilme	$\nu(\text{NH})$	3500-3380
C-H gerilme (Aromatik halka)	$\nu(\text{CH})$	3100-3000
C-H gerilme	$\nu(\text{CH})$	3000-2900
CH ₃ gerilme	$\nu(\text{CH}_3)$	2962±10 ve 2872±5
CH ₂ gerilme	$\nu(\text{CH}_2)$	2926±10 ve 2853±10
C=C gerilme	$\nu(\text{CC})$	2260-2100
C=N gerilme	$\nu(\text{CN})$	2200-2000
NH ₂ düzlem içi bükülme	$\delta(\text{NH}_2)$	1600-1540
CH ₂ düzlem içi bükülme	$\delta(\text{CH}_2)$	1465-1450
CH ₃ düzlem içi bükülme	$\delta(\text{CH}_3)$	1450-1375
C-S gerilme	$\nu(\text{CS})$	1200-1050
C-H düzlem dışı bükülme	$\gamma(\text{CH})$	650-800

Demir biyosensörünün yapısını aydınlatmak için HRP, HRP-BSA-jelatin karışımı ve HRP-BSA-jelatin-glutaraldehit karışımlarının FTIR spektrumu alındı.

3.3.6. Geliştirilen Demir Biyosensörünün Karakterizasyonu

Demir biyosensörü için kullanılan biyobileşenlerin immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonları yapıldıktan sonra biyosensörlerin karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.

3.3.6.1. Substrat Derişiminin Etkisi ve Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Hazırladığımız demir biyosensörünün substrat derişiminine etkisini belirlemek için, 5 mL, pH'sı 5,0 olan 200 mM asetat tamponun bulunduğu ölçüm hücresi içerisine 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600 ve 800 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltilerinden 5 µL eklenerek her defasında 50 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5 µL ilave edilerek yanıt akımları elde edildi. Bulunan değerler ferröz demir derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek biyosensörün çalışma aralığı belirlendi.

3.3.6.2. Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliği

Demir biyosensörü yanıtının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, her ölçümden sonra tekrar eklenen ve 5 mL, pH'sı 5,0 olan 200 mM asetat tamponun bulunduğu ölçüm hücresi içerisine, 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 50 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edilerek yanıt akımları elde edildi. On kez aynı biyosensör ile ölçüm yapılarak elde edilen yanıt akımları ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi.

3.3.6.3. Biyosensör Yanıtının Tekrarlanabilirliği

Bu çalışmada demir tayini için geliştirilen biyosensörün ölçüm sonuçlarının güvenilirliğini belirlemek için ölçüm kalitesi araştırıldı. Her ölçüm için, biyosensörümüzün biyoaktif tabakası yeniden hazırlandı. Daha sonra 5 mL, pH'sı 5,0 olan 200 mM asetat tamponun bulunduğu çalışma hücresi içerisine 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 50 mg/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edilerek yanıt akımları elde edildi. On kez tekrar edilen ölçümlere ait ortalama değer (X), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (%VK) belirlenmiştir.

3.3.7. Kanda (İnsan serumunda) Demir Tayininlerinin Karşılaştırılması

Kan serumunda demir tayini başta anemiler olmak üzere çeşitli demir metabolizma hastalıklarının teşhisi, taraması ve takibinde kullanılmaktadır. Her insan plazmasında demir seviyesinin belli bir aralıkta olması gerekmektedir. Serum demiri derişimi referans aralığı 50-120 µg/dL' dir.

Dengeye getirilen biyosensörümüzün gerçek numuneler üzerine yanıt akımlarını incelemek amacıyla 0,06 V/s çalışma potansiyelinde, 5 mL, pH'ı 5,0 olan 200 mM

asetat tamponu içerisine 25 farklı örnekten sağlanan 5'er μL serum numunesi eklenerek yaklaşık 1'er dakika beklenmiştir. Bu sürede taşıyıcı bir protein olan transferrinin pH 5,0'da ferrik demiri serbest bırakması sağlanmıştır. Her hücreye daha sonra sırası ile derişimi 100 mg/dL olan hidroksilamin hidroklorür çözeltisinden ve derişimi 50 mg/dL olan H_2O_2 çözeltisinden 5'er μL hücre içerisine sırası ile ilave edilerek alınan yanıt akımları kaydedilmiştir. Kaydedilen yanıt akım değerleri incelenmiş ve serumundaki ferrik demir konsantrasyonu, biyosensörün kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır.



4. BULGULAR

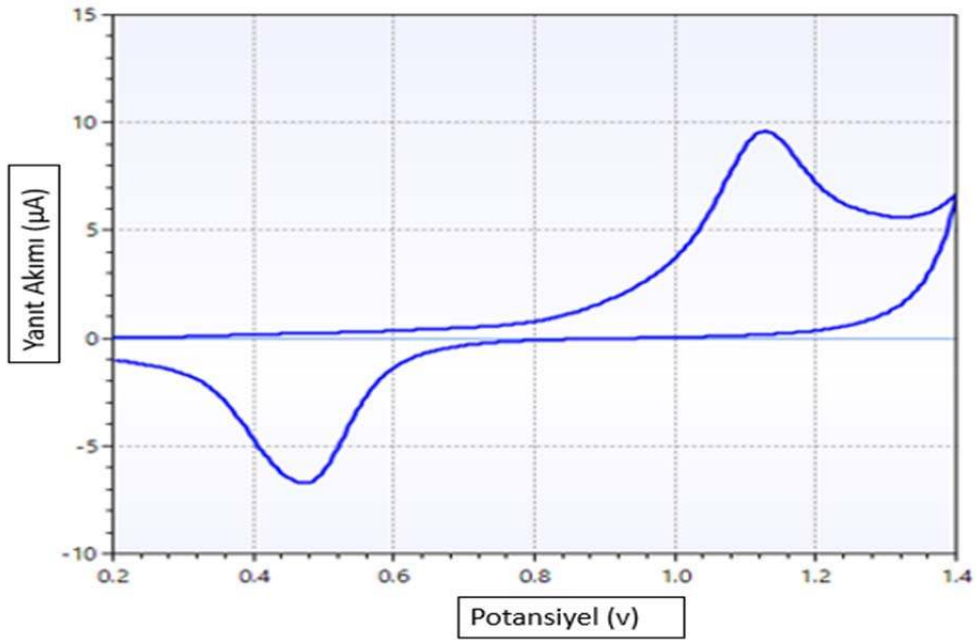
4.1. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Tıp alanında rutin analizlerde kullanılan ve fazla maliyet getiren yöntemlerin yerine; daha ucuz, daha kısa sürede yanıt verebilen ve daha az örneğin yeterli olduğu biyosensörlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla geliştireceğimiz kan serumu demir biyosensörü pratikte uygulanmaya başladığı zaman, tıp alanına ve ülke ekonomisine önemli katkı sağlayacaktır.

Demir tayini için tasarlanan biyosensörün ideal ölçüm koşullarını saptamak için, daha önceden HRP enzimi ve kan demiri tayini ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışmalar göz önüne alındı. Değerler saptandıkça optimum değerler kullanılmaya başlandı.

4.1.1. Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Çalışmamızın yöntemi HRP enziminin, substrat olarak H_2O_2 'i kullanmasına dayanmaktadır. Çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla daha önceden yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınmıştır. Biyoaktif tabaka, Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine HRP enzimi, BSA, jelatin ve glutaraldehit'in UV ışık yardımıyla immobilize edilmesi ile hazırlandı. Hazırlanan biyosensörde kutupların bir ucu elektroda diğer ucu ise ölçüm hücresine daldırılarak sabitlendi ve Şekil 4.1'de görülen döngüsel voltammogram elde edildi.



Şekil 4.1. Döngüsel voltammogram

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

t equilibration : 10 s

E begin: 0,2 V

E vertex1: 0,2 V

E vertex2: 1,4 v

E step: 0,004 V

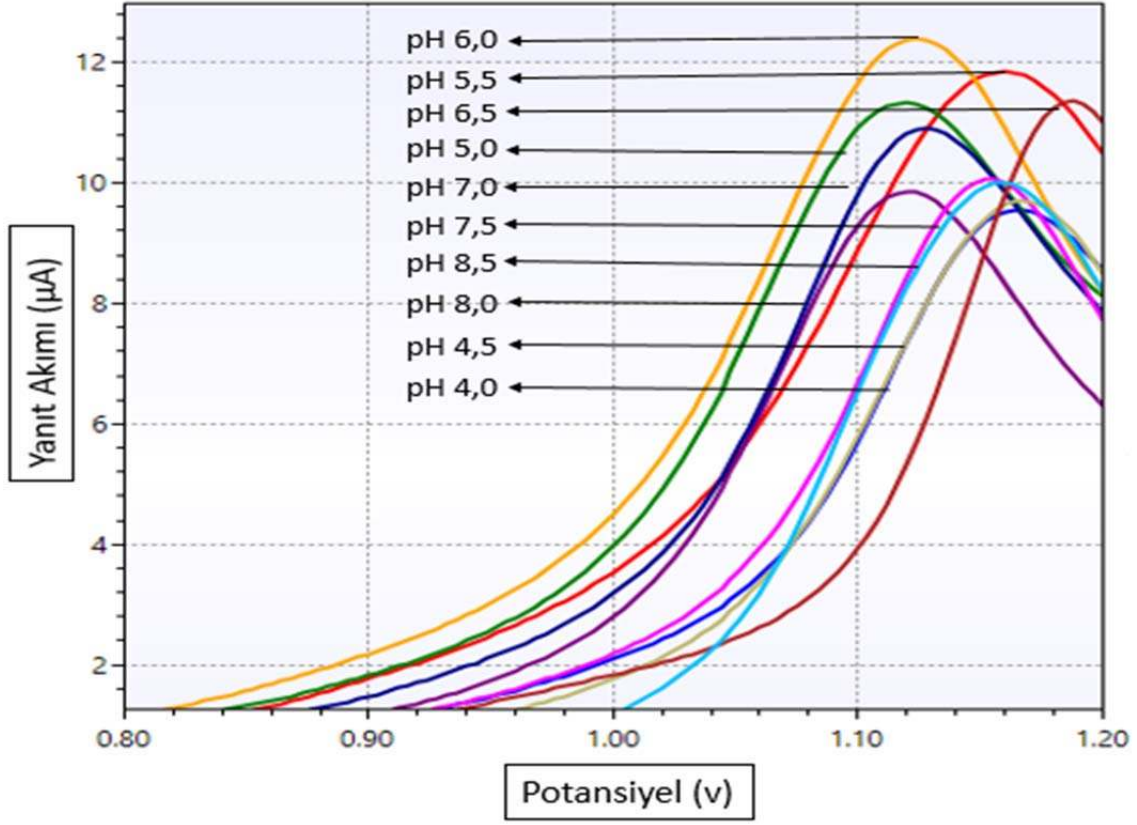
Scan rate: 0,06 V/s

Number of scans: 1

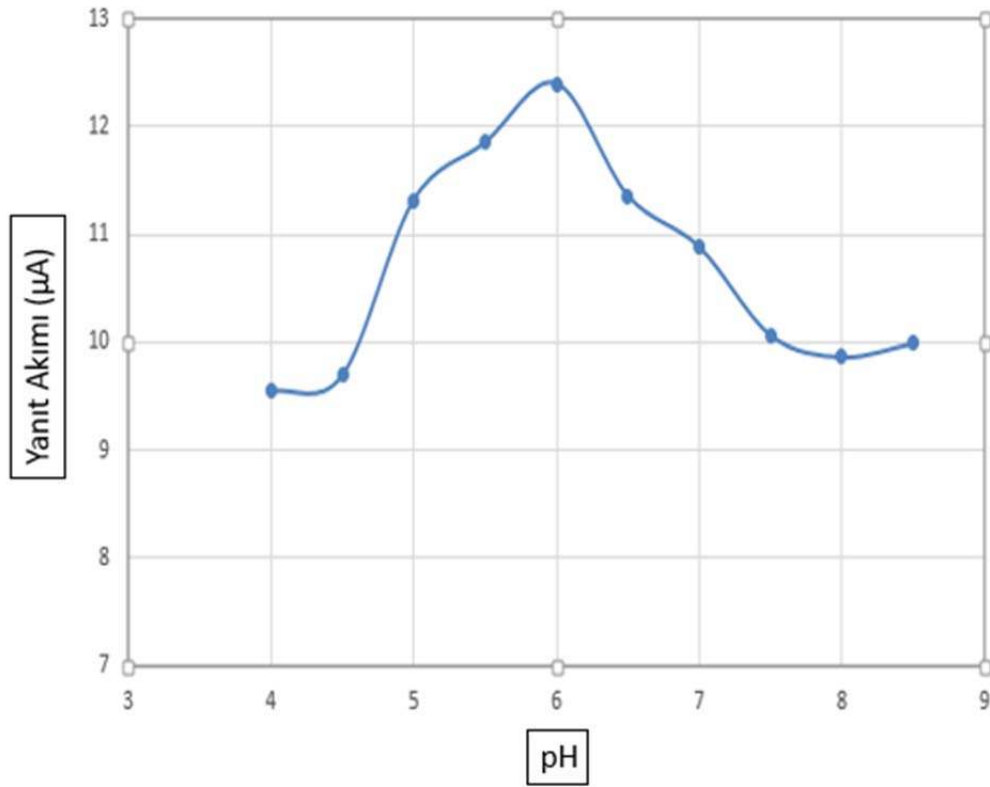
4.1.2. Çalışma Tamponu ve Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Çalışma tamponu ve optimum pH değerinin belirlenmesi için, pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; ve 6,0'da 100 mM asetik asit/asetat tampon çözeltileri ile pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 8,5'de olan 100 mM sodyum fosfat tamponlarında ölçümler yapılarak Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.2).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin pH'e karşı grafiği Şekil 4.3'de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.2. pH değişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.



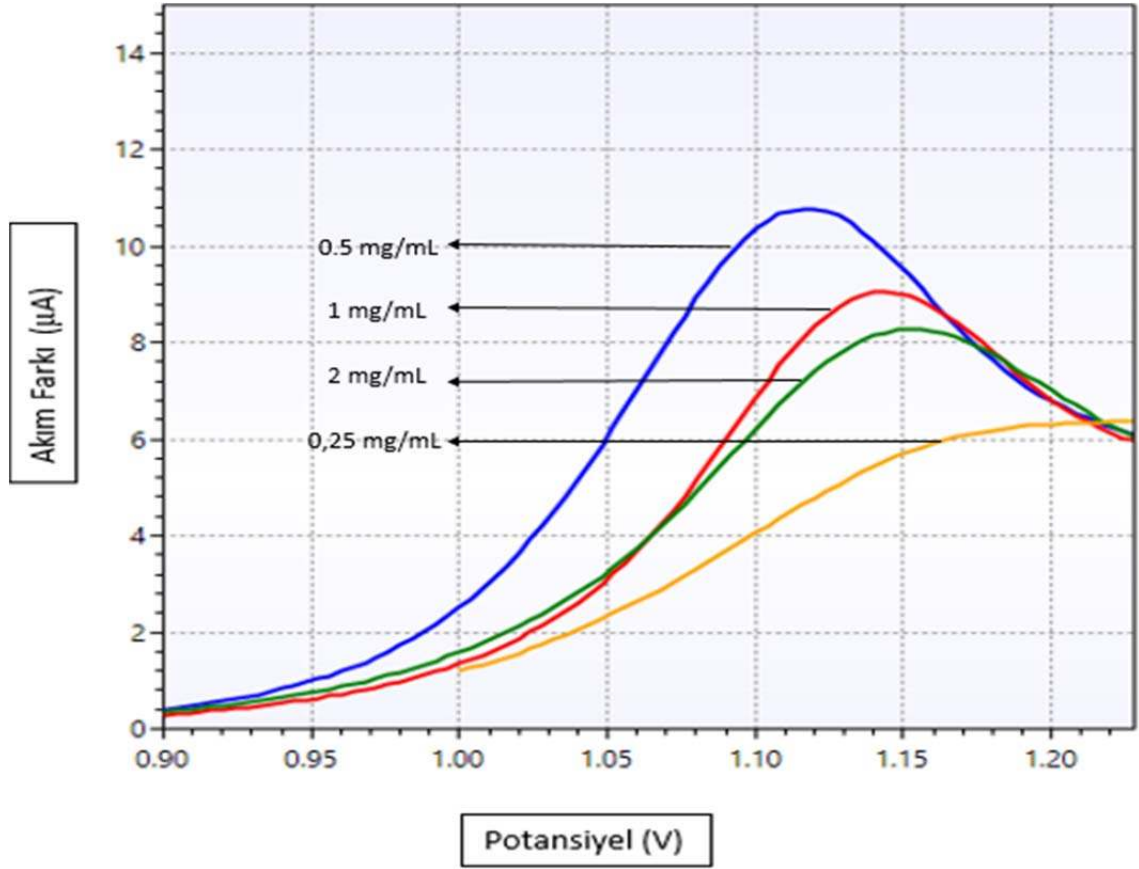
Şekil 4.3. pH değişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.

Maksimum ölçüm değeri 5 mL, pH 6,0'da 100 mM asetat tamponunda elde edildi. Fakat biyolojik sıvılarda Fe^{3+} derişimi ölçümü amaçlandığından, tranferrinin Fe^{3+} 'ü 5,5'in altındaki pH'larda serbest bırakması nedeni ile ve HRP enziminin katalitik aktivitesi devam ettiği için, çalışmamıza pH'sı 5,0 olan 100 mM asetat tamponunda devam edildi.

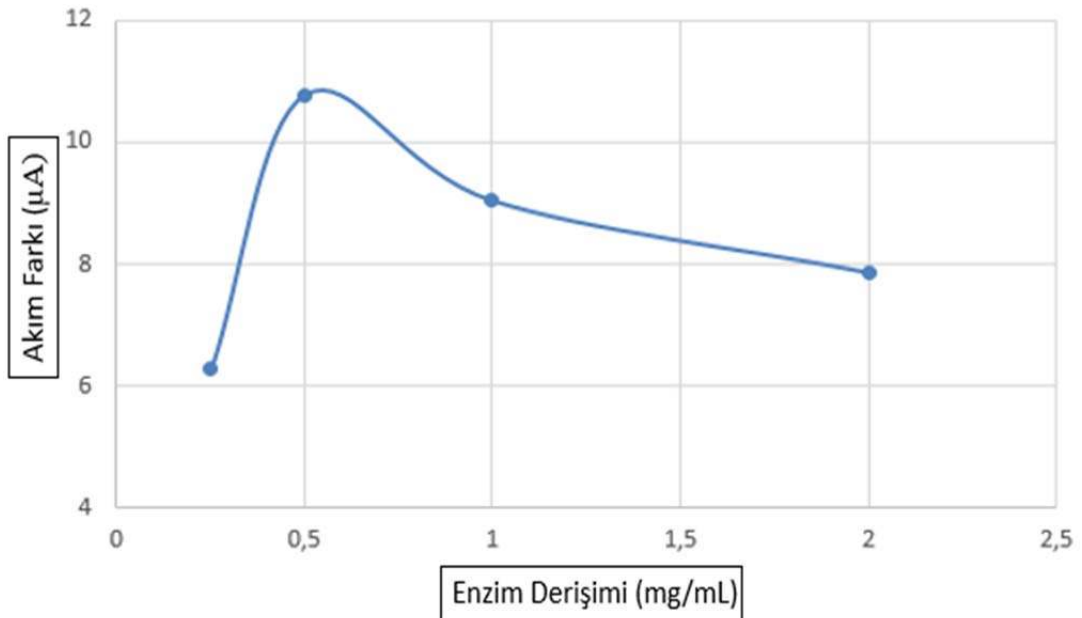
4.1.3 Optimum Enzim Derişiminin Belirlenmesi

Optimum enzim derişiminin belirlenmesi amacı ile 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 2 mg/mL derişimdeki ve sırası ile 64, 128, 256 ve 512 U/mg enzim aktivitesi içeren HRP enzim değerlerinde ölçümler alınarak Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.4).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin enzim derişimine karşı grafiği Şekil 4.5' de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.4. Enzim derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Linear Sweep gösterimi



Şekil 4.5. Optimum enzim derişiminin bulunması amacıyla değişik enzim derişimlerinin biyosensör yanıt akımı üzerine etkisi

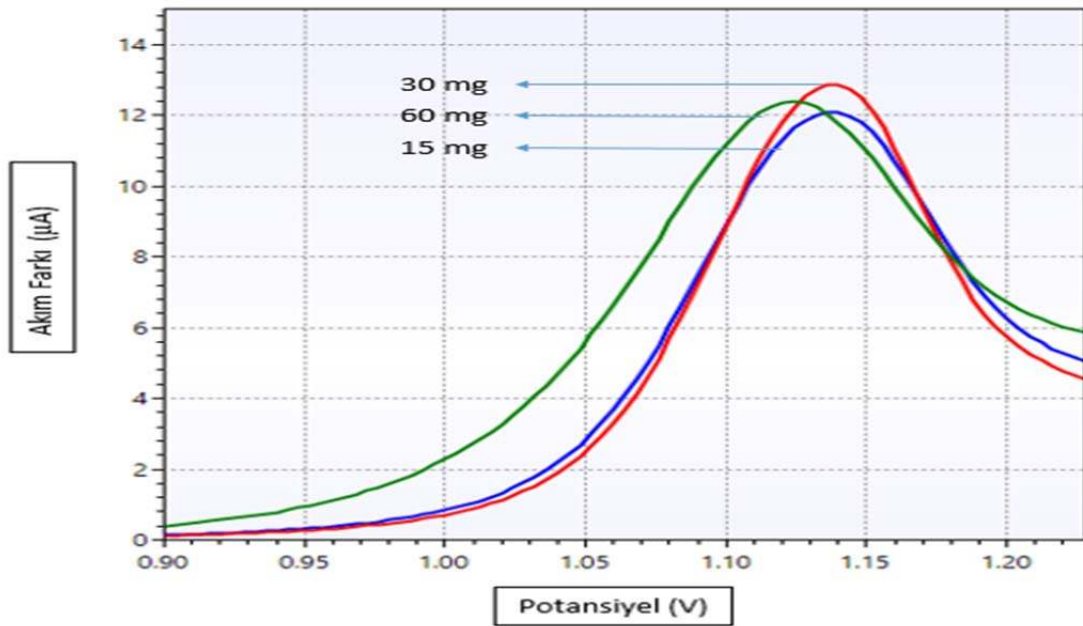
Şekil 4.5’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip enzim miktarının 0,5 mg/mL (128 U/mg) HRP enzim derişiminde olduğu saptanmıştır. Bundan sonraki çalışmalara 0,5 mg/mL (128 U/mg) HRP enzim derişimi kullanılarak devam edildi.

4.1.4. Optimum BSA Derişiminin Belirlenmesi

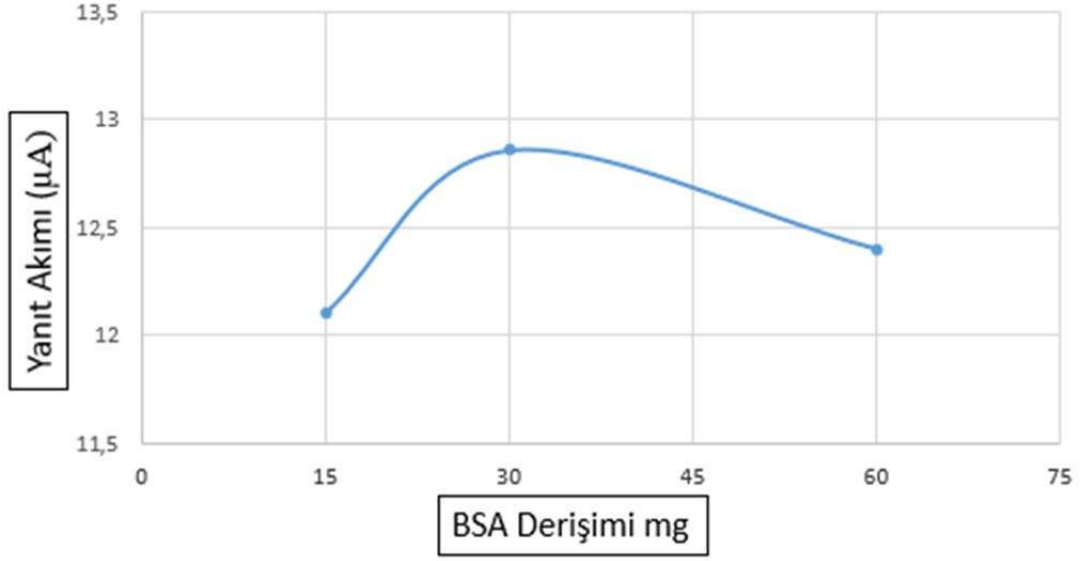
Optimizasyon çalışmalarından elde ettiğimiz; 5 mL, pH’sı 5,0 olan 100 mM asetat tamponu ve 0,5 mg/mL enzim derişimi kullanıldı. BSA, jelatin ve glutaraldehit değeri saptandıka bulunan optimum değeri kullanılmaya başlandı.

BSA miktarı 15, 30 ve 60 mg olan özeltiiler ile hazırlanan üç farklı BSA-jelatin/HRP/glutaraldehit modifiye biyosensörü ile yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğriiiler elde edildi (Şekil 4.6).

Eğriilere ait maksimum yanıt akımı değeriinin sığır serum albumin derişimine karşı grafiğı, Şekil 4.7’ de gösterildiğı gibidir.



Şekil 4.6. BSA miktarının biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi



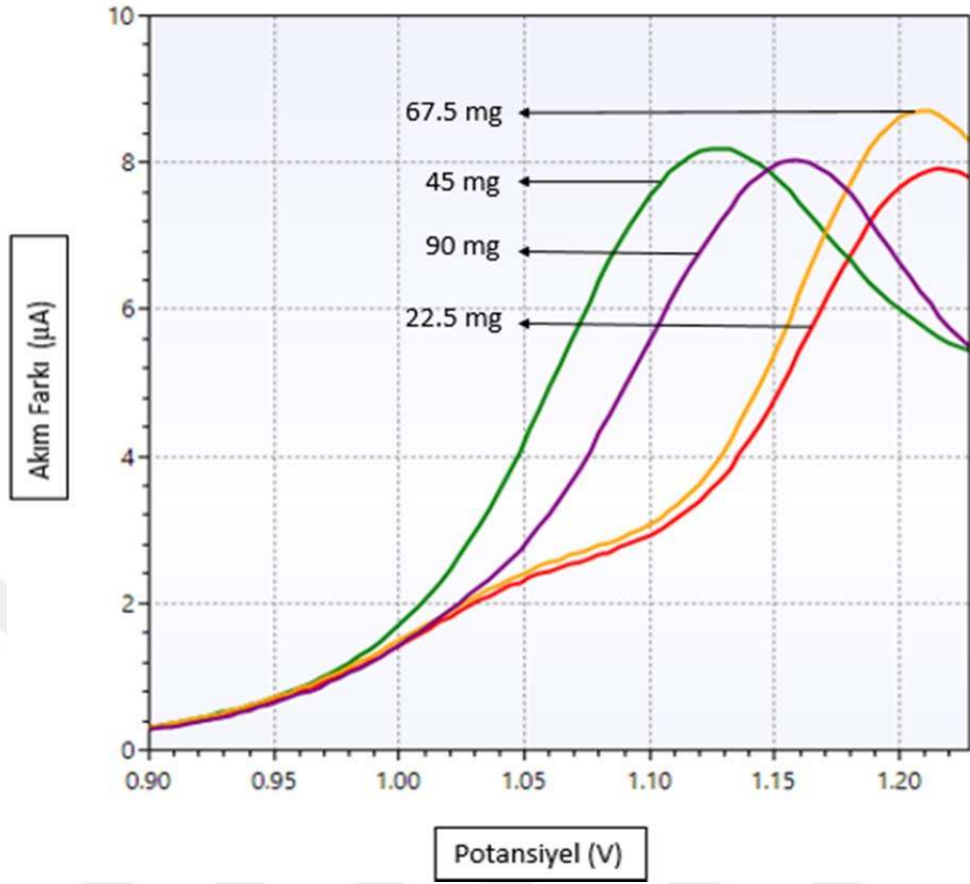
Şekil 4.7. BSA miktarındaki derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.

Şekil 4.7’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip BSA miktarının 30 mg olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara 30 mg BSA derişimi kullanılarak devam edildi.

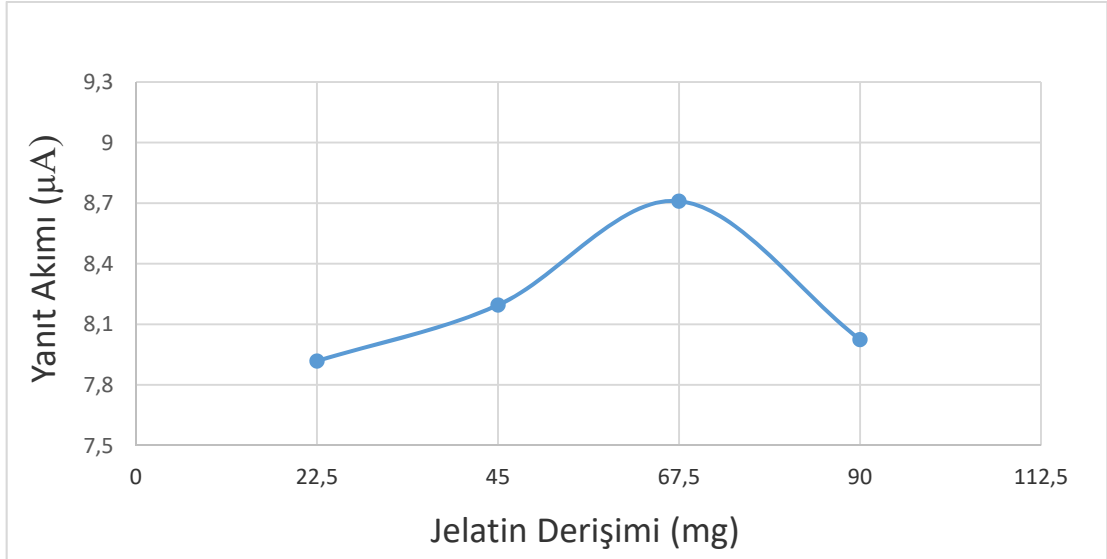
4.1.5. Optimum Jelatin Derişiminin Belirlenmesi

Jelatin miktarı 22,5, 45, 67,5 ve 90 mg olan çözeltiler kullanarak hazırlanan dört farklı BSA-jelatin/HRP/glutaraldehit modifiye biyosensörü ile yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.8).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin jelatin derişimine karşı grafiği Şekil 4.9’ da gösterildiği gibidir.



Şekil 4.8. Jelatin derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi



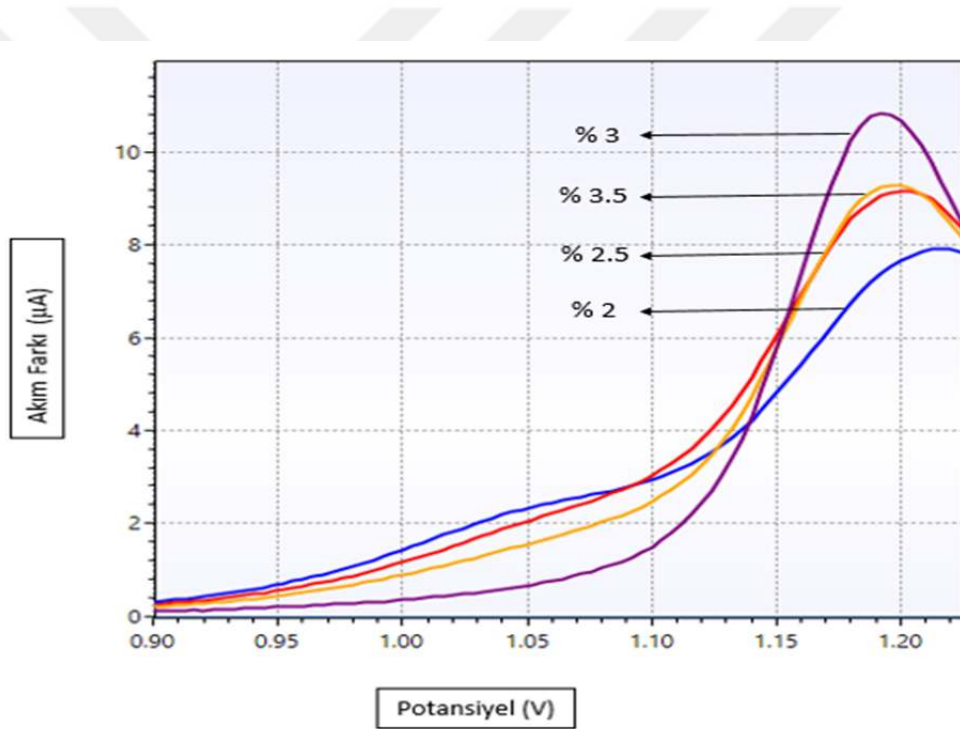
Şekil 4.9. Jelatin derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi

Şekil 4.9’da elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip jelatin miktarının 67,5 mg olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara 67,5 mg jelatin derişimi kullanılarak devam edildi.

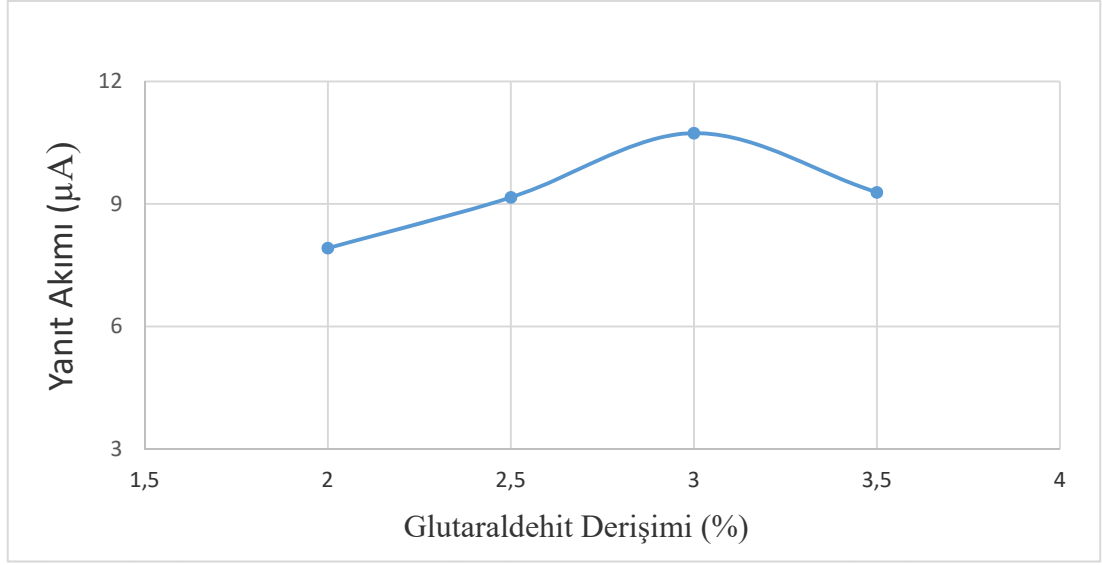
4.1.6. Optimum Glutaraldehit Derişiminin Belirlenmesi

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehitin %2, %2,5, %3 ve %3,5 olan çözeltileri kullanılarak hazırlanan BSA-jelatin/HRP/glutaraldehit modifiye biyosensörü ile yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.10).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin glutaraldehit derişimine karşı grafiği Şekil 4.11’ de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.10. Glutaraldehit derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep Gösterimi.



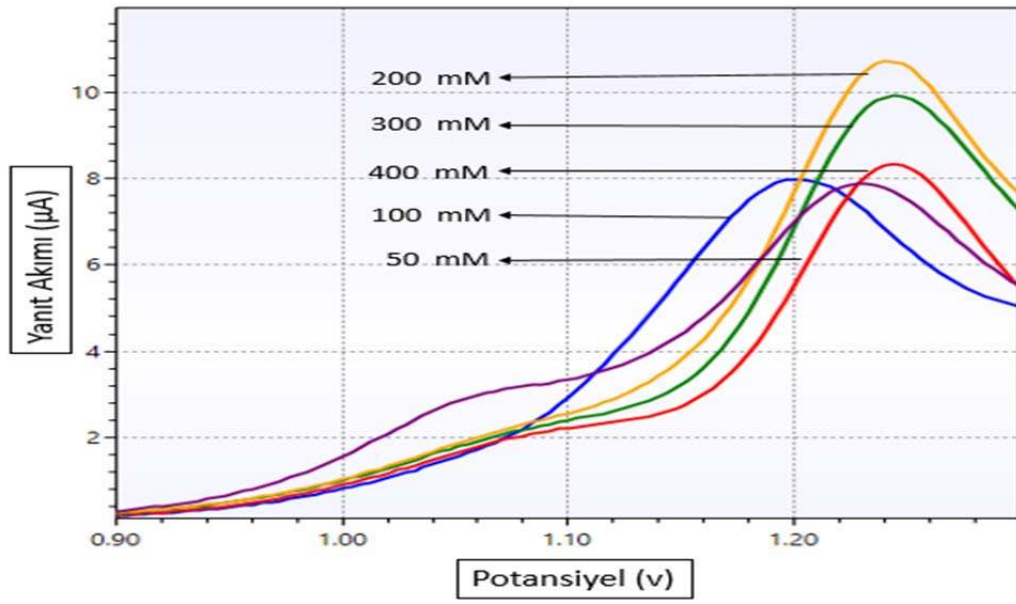
Şekil 4.11. Glutaraldehyt derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisi

Şekil 4.11’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip glutaraldehyt derişiminin %3 olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara %3 glutaraldehyt derişimi kullanılarak devam edildi.

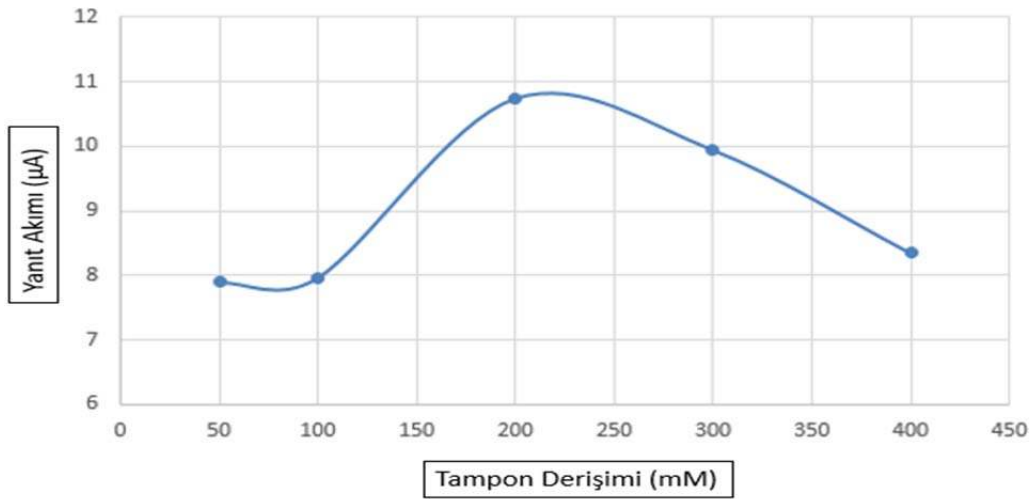
4.1.7. Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Optimum tampon derişiminin belirlenmesi amacıyla 5 mL, pH 5,0’da derişimi 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 400 mM olan asetat tamponları kullanılarak yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.12).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin tampon derişimine karşı grafiği Şekil 4.13’ de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.12. Tampon derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi



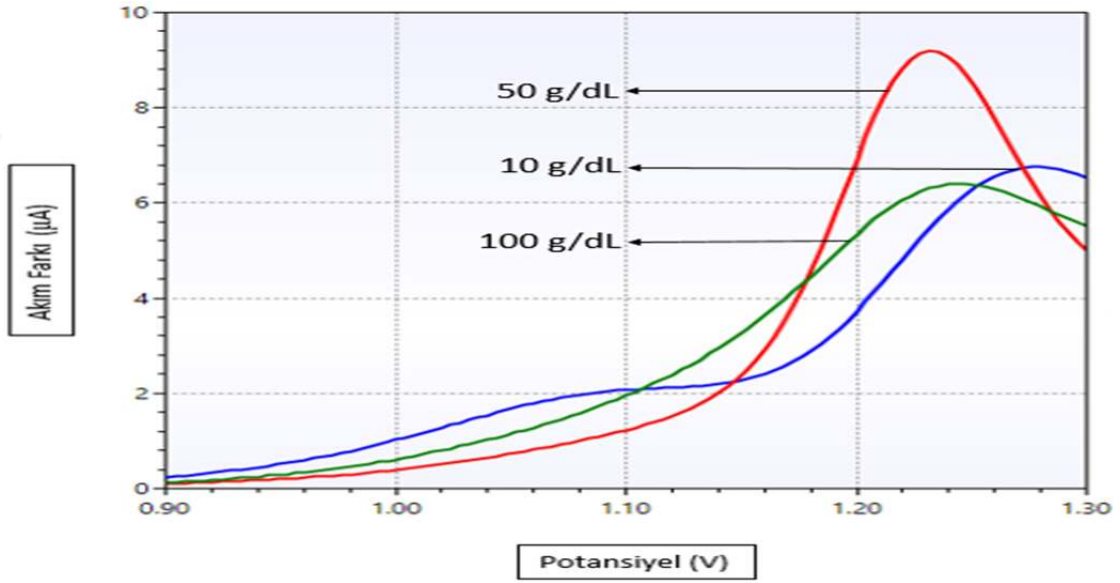
Şekil 4.13. Optimum tampon derişiminin bulunması amacıyla değişik tampon derişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.

Şekil 4.13’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip tampon derişiminin 200 mM olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara derişimi 200 mM olan asetat tamponu kullanılarak devam edildi

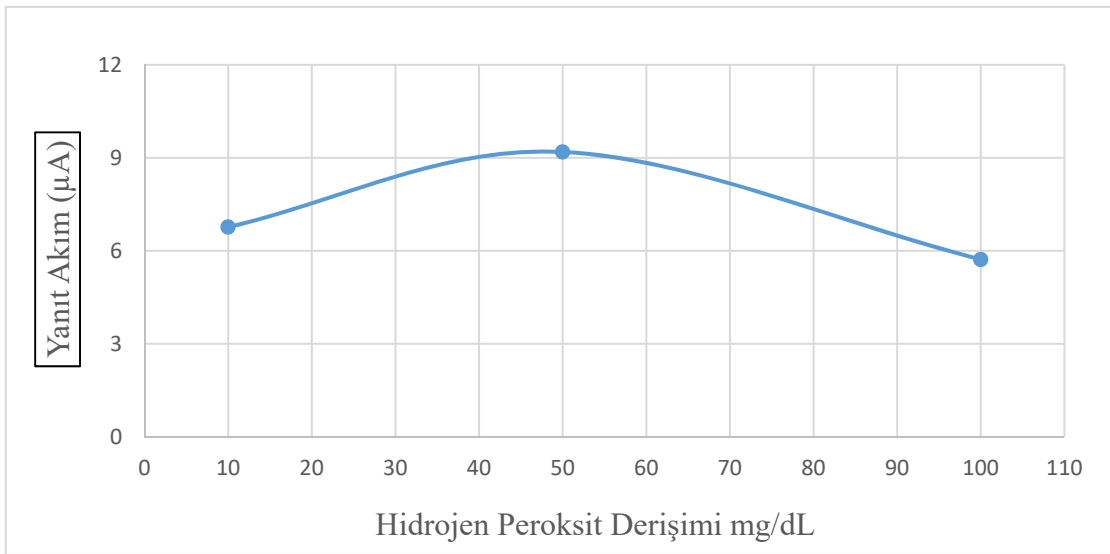
4.1.8. Optimum H_2O_2 Derişiminin Belirlenmesi

Ölçümlerde kullanılacak optimum H_2O_2 derişimi değerin belirlenmesi için, 5 mL, pH 5,0'da derişimi 200 mM, olan asetat tamponunda 10, 50 ve 100 mg/dL H_2O_2 derişimleri kullanılarak yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.14).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerin H_2O_2 derişimine karşı grafiğı Şekil 4.15' de gösterildiğı gibidir.



Şekil 4.14. H_2O_2 derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.



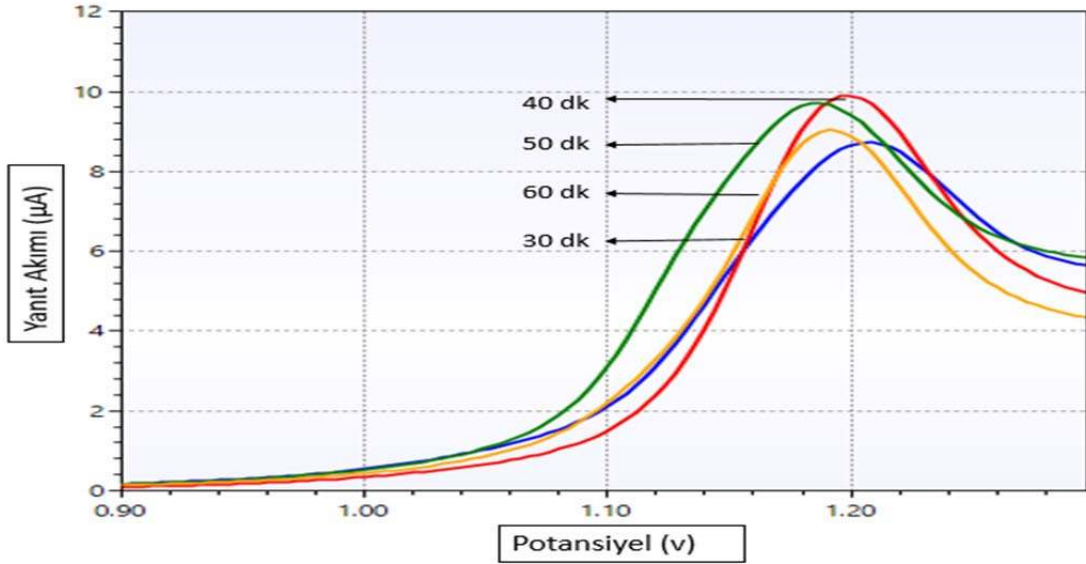
Şekil 4.15. Geliştirilen biyosensör için H_2O_2 derişimi eğrisi.

Şekil 4.15’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip H_2O_2 derişiminin 50 mg/dL olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara derişimi 50 mg/dL olan H_2O_2 kullanılarak devam edildi.

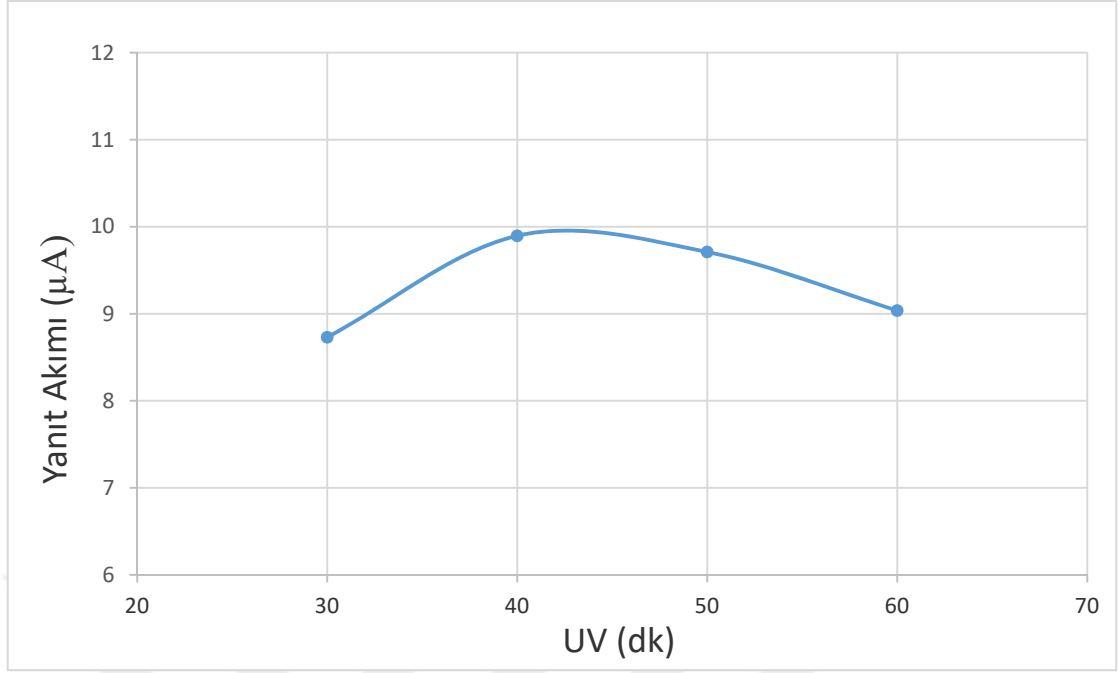
4.1.9. Optimum UV Işık Süresinin Belirlenmesi

UV ışık süresinin optimizasyonu için, biyoaktif tabakası 30, 40, 50 ve 60 dk UV ışık süreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.16).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin UV ışık süresine karşı grafiği Şekil 4.17’ de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.16. UV ışık etkisi süresinin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.



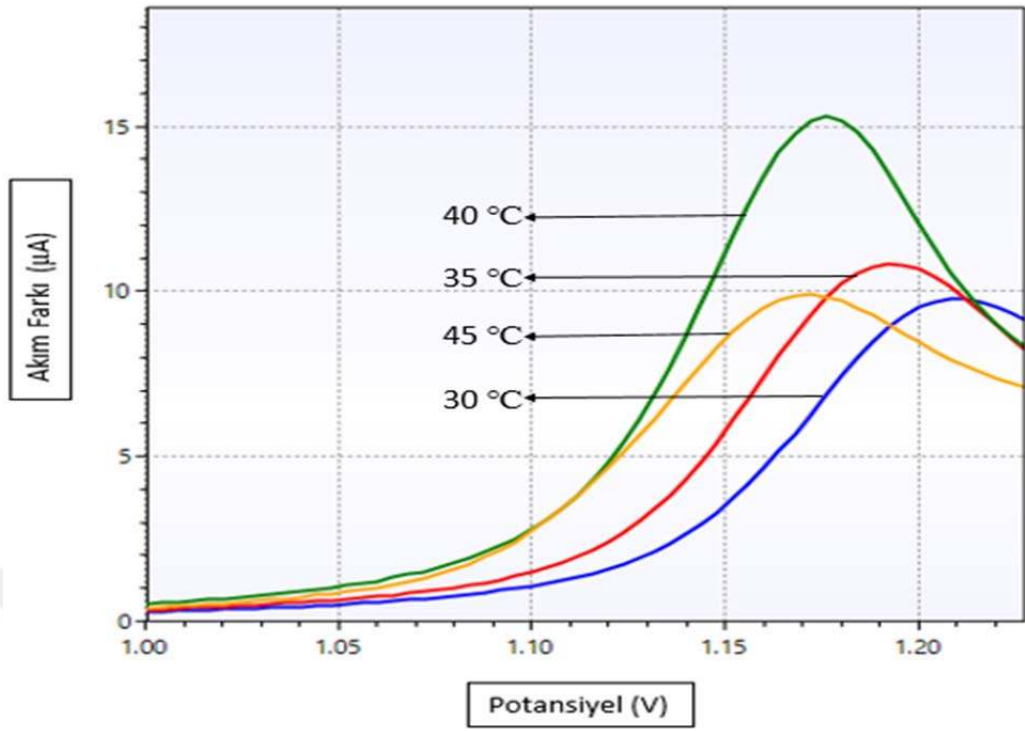
Şekil 4.17. Geliştirilen biyosensör için ultraviyole ışık etki süresi eğrisi.

Şekil 4.17’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip UV ışık süresinin 40 dk olduğu belirlendi. Bundan sonraki çalışmalara biyosensörümüzün biyoaktif tabakası için 40 dk UV ışık süresi kullanılarak devam edildi.

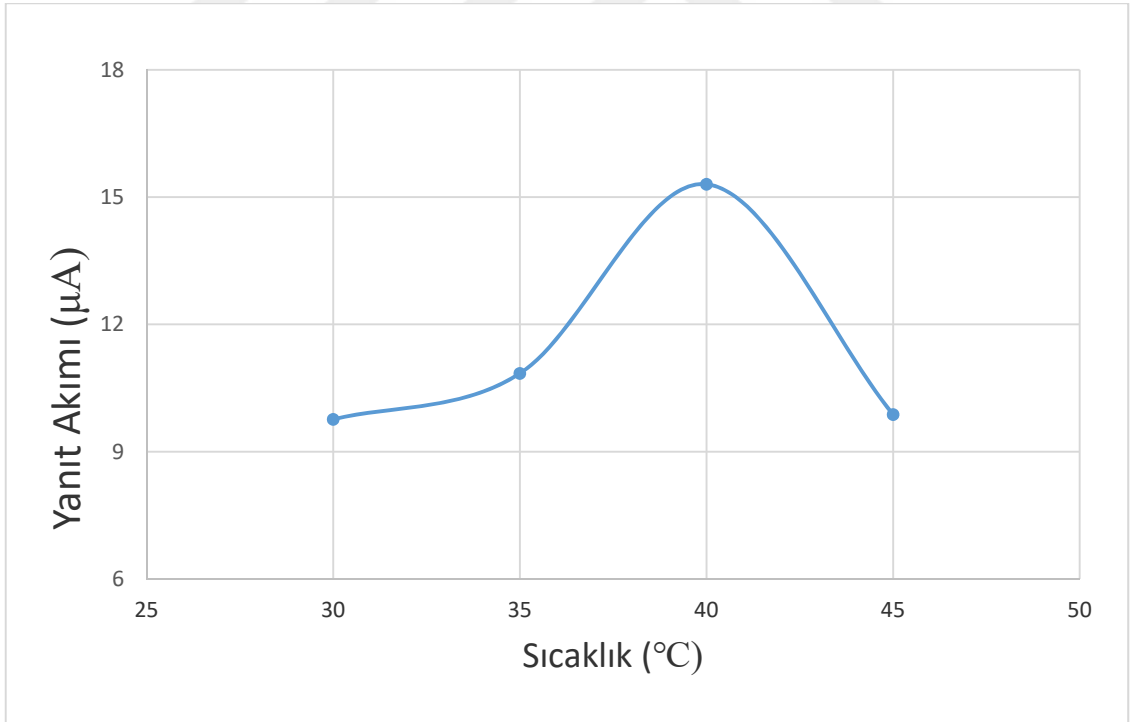
4.1.10. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla 30 °C, 35 °C, 40 °C ve 45 °C sıcaklıklarda yapılan ölçümlerde Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.18).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin sıcaklığa karşı grafiği Şekil 4.19’da gösterildiği gibidir.



Şekil 4.18. Sıcaklığın biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.

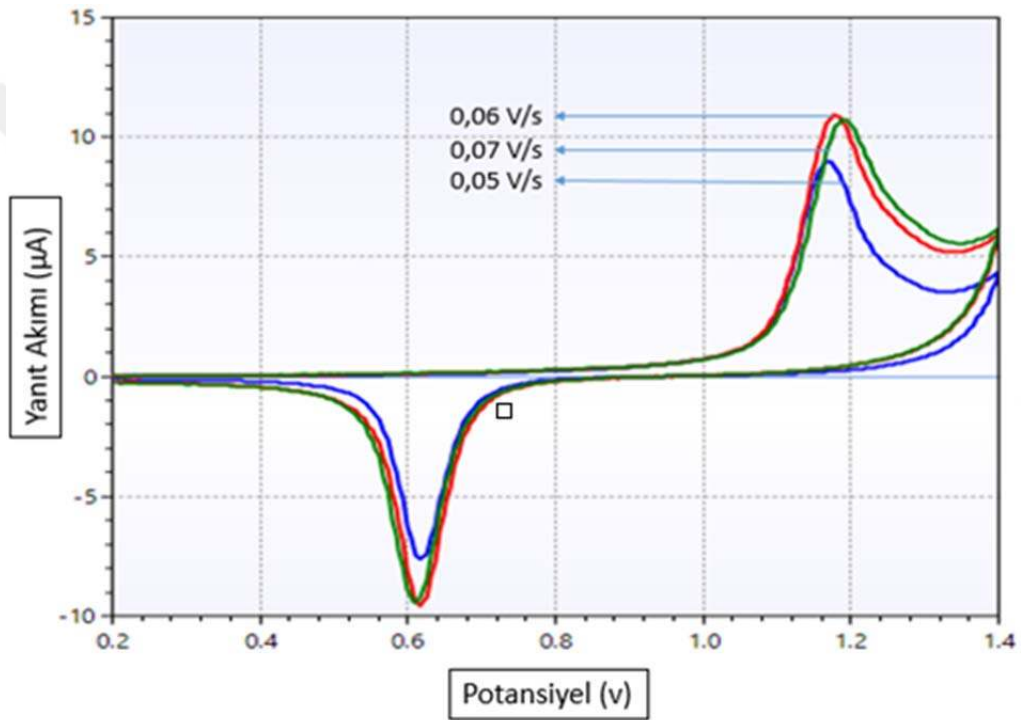


Şekil 4.19. Biyosensörün aktivitesine sıcaklığın etkisi.

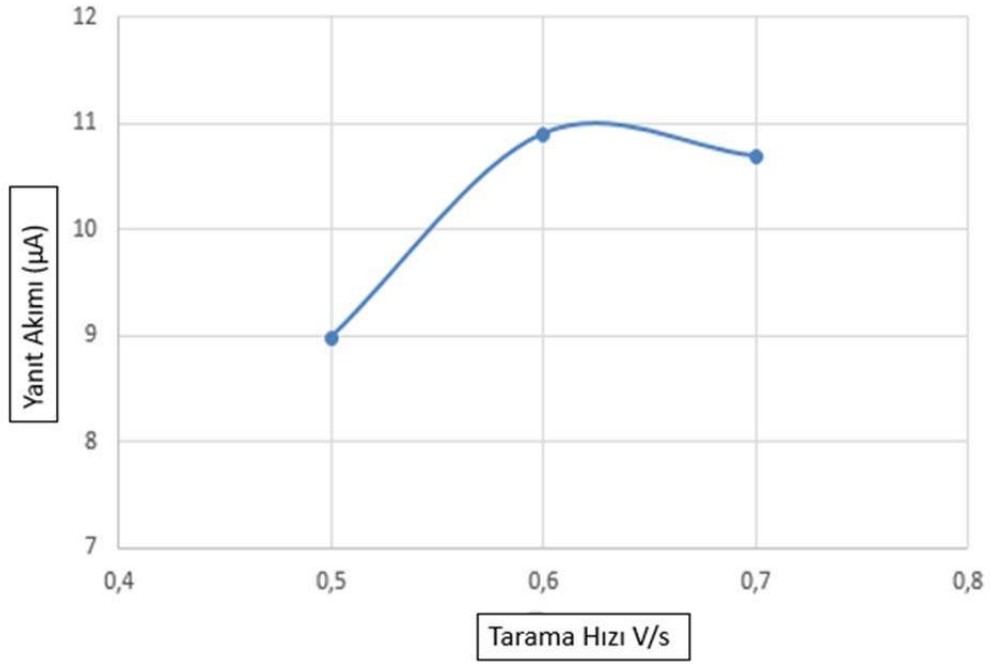
Şekil 4.19’da elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip sıcaklığın 40 °C olduğu belirlendi. Bundan sonraki çalışmalara 40 °C sıcaklık kullanılarak devam edildi.

4.1.11. Optimum Tarama Hızı Değerinin Belirlenmesi

Optimum tarama hızının belirlenmesi için, elde edilen optimum değerler kullanılarak hazırlanan kan demiri biyosensörümüz ile 0,05; 0,06 ve 0,07 V/s tarama hızlarında yapılan ölçümlerde döngüsel voltammogram eğrileri elde edildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Biyosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltammogramlar

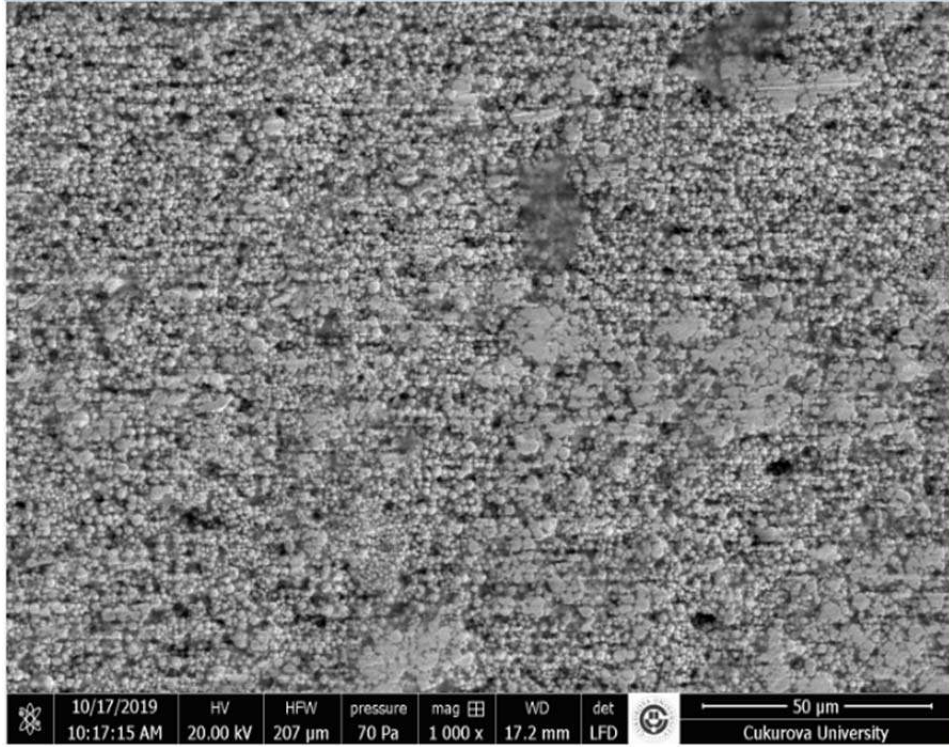


Şekil 4.21. Biyosensörün aktivitesine tarama hızının etkisi.

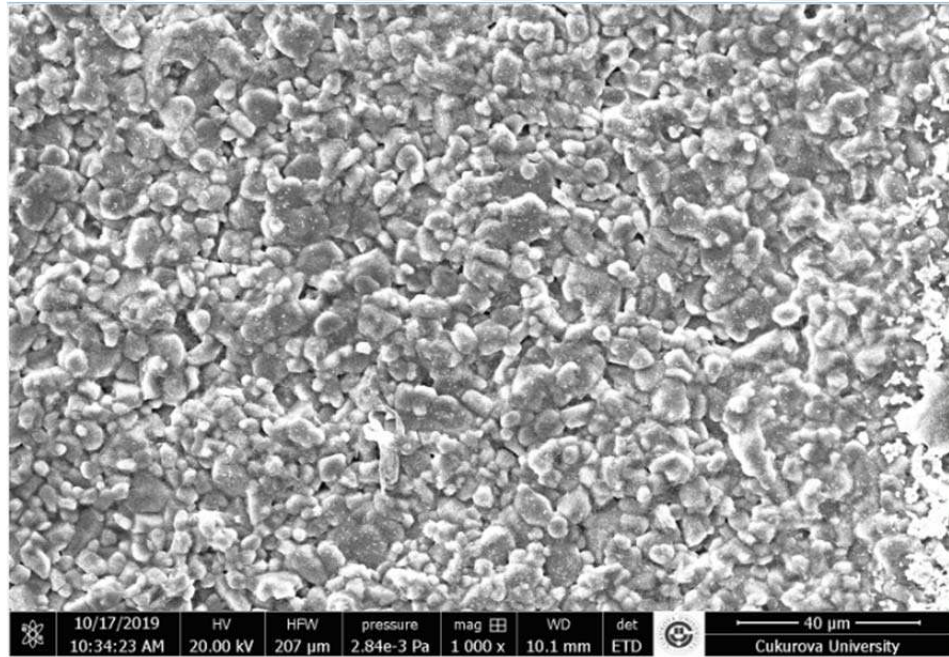
Şekil 4.21’de elde edilen değerlerde en yüksek yanıt akımına sahip tarama hızının 0,06 V/s olduğu belirlendi. Bundan sonraki çalışmalara 0,06 V/s tarama hızı kullanılarak devam edildi.

4.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi

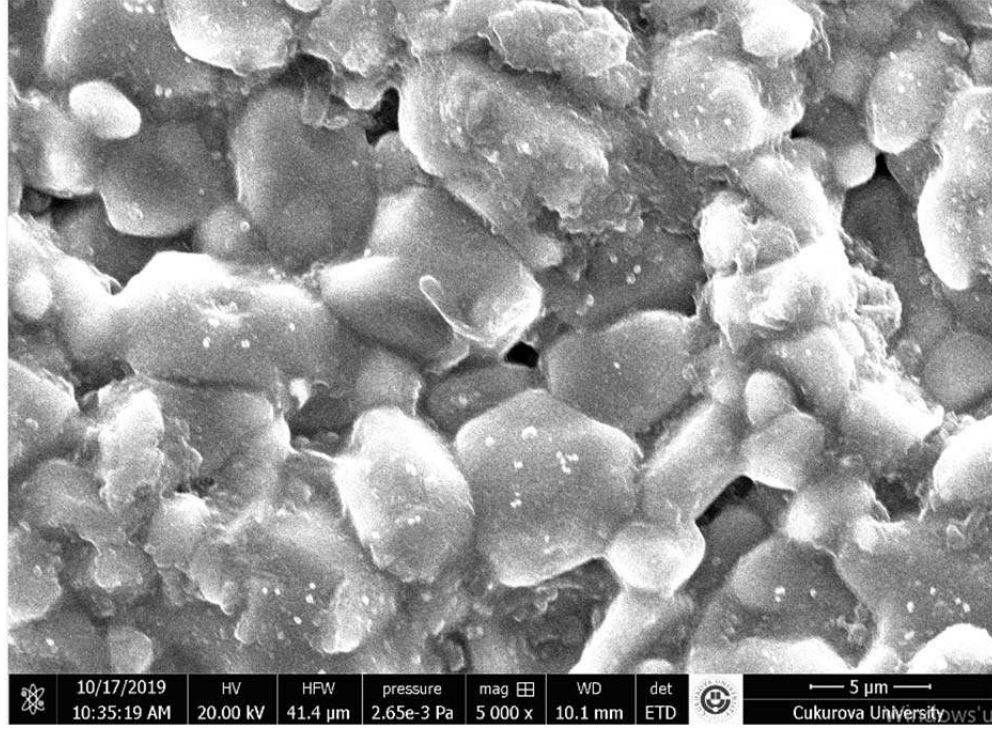
Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine immobilize edilen HRP, BSA ve jelatinden oluşan tabakanın, taramalı elektron mikroskopu ile çekilen yüzey fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25’de gösterilmiştir.



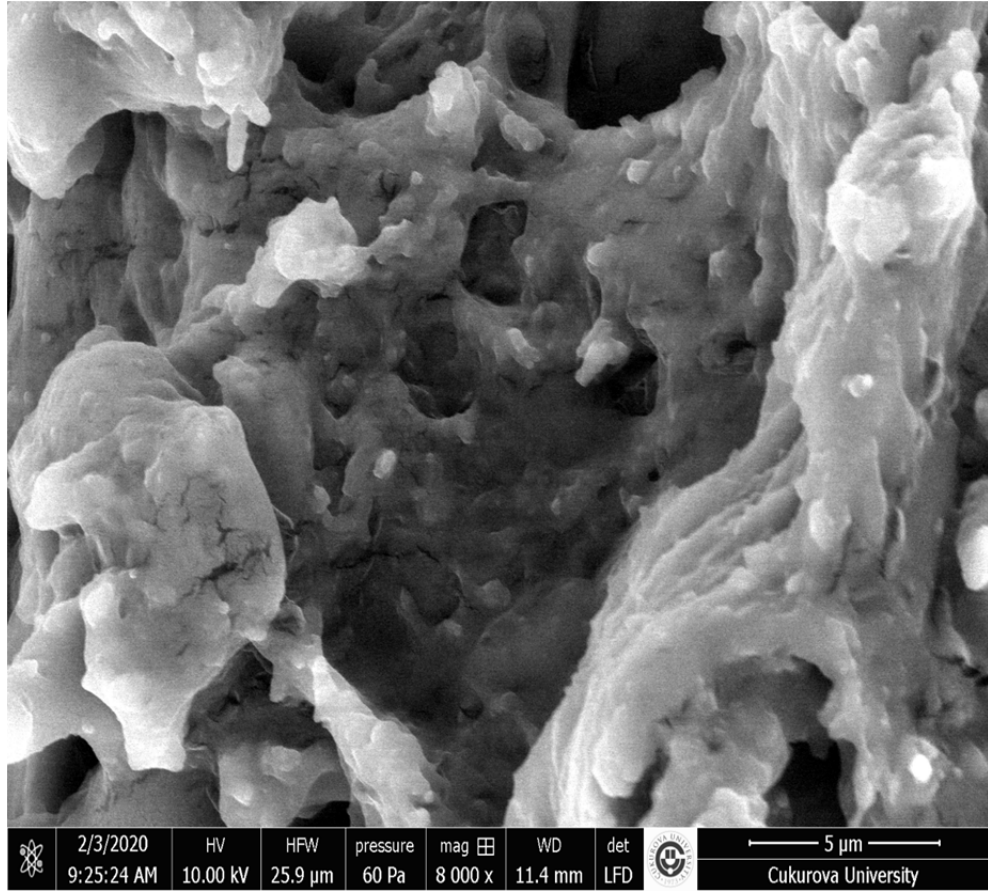
Şekil 4.22. Tek kullanımlık altın elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü



Şekil 4.23. Tek kullanımlık $Au (Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-)$ elektrot üzerine immobilize edilmiş HRP, BSA ve jelatinden oluşan biyoaktif tabakanın SEM görüntüsü (40 µm).



Şekil 4.24. HRP, BSA ve jelatinden oluşan biyoaktif tabakanın SEM görüntüsü (5 μm).

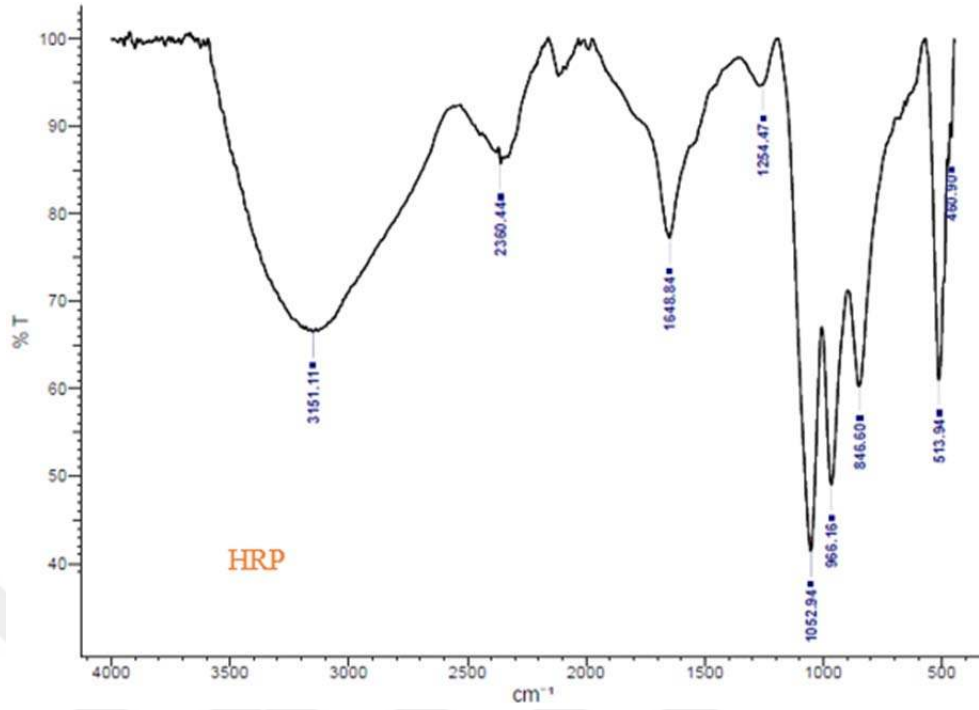


Şekil 4.25. HRP, BSA, jelatin ve glutaraldehitten oluşan biyoaktif tabakanın SEM görüntüsü (5 μm).

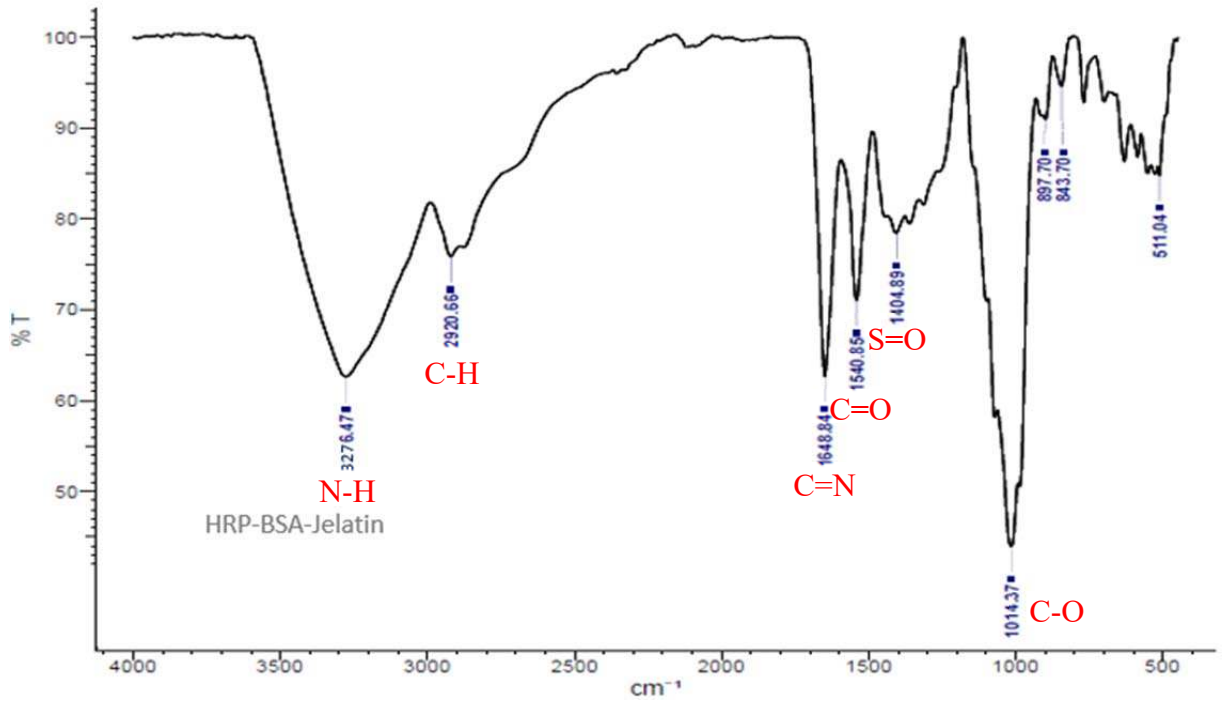
Yüzeyi çıplak Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot yüzeyi ve HRP enzimi immobilize edildikten sonra SEM görüntülerine bakıldığında ikisinin birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Şekil 4.22’de tek kullanımlık Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot yüzeyinin kısmen pürüzlü olduğu görülmektedir. Şekil 4.23’deki SEM görüntüsü, tek kullanımlık Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerindeki immobilize edilmiş HRP, BSA ve jelatinden oluşan biyoaktif tabakanın zemini tamamen doldurmuş olduğu görülmektedir. Büyültme miktarı artırılarak SEM alındığında biyoaktif tabakanın sıkışık tanecikli yapıya sahip olduğu izlenmektedir. Şekil 4.25’de ise glutaraldehit ile muamele sonrası SEM görüntüsü sunulmuştur. HRP enziminin immobilizasyonu ile yeni bir morfolojik yapı oluşmuştur. Bu morfolojik yapı bize HRP enziminin Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.

4.3. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

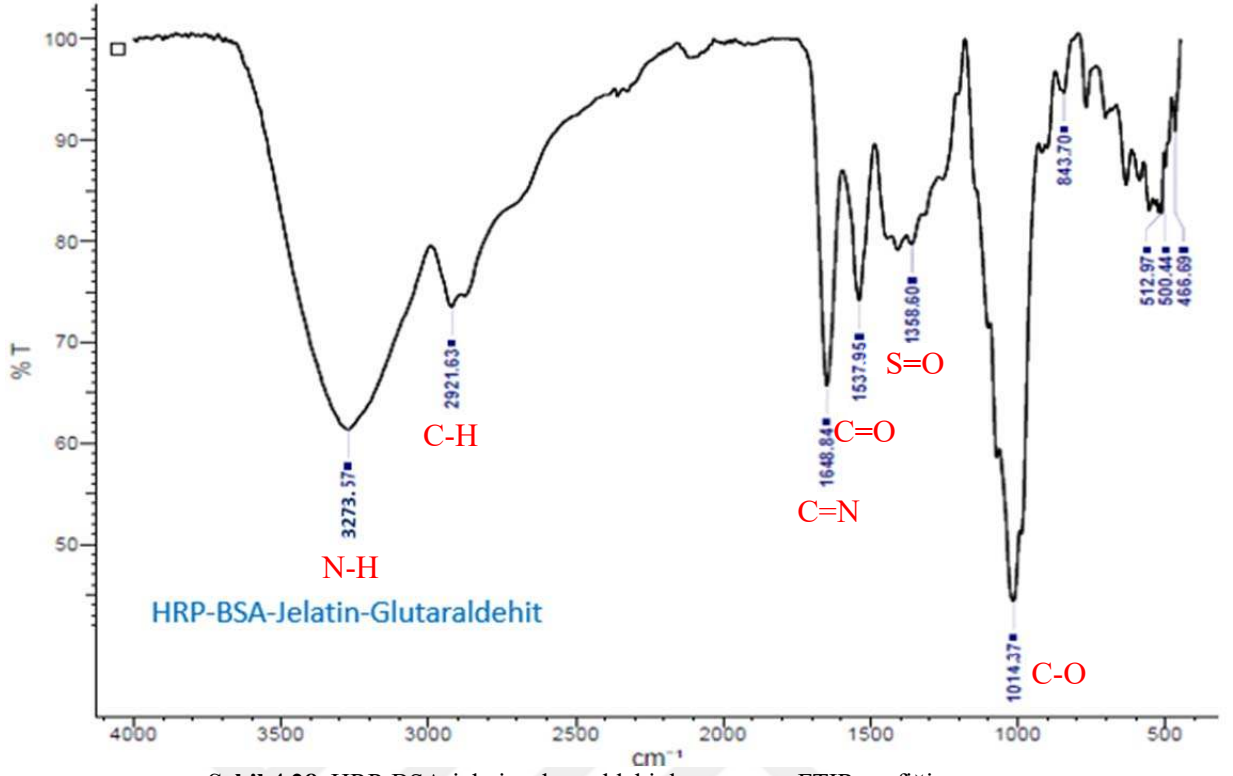
Demir biyosensörünün yapısını aydınlatmak için HRP, HRP-BSA-jelatin karışımı ve HRP-BSA-jelatin-glutaraldehit karışımlarının FTIR spektrumu alındı. HRP ve biyoaktif tabakaya ait Şekil 4.26, 4.27, 4.28 ve 4.29’de $400-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında alınan FTIR spektrumları görülmektedir. Şekil 4.25’de serbest HRP enzimine ait FTIR spektrumunda görülen piklerin, liyofilize haldeki HRP enzimini hazırlamak ve stok HRP enzimini seyreltmek için kullanılan fosfat ve asetat tamponlarındaki iyonların varlığını göstermektedir.



Şekil 4.26. HRP enzimin FTIR grafiği.

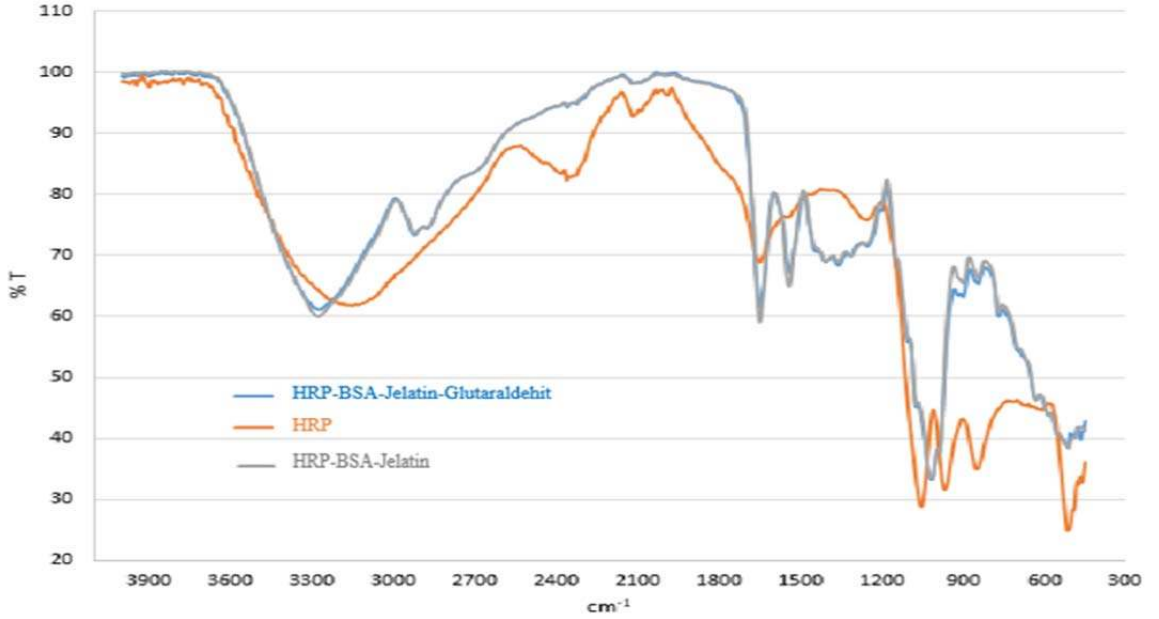


Şekil 4.27. HRP-BSA-jelatin karışımının FTIR grafiği.



Şekil 4.28. HRP-BSA-jelatin-glutaraldehit karışımının FTIR grafiği.

Şekil 4.27 ve şekil 4.28 incelendiğinde, N-H gerilme titreşimini gösteren ve $3250-3330\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bant, HRP-BSA-Jelatin-Glutaraldehit için 3273 cm^{-1} 'de görülmektedir. C-H gerilme titreşimini gösteren ve $2840-3000\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bant, HRP-BSA-Jelatin-Glutaraldehit için 2921 cm^{-1} 'de görülmektedir. C=N gerilme titreşimini gösteren ve $1640-1690\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bant, HRP-BSA-Jelatin-Glutaraldehit için 1648 cm^{-1} 'de görülmektedir. C=O gerilme titreşimini gösteren ve $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bant, HRP-BSA-Jelatin-Glutaraldehit için 1537 cm^{-1} 'de görülmektedir. S=O gerilme titreşimini gösteren ve $1335-1370\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bant, HRP-BSA-Jelatin-Glutaraldehit için 1358 cm^{-1} 'de görülmektedir. C-O gerilme titreşimini gösteren ve $1000-1300\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bant, HRP-BSA-Jelatin-Glutaraldehit için 1014 cm^{-1} 'de görülmektedir.



Şekil 4.29. HRP, HRP-BSA-jelatin karışımı ve HRP-BSA-jelatin-glutaraldehyt karışımına ait FTIR grafiklerinin birlikte görüntüsü.

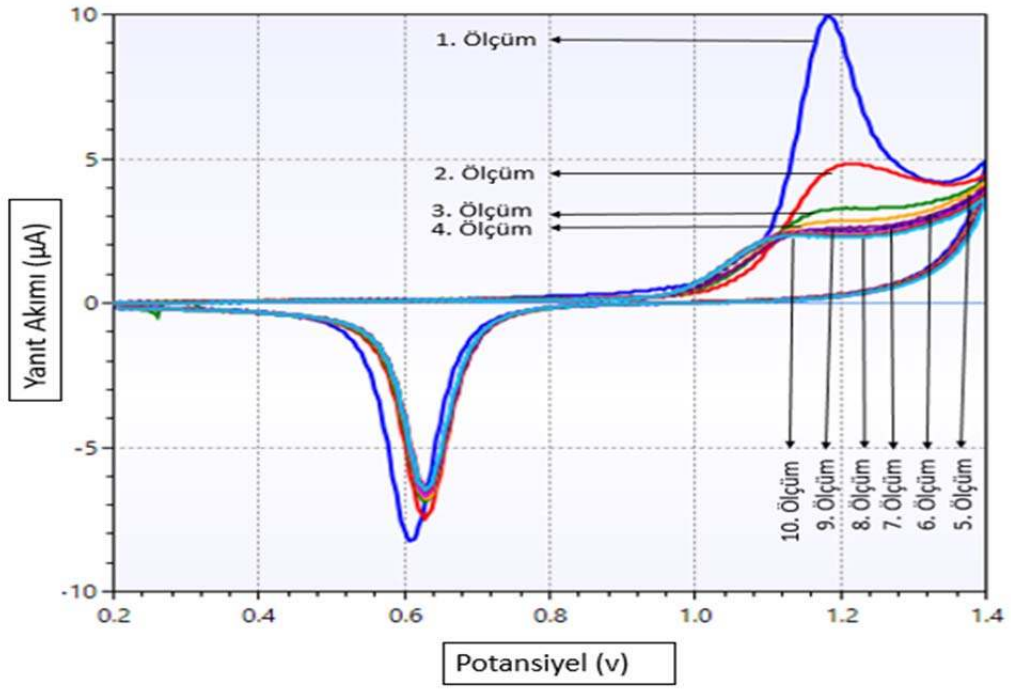
4.4. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Demir biyosensörü için kullanılan biyobileşenlerin immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonları yapıldıktan sonra biyosensörlerin karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.

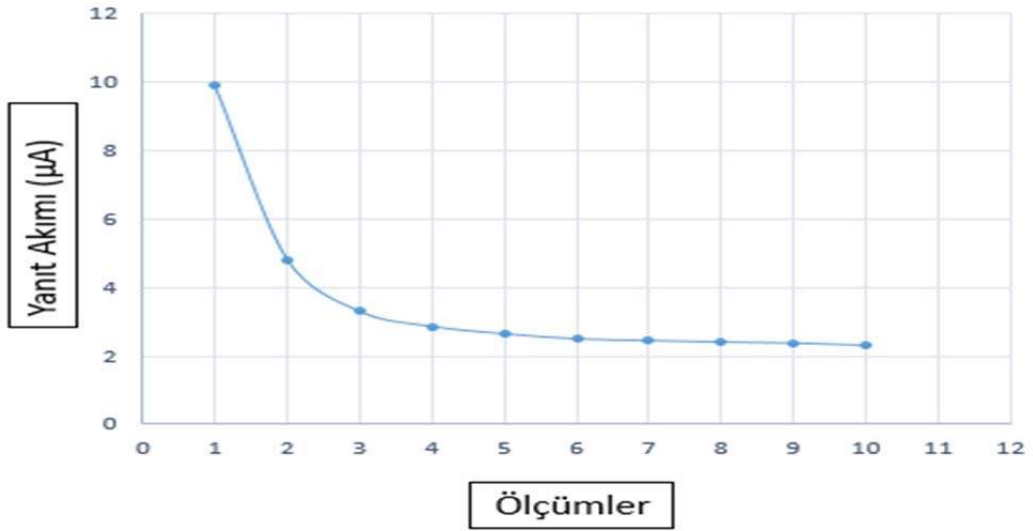
4.4.1. Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliği

Her ölçümden sonra tekrar yenilenen ve 5 mL, pH'sı 5,0 olan 200 mM asetat tamponu içerisine, 200 µg/dL demir içeren $FeSO_4$ çözeltisinden ve 50 mg/dL H_2O_2 çözeltisinden sırası ile 5'er µL eklenerek, aynı biyosensör ile yapılan ölçümlerde döngüsel voltammogram eğrileri elde edildi (Şekil 4.30).

Eğrilere ait maksimum yanıt akımı değerinin ölçüm sayısına karşı grafiği Şekil 4.31' de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.30. Biyosensörün tekrarlanabilirlik ölçümlerini gösteren döngüsel voltammogramlar



Şekil 4.31. Biyosensör aktivitesine ölçüm sayısının etkisi.

Şekil 4.32’da elde edilen değerlerde, ölçüm sayısı arttıkça biyosensörün yanıt akımının azaldığı görüldü.

4.4.2. Biyosensör Yanıtlarının Tekrarlanabilirliği

Demir tayini için geliştirilen biyosensörün ölçüm sonuçlarının güvenilirliği araştırıldı. Ölçümler 0,06 V/s tarama hızı, 40 °C sıcaklık ve pH'sı 5,0 olan 200 mM asetat tamponunda yapıldı.

Ölçüm hücresi içerisine 200 µg/dL demir içeren $FeSO_4$ çözeltisinden ile derişimi 50 mg/dL olan H_2O_2 çözeltisi sırasıyla 5'er µL eklenerek yanıt akımları elde edildi. Biyoaktif tabakası her defasında yenilenerek, 10 kez tekrar edilen ölçümlere ait ortalama değer (X), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (%C.V.) Tablo 4.1'de verilmiştir.

- Varyasyon katsayısı: Standart sapmanın ortalamaya göre değişimidir. Aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

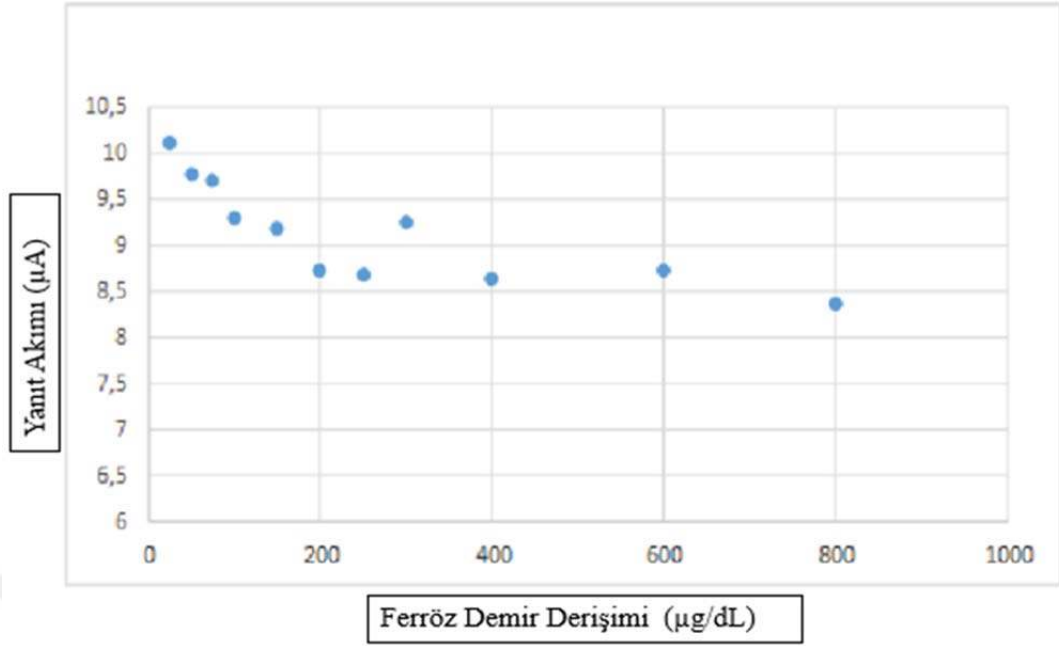
$$CV = 100 \cdot (SD/X)$$

Çizelge 4.1. Biyosensör yanıtlarının tekrarlanabilirlik değerlerini gösteren çizelge

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	x	s.s.	c.v.
Ferröz Demir Derişimi µg/dL	210	198	211	195	225	192	200	183	180	185	197,9	14,345	7,296

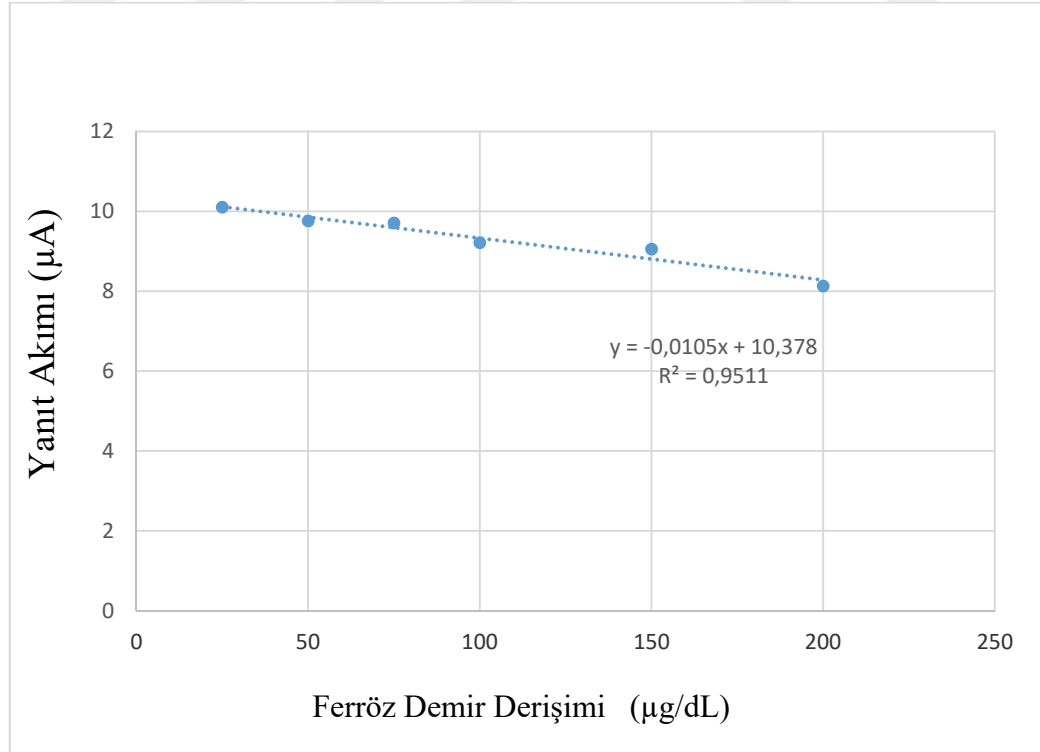
4.4.3. Analiz Ölçüm Aralığı ve Sınırı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensör ile kan serum demirinin belirlenebileceği tayin aralığının tespit edilmesi için, ölçüm hücresi içerisine 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600 ve 800 µg/dL ferröz demir içeren $FeSO_4$ çözeltilerinden her bir derişim için 5'er µL, her birinin üstüne 50 mg/dL olan H_2O_2 çözeltisinden 5 µL eklenerek yanıt akımları elde edildi. Standart olarak kullanılan farklı ferröz demir derişimlerinde ölçümler yapıldı.



Şekil 4.32. Geliştirilen demir biyosensörünün yanıt akımına substrat derişiminin etkisi

Şekil 4.32’deki değerlere lineer regresyon analizi uygulandığında ferröz demir için doğrusal çalışma aralığı Şekil 4.33’de gösterilmektedir.



Şekil 4.33. Geliştirilen ksn demiri biyosensörü ile farklı ferröz sülfat derişim aralıklarında elde edilen kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.32’de verilen değerler kullanılarak en yüksek yanıt akımını elde edildiği değer (demir derişimi olarak alt ölçüm sınırı) 25 µg/dL, doğrusal çalışma aralığı ise 25 µg/dL - 200 µg/dL olarak bulundu.

4.5. Kanda (Serumda) Demir Tayini

Kan serumunda yapılan demir tayini analizi sonunda ölçülen yanıt akımlarına karşı gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğı kullanılarak hesaplandı ve Çizelge 4.2’de gösterildi.

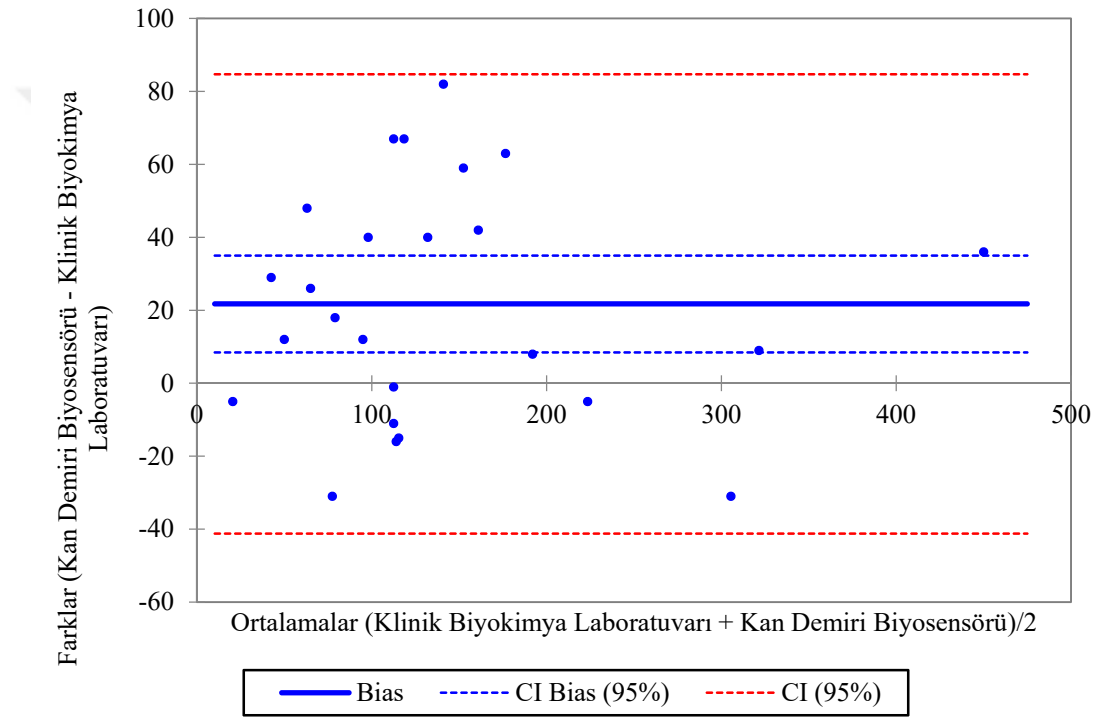
Çizelge 4.2. Serum numunelerinde hesaplanan demir miktarları.

Kan Serum Örneğı	Kan Demiri Biyosensörü Sonuçları (µg/dL)	Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Laboratuvarı Sonuçları (µg/dL)
1	88	70
2	118	78
3	112	113
4	182	123
5	152	112
6	62	93
7	221	226
8	101	89
9	87	39
10	78	52
11	196	188
12	56	44
13	182	140
14	18	23
15	108	123
16	152	85
17	57	28
18	326	317
19	468	432
20	146	79
21	208	145
22	182	100
23	107	118
24	290	321
25	106	122

Çizelge 4.3. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarına ilişkin tanımlayıcı istatistikler

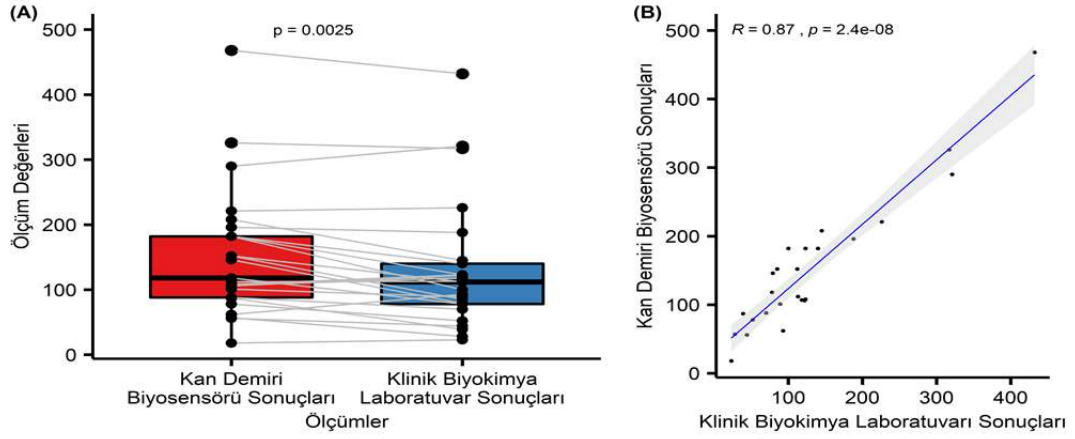
	<i>n</i>	Ort ± SS (min –maks)	Medyan (IQR)	<i>p</i> -değeri
Kan demiri biyosensörü	25	152.12 ± 98.16 (18 – 468)	118 (88 – 182)	0.0025
Klinik Laboratuvar	25	130.40 ± 98.95 (23 – 432)	112 (78 – 140)	

Ort: ortalama, SS: standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, IQR: çeyreklikler arası mesafe (interquartile range)



Şekil 4.34. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarını karşılaştıran Bland-Altman grafiği

Bu çalışmada geliştirilen kan demiri biyosensörü ile yapılan ölçümler ile Klinik Biyokimya laboratuvarından alınan sonuçlar arasındaki uyum Bland-Altman analizi ve grafiği ile belirlendi (Şekil 4.34). Elde edilen sonuçlara göre, kan serum demiri biyosensörü ile Klinik Biyokimya laboratuvar değerleri ortalamasının $\pm 1,96$ standart sapma aralığında uyumlu olarak kaldığı saptandı ($\bar{d} = 21.72$, %95 GA 8.458 - 34.981).



Şekil 4.35. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarını karşılaştıran Box-Plot ve Saçılım Grafiği

Çizelge 4.4. Kan serum demiri biyosensörü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya sonuçlarını karşılaştıran Sperman rho tablosu.

İlişki ve Uyum İstatistikleri	Değer	%95 Güven Aralığı
Spearman's Rho KK (ρ)	0.865	0.714 – 0.939
Sınıf-içi (Intraclass) KK (ICC)	0.972	0.938 – 0.988
Konkordans KK (CCC)	0.924	0.840 – 0.964

Kan serum demiri biyosensörü ile merkez laboratuvar sonuçları arasındaki ilişki ve uyum ile ilgili tüm istatistiksel analizler R 3.6.0 (www.r-project.com) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Veriler Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi Spearman'ın rho, sınıf-içi korelasyon katsayısı ve konkordans korelasyon katsayısı ile kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar, spearman'ın rho katsayısına göre kan demiri biyosensörü ile merkez laboratuvar sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yüksek bir ilişki bulundu ($p=0,865$, $p<0,05$). Sınıf-içi ve konkordans korelasyon katsayılarına göre ise geliştirilen kan demiri biyosensörü ile elde edilen ölçümlerle merkez laboratuvarından alınan ölçümler arasında anlamlı bir uyum olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA

Bir biyosensör genellikle biyolojik bir yanıtı, ölçülebilir ve işlenebilir bir sinyale dönüştüren analitik bir cihaz olarak tanımlanır⁹⁹. Biyosensörler, vücut sıvıları, yiyecekler, hücre kültürleri dahil olmak üzere çok çeşitli örneklerle uygulanabilir ve çevresel atıkları analiz etmek için kullanılabilir¹⁰⁰. Biyosensörlerde kullanılan tipik tanıma elemanları şunlardır: enzimler, nükleik asitler, antikorlar, bütün hücreler ve reseptörleridir. Bunlardan enzimler en yaygın kullanılanıdır¹⁰¹.

Demir eksikliği anemisi, dünyadaki en yaygın beslenme bozukluğu olup, anemi vakalarının yaklaşık yarısını oluşturur, vücuttaki düşük demir depoları nedeniyle eritrositlerin üretimi azalır¹⁰². Talesemiler ve benzeri birçok kan hastalığı ise vücutta demir birikimine yol açar. Sağlık sektöründe, hastalıklarda biyolojik moleküllerin algılanması, izlenmesi ve tanımlanmasında güvenilir, hızlı ve düşük maliyetli sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada serumda Fe^{3+} 'ün nicel tespitini kısa sürede ve uygun maliyetle ölçebilen bir biyosensör geliştirilmiştir.

Serum Fe^{3+} tayini için HRP enzimi, ulaşılabilir ve ucuz olması nedeni ile tercih edildi. Biyosensör çalışmalarında, glukoz oksidaz enzimi ile beraber HRP en sık kullanılan enzimdir³⁹. Enzimler, substratları ürünlere dönüştürmek için güçlü katalizör görevi gören proteinlerdir. Oksidoredüktaz enzimleri, elektron üreten veya tüketen tepkimeleri katalize ederler. Böylece substrat, antikor-antijen etkileşime benzer şekilde enzimin bağlanma cebi ile tanınır. Bu tür spesifik bağlayıcı ceplere sahip enzimler, elektronların tespit edildiği enzimatik biyosensörlerde kullanılabilir⁴⁰.

Gautham ve arkadaşları Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine immobilize edilmiş HRP'nin doğrudan elektrokimyası üzerinde çalışmışlardır. Immobilize edilmiş HRP/Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) konjugatının karakteristik redoks zirveleri oluşturduğunu herhangi bir elektron aracısı olmadan, H_2O_2 'nin azalmasına iyi elektrokatalitik tepki verdiğini göstermişlerdir¹⁰³.

Biyosensör sistemlerinde enzimlerin immobilizasyonu için uygun taşıyıcı malzemelere ihtiyaç vardır¹⁰⁴. Bu çalışmada kullanılan Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrodu elektrokimyasal sistemin bir parçası olmakla birlikte, enzimin bulunduğu biyoaktif tabaka için de taşıyıcı görevi yapmaktadır. Literatürde enzimlerin immobilizasyonu için

altın, karbon, bakır ve platin gibi çok çeşitli metal elektrotların kullanıldığı belirtilmektedir¹⁰⁵. Bu çalışmada HRP enziminin immobilizasyonu için Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot kullanılmıştır.

Başlangıçta 1 mg/ml enzim, 30 mg BSA, 45 mg jelatin, %2,5 glutaraldehit, 100 mg/dL hidrojen peroksit, 60 dk UV ışık ve 100 mM asetik asit tamponu kullanılarak oda sıcaklığında (yaklaşık 24 °C) çalışılmıştır. Bütün aşamalarda ölçümler, 200 µg/dL Fe³⁺ içerecek şekilde hazırlanan ferröz sülfat çözeltisinden ölçüm hücresine 5 µL ilave edilerek yapılmıştır. Her optimizasyon aşamasından sonra elde edilen en uygun değer ile çalışmaya devam edilmiştir.

Enzimler, pH'daki değişikliklerden etkilenir. Enzimin en aktif olduğu pH değerine, en uygun pH değeri veya optimum pH denir. Optimum pH değeri genellikle bir enzimden diğerine değişir ve enzimatik aktiviteyi etkileyen birçok faktörden biridir.¹⁰⁶ Bunun nedeni, pH'daki değişikliklerin, moleküller arası bağların kırılması sonucu iyonik değişime neden olarak enzimin şeklini ve dolayısıyla aktivitesini değiştirmesidir.

Son derece yüksek veya düşük pH değerleri enzimler için genellikle tam aktivite kaybıyla sonuçlanır. Ortamın hidrojen iyon içeriği, enzimlere hidrojen iyonları ekleyerek veya çıkararak enzimatik aktiviteyi etkiler. Hidrojen iyonu pozitif olarak yüklendiğinden, enzimler üzerindeki negatif yüke bağlanır. Tamponlar ise ortamdaki pH değerini koruyan solüsyonlardır.¹⁰⁷

Çalışma tamponu ve optimum pH değerinin belirlenmesi için, pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, ve 6,0'da 100 mM asetik asit/asetat tampon çözeltileri ile pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ve 8,5'de olan 100 mM sodyum fosfat tamponlarında ölçümler alınmış, optimum ölçüm değeri pH 6,0'da 100 mM asetat tamponunda elde edilmiştir (Şekil 4,3).

Çalışmamızda HRP enzimi en iyi katalitik aktiviteyi pH 6,0'da göstermiştir. HRP enzimi ile yapılan enzim aktivitesi çalışmaları incelendiğinde benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Chagas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, serbest ve immobilize edilmiş HRP enziminin en iyi katalitik aktivitesini pH 6,0'da gösterdiğini belirtmişlerdir¹⁰⁸.

Eed yaptığı çalışmada ise, HRP enziminin katalitik aktivitesini pH 1,0; 7,0 ve 11,0' de incelemiş ve enzimin en iyi aktivitesinin pH 7,0'de olduğunu, pH 11,0' de ise enzim aktivitesinin çok düştüğünü ve pH 1,0'de enzim aktivitesinin hiç olmadığını

göstermiştir¹⁰⁹. Bu çalışmada ise, HRP enzimi en iyi katalitik aktiviteyi pH 6,0'da göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen optimum enzim aktivitesindeki farklılığın, çalışmanın sadece seçilen belirli pH'larla sınırlı olmasından kaynaklandığını göstermektedir.

pH 5,6'nın altındaki asidik ortamlar, demir-transferrin afinitesini azaltarak demirin salınımını teşvik eder¹¹⁰. Çalışmamızda biyolojik sıvılarda ferrik demir derişimi ölçümü amaçlandığından, transferrinin Fe⁺³ 5,6'nın altındaki pH'larda serbest bırakması nedeni ile ve HRP enziminin optimum pH'nın biraz altında olmasına rağmen katalitik aktivitesi devam ettiği için; deneylere pH'sı 5,0 olan asetat tamponunda devam edildi.

Bir reaksiyona giren enzimin miktarı, katalize ettiği aktivite ile ölçülür. Substrat konsantrasyonunun yüksek olması, sıcaklık ve pH'nın sabit tutulması koşuluyla, reaksiyon hızı enzim konsantrasyonuyla orantılıdır¹⁰⁶. Çalışmamızda en uygun enzim derişimini belirlemek için, diğer değişkenler sabit tutulmak sureti ile biyoaktif tabakası 0,25 mg/mL (64 U/mg), 0,5 mg/mL (128 U/mg), 1 mg/mL (256 U/mg) ve 2 mg/mL (512 U/mg) enzim derişiminden 10'ar µL içeren biyosensörler ile ölçümler yapılmıştır. En yüksek cevap akımına sahip enzim miktarının, 0,5 mg/mL (128 U/mg) HRP enzimi derişiminde olduğu saptanmıştır (Şekil 4,5).

Teepoos ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise, 2, 4, 6 ve 8 mg/mL derişimlerdeki HRP enzimini, kitosan ve jelatin ile birlikte grafit elektrot üzerine immobilize ederek biyosensörler hazırlamışlardır. Bu biyosensörler ile yaptıkları ölçümlerde en uygun enzim derişiminin 4 mg/mL olduğunu göstermişler ve biyosensör yanıtının 4 mg/mL'ye kadar artış gösterdikten sonra enzim derişimi arttıkça azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre yanıt akımındaki azalma, elektrot yüzeyindeki yüksek immobilize enzim yoğunluğu sterik etkiye neden olmakta ve böylece elektrot yüzeyi ile enzim arasındaki elektron transferini zorlaştırmasından kaynaklanmaktadır.¹¹¹ Çalışmamızda her biyosensör için kullanılan enzim derişiminin, bu literatüre göre 8 kat daha az olması biyosensörümüzün enzim maliyeti konusunda ekonomik olduğunu göstermiştir.

Çapraz bağlama yöntemi hemen hemen her enzimin immobilizasyonuna uygulanabilen ve birçok ekonomik ve çevresel faydaya sahip olan bir immobilizasyon yöntemidir. Biyoaktif tabaka gibi içerisinde enzim ve polimerlerin bulunduğu karışım,

çapraz bağlama yöntemine uygun polimerler ile hazırlanır ise yüksek aktiviteye olanak sağladığını Nadar ve arkadaşları ifade etmiştir¹¹².

Çapraz bağlama polimerleri; en az iki reaktif uca sahip, proteinlerin üç boyutlu yapısını bozmadan, enzim moleküllerinin bulundukları tabaka içerisinde toplanmalarını sağlayan ve enzim yüzeylerinin spesifik amino asit gruplarına bağlanan maddelerdir.¹¹³ Çalışmamızda çapraz bağlama polimerleri olarak sığır serum albumini (BSA) ve glutaraldehit kullanılmıştır.

Islan ve arkadaşları ilk önce liyaz enzimini, sadece glutaraldehit ile çapraz bağlamışlar ve enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini saptamışlardır. Daha sonra aktivite kaybını önlemek için glutaraldehit ile birlikte, koruyucu madde olarak BSA'nın kullanılmasına karar vermişlerdir. Araştırmacılara göre BSA'nın moleküler ağırlığı liyaz enziminin iki katı olduğu için, BSA'nın çoğunlukla glutaraldehit ile bağ yapması beklenmektedir. Glutaraldehit, BSA ve liyaz enziminin sıvı solüsyonlarını birlikte kullandıklarında enzim aktivitesinin devam ettiğini kanıtlamışlardır. Çalışmamızda HRP enzim aktivitesinin düşmemesi için BSA ve glutaraldehit çapraz bağlayıcılarının birlikte kullanılması gerektiği saptanmıştır¹¹⁴.

Çok sayıda amin grubuna sahip olan sığır serum albumini (BSA), enzim kümeleri arasında güçlü bir bağlanma sağlar, böylece biyoaktif tabakanın aktivitesi ve stabilitesinin artmasına yola açar¹¹⁵. Çalışmamızda en uygun BSA miktarını belirlemek için 15 mg, 30 mg ve 60 mg BSA içeren biyosensörler hazırlanarak ölçümler yapılmış, en yüksek yanıt akımına sahip BSA miktarının 30 mg olduğu belirlenmiştir (Şekil 4,7).

Islan ve arkadaşları glutaraldehit ile birlikte, BSA'nın 5 ve 10 mg/mL derişimlerini kullanarak BSA-liyaz enzimi sıvı solüsyonları hazırlamışlar ve enzim aktivitesinin 10 mg/ mL BSA derişiminde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir¹¹⁴. Çalışmamız optimum deney koşullarında 30 mg BSA'yı, 67,5 mg jelatinle beraber 300 µL asetat tamponunda çözdüğümüz için, kullandığımız BSA miktarı belirtilen çalışmaya göre 10-20 kat daha fazladır.

Çalışmamızda yer alan jelatin bir hidrojelidir. Hidrojellerin su emme eğilimi ve şişebilme yetenekleri, bunları biyomedikal uygulamalar için ideal malzeme haline getirmiştir. Hidrojeller enzimlere uygun destek ortamları sağlayarak, enzimleri hareketsiz hale getiren en önemli biyomalzemedir. Jelatin, biyomoleküller ve mikrobiyal hücreler için faydalı bir immobilizasyon matrisidir. Bulunabilirliği ve

ucuzluğu dahil olmak üzere çok sayıda avantaja sahiptir. Ek olarak, immobilize edilmiş enzimi bir protein olarak hareketsiz hale getirir¹¹⁶.

Jelatin toksik olmayan, hidrofilik, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyoumlu biyomolekül olup, organik çözücülerde çözünmez, sıcak suda ve asetik asitte çözünür¹¹⁷.

İmmobilize edilmiş enzimin kararlılığı ve immobilizasyonun etkinliği, matrisin çapraz bağlanmasına bağlı olduğu için, jelatin konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir¹¹⁸. Jel matris, jelatine kovalent bağlı olarak tutuklanmış enzim içerir. Çalışmamızda jelatin miktarı 22,5; 45; 67,5 ve 90 mg olan çözeltiler kullanarak hazırlanan dört farklı serum demiri biyosensörü ile yapılan ölçümlerde, en yüksek yanıt akımına sahip jelatin miktarının 67,5 mg olduğu belirlendi (Şekil 4,9).

Sheelu ve arkadaşları fosfolipaz enzimi ile jelatin çözeltisi karışımı glutaraldehit ile çapraz bağlanarak, enzimin jelatin matrise immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Jel matriks içerisindeki jelatin miktarı 500 mg/mL olan stok jelatin çözeltisi %10, %20, %30, %40 ve %50 oranlarda hazırlanarak, enzimin aktivitesi ölçülmüştür. Jelatin stok çözeltisinin viskozitesindeki sınırlama nedeniyle, jelatin miktarı daha fazla arttırılamamıştır. Araştırmacılar enzim aktivitesinin jelatin derişiminin artması ile yükselmeye başladığını, %40 ve %50 jelatin derişimlerinde optimum seviyeye ulaştığını göstermişlerdir¹¹⁷. Araştırmacıların test ettiği %40 ve %50 jelatin derişimi, çalışmamızda 300 µL asetat tamponunda çözdüğümüz jelatin derişimi ile nicel olarak benzerlik göstermektedir. Bu çalışma jelatinin yüksek derişimlerinde optimum enzim aktivitesine olanak sağlaması ölçülmesi yönünden sonuçlarımızı desteklemektedir.

Çapraz bağlı enzimler, serbest enzimlere göre belirli bir sıcaklıkta daha kararlı halde olurlar ve birkaç kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin önemli bir yüzdesini koruyarak, önemli düzeyde tekrar kullanılabilirlik gösterirler. Enzimin (enzim saf olmayabilir) çökmesi sonucu oluşan protein topakları, glutaraldehit ile çapraz bağlanır. Enzim-BSA karışımı, glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı bir madde ile kovalent bağlandıktan sonra daha kararlı hale gelir¹¹⁸.

Glutaraldehit, protein çapraz bağlama kimyasal molekülü olarak onlarca yıldan beri kullanılmaktadır. Bu iki işlevli reaktif, ucuz ve ticari olarak kolaylıkla bulunabilmesi nedeniyle tercih edilen çapraz bağlayıcıdır.¹¹⁹

Çalışmamızda en uygun glutaraldehit yüzdesinin belirlenmesi için diğer değişkenler sabit tutulmak sureti ile %2, %2,5, %3 ve %3,5 oranında glutaraldehit derişimlerinden 5 µL kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile ölçümler yapılmış ve en yüksek yanıt akımına sahip glutaraldehit derişiminin %3 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4,11).

Jie ve arkadaşları β-glukosidaz enzimini kitosan ve glutaraldehit ile beraber immobilize ederek, glutaraldehit'in %1; %1,5; %2; %2,5 ve %3 derişimlerinin β-glukosidaz enzimi üzerindeki etkisini araştırmışlar ve en iyi yanıt akımının %1,5 glutaraldehit derişiminde olduğunu göstermişlerdir¹²⁰.

Biyoaktif tabakanın optimizasyonundan sonra, tampon konsantrasyonunun yanıt akımı üzerindeki etkisini araştırmak için 50, 100, 200, 300 ve 400 mM asetik asit tamponundan 5'er mL ölçüm hücresine koyularak ölçme işlemi gerçekleştirilmiş ve en iyi yanıt akımının 200 mM, olan asetik asit tamponunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4,13). 200 mM'dan yüksek konsantrasyonlarda daha düşük yanıt akımlarının elde edilmesi, artan iyonik kuvvetin enzimin katalitik aktivitesini azaltması olarak düşünülebilir. Aynı zamanda 200 mM'dan düşük konsantrasyonlarda daha düşük yanıt akımlarının elde edilmeside, azalan iyonik kuvvetin enzimin katalitik aktivitesini düşürmesi olarak değerlendirilmiştir.

Belirli bir enzim konsantrasyonu için, reaksiyon hızı bir noktaya kadar artan substrat konsantrasyonuyla yükselir, bunun üstünde substrat konsantrasyonunda ise reaksiyon hızında önemli bir değişiklik meydana gelmez. Bunun nedeni, herhangi bir anda enzim moleküllerinin aktif bölgelerinin, neredeyse substrat ile doymuş olmasıdır¹²¹.

Çalışmamızda substrat olarak kullanılan H₂O₂ derişimi değerinin belirlenmesi için, 10, 50 ve 100 mg/dL H₂O₂ derişimlerinden 5 µL kullanılarak ölçümler yapılmıştır. En yüksek yanıt akımına sahip hidrojen peroksit derişiminin 50 mg/dL olduğu belirlenmiştir (Şekil 4,15).

UV ışık polimer yüzeylerde fotokimyasal olarak moleküllerin çapraz bağlanma reaksiyonlarını başlatır¹²². Eksimer UV lambaları gibi monokromatik (tek renkli) UV lambalar, argon-florid gaz karışımının elektrikle uyarılması sonucu, yaklaşık 200 nm dalga boyuna sahip UV ışık yayar¹²³. Bu nedenle eksimer UV ışık, fotokimyasal

reaksiyonu başlatarak, oluşan iki fonksiyonlu polimerlerle enzimin foto-reaktif çapraz bağlanması sonucu hareketsiz hale getirilmesini sağlar¹²⁴.

Opwis yaptığı çalışmada, monokromatik eksimer UV ışık kullanmış ve katalaz enziminin iki fonksiyonlu polimerler ile birlikte kumaş üzerine immobilize edilmesini sağlamıştır. Böylece fotokimyasal immobilizasyon ile katalazı hareketsiz hale getirerek, eksimer UV ışığının katalaz gibi dayanıklı enzimleri immobilize etmek için uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Opwis'e göre fotokimyasal immobilizasyon teknikleri, geleneksel immobilizasyonla rekabet edebilecek ve gelecekte yaygın olarak kullanılacaktır¹⁰⁴.

Çalışmamızda UV ışık süresinin optimizasyonu için; biyoaktif tabakası 30, 40, 50 ve 60 dk ultraviyole ışık kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerde, en yüksek yanıt akımına sahip UV ışık süresinin 40 dk olduğu belirlendi (Şekil 4,17). Bu sonuçlar, HRP enzim aktivitesi için fotokimyasal tekniğin önemini göstermektedir. UV ışığın 40 dakikadan fazla kullanılması enzim aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. Bunun nedeni olarak, UV ışığın artık doğrudan enzim yapısına zarar verebileceği veya biyoaktif tabakadaki çapraz bağ sayısında enzim aktivitesini düşürecek değişikliğe yol açtığı söylenebilir.

Çoğu kimyasal reaksiyon gibi, enzim katalizli bir reaksiyonun hızı, sıcaklık arttıkça artar. Enzimatik reaksiyonlar söz konusu olduğunda, birçok enzim yüksek sıcaklıklardan olumsuz olarak etkilenmektedir. Reaksiyon hızı belirli bir sıcaklığa kadar maksimum seviyeye yükselir, sonra sıcaklık artışıyla birlikte düşer. Hayvansal enzimlerin çoğu, 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla denatüre olduğu için, çoğu enzim bu sıcaklık değerinin biraz altında optimum aktivite gösterir.

Sıcaklık arttıkça, reaksiyona giren moleküller daha fazla kinetik enerjiye sahip olmaya başlar. Bu, başarılı bir çarpışma şansını artırır ve böylece oran artar. Bir enzimin katalitik aktivitesinin en yüksek olduğu belli bir sıcaklık vardır. Bu optimum sıcaklık, enzimler için genellikle insan vücut sıcaklığıdır (37,5 °C). Bu sıcaklığın üzerinde enzim moleküllerine daha fazla kinetik enerji yüklenir, moleküller arasındaki bağlar kırıldığı için enzimin protein yapısı bozulmaya başlar¹²⁵.

Çalışmamızda optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla 30, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda yapılan ölçümlerde, en yüksek yanıt akımına sahip sıcaklığın 40

°C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4,19). Çalışmamızda enzim aktivitesinin 40 °C'ye kadar arttığı ve 40 °C'den sonra düşmeye başladığı görülmüştür.

Eed yaptığı çalışmada, HRP aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisini araştırmıştır. Enzim aktivitesini 9, 37 ve 41°C sıcaklıklarda çalışmış ve 9°C'de enzimin aktivite göstermediğini gözlemiş, ayrıca 41 °C'deki enzim aktivitesinin 37 °C'deki enzim aktivitesinden 1,5 kat daha fazla olduğunu göstermiştir¹⁰⁹.

Biyosensörümüzün optimizasyon çalışması bittikten sonra, karakterizasyon çalışması için ölçüm tekrarlanabilirliği incelendi. Hazırlanan serum demiri biyosensörü ile ilk ölçüm alındıktan sonra, ölçüm hücresindeki tampon değiştirilip substratlar tekrar ölçüm hücresine ilave edilerek aynı elektrot ile ikinci kez ölçüm alındığında yanıt akımının yaklaşık %50 azaldığı görüldü. Aynı şekilde 10 kez ölçüm yapıldığında başlangıç yanıt akımının yaklaşık %80 oranında azaldığı saptandı (Şekil 4,32). HRP enzim aktivitesindeki bu düşüş, literatürdeki diğer enzimler ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.

Biyoaktif tabaka her ölçümden sonra tekrar hazırlanarak, 200 µg/dL Fe²⁺ konsantrasyonunda ölçüm sonuçlarının güvenilirliğini araştırmak için 10 kez ölçüm yapılmıştır. Serum demiri biyosensörümüz 200 µg/dL konsantrasyondaki Fe²⁺ derişimini 197,9 µg/dL ortalama ile ölçmüştür (Çizelge 4,1).

Daha sonra 800 µg/dL ferröz demir içerecek şekilde hazırlanmış FeSO₄ stok çözeltisinden hazırlanan 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 600 ve 800 µg/dL Fe²⁺ çözeltileri ile biyoaktif tabakası her ölçümden sonra yeniden hazırlanmış serum demiri biyosensörleri kullanılarak, kalibrasyon eğrisi için ölçümler alınmıştır.

Her bir ölçüm iki kez tekrarlanmış ve sonuçlar değerlendirildiğinde Fe²⁺ 25 µg/dL olduğu derişimde en yüksek yanıt akımının elde edildiği görülmüştür. Daha sonra 50, 75, 100, 150 ve 200 µg/dL Fe²⁺ derişimlerinde, her ölçümde yanıt akımlarında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Yanıt akımlarındaki bu azalmanın 200 µg/dL Fe²⁺ derişiminde durduğu ve 300, 400, 600 ve 800 µg/dL ferröz demir derişimlerinde anlamlı bir düşüş olmadığı görülmektedir. Böylece geliştirilen serum demiri biyosensörünün çalışma aralığının 25 ile 200 µg/dL Fe²⁺ derişimi arasında olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 4,34).

Geliştirdiğimiz serum demiri biyosensörü tepkime sonunda arta kalan H₂O₂ derişimini ölçtüğü için, Fe²⁺ derişimi arttıkça serum demiri biyosensörümüzün yanıt

akımı azaldı. Çalışma ortamındaki Fe^{2+} derişimi arttıkça, HRP enzimi aktivitesiyle ortamdaki H_2O_2 derişimi azalacağından, bu süreçte serum demiri biyosensörümüzün yanıt akımının düştüğü yaptığımız ölçümler sonucu görüldü.

Serum demiri biyosensörünün çalışma aralığı belirlendikten sonra, serum örnekleri üzerinde ölçüm yapmak için, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'ndan 25 adet serum örneği temin edildi. Örnekler alınırken serum demiri sonuçlarının farklı değerlerde olmasına ve serumların berrak renkte olmasına dikkat edildi.

Serum örneklerinden 5 μ L mikropipet ile alınarak, ölçüm hücresindeki 5 mL, pH'sı 5,0 ve 200 mM derişimdeki asetat tamponu içerisine ilave edilmiştir. Serum transferrininden demirin salınımı için 1 dakika beklenmiştir.

Ferrozin, fenantrolin ve bipridin kullanılan spektrofotometrik yöntemlerde serbest kalan Fe^{3+} ü, Fe^{2+} e indirgemek için hidroksilamin hidroklorür çözeltisinin kullanıldığı bilinmektedir. Sylvia ve arkadaşları tarafından Fe^{3+} tayini için yapılan çalışmada, indirgeme maddesi olarak hidroksilamin hidroklorür kullanılmış ve daha sonra indirgenme sonrası ortaya çıkan Fe^{+2} , ferrozin kullanılarak fotometrik yöntem ile ölçülmüştür¹²⁶.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda 2,4,6-Tri-(pyridyl)-s-triazine (TPTZ) kromojeninden yararlanılarak spektrofotometrik yöntemle analiz edilen serum demir düzeyleri sonuçları ile aynı örneklerin laboratuvarımızda serum demiri biyosensörü uygulanarak bulunan sonuçları arasında, spearman'ın rho katsayısına göre istatiksel olarak anlamlı ve pozitif yüksek bir ilişki ($\rho=0,865$, $p<0,05$) olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3).

Serum demiri tayini ile ilgili literatür taraması yapılmış, serum demiri biyosensörü ile ilgili çalışmalara çok fazla rastlanılmamıştır. Ancak, yukarıdaki tartışmada belirtilen yöntem ve tekniklerle geliştirilen serum demiri biyosensörü klinik amaçlı biyolojik sıvılarda kullanılabilecektir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda Öncelikle;

1. Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine ilk önce HRP ile BSA-Jelatin karışımı eklenerek, HRP ve BSA'nın çapraz bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra eklenen çapraz bağlayıcı glutaraldehit, Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot, BSA, HRP ve Jelatinin kenetlenmesini sağlamıştır. Glutaraldehit enzime göre daha yüksek affinite gösterdiği BSA'ne bağlanarak, HRP üzerindeki BSA'dan kaynaklanan sıkı kovalent çapraz bağları azaltmış ve enzim aktivitesinin devam etmesi sağlamıştır. Böylece HRP jelatin içerisine hapsedilmiş ve enzim aktivitesine en iyi katkıyı sağlayan, enzim, BSA, jelatin ve glutaraldehitin derişim miktarları belirlenerek biyoaktif tabaka ölçüme hazır hale getirilmiştir.
2. Biyoaktif tabaka bileşenlerinin çapraz bağlanmasını başlatmak ve desteklemek için, monokromatik eksimer lazer kullanılmıştır. Kullanılan eksimer lazer süresi ile birlikte, ölçüm hücreesine eklenen pH'sı 5,0 olan asetat tamponunun derişimi ve ortam sıcaklığı, hazır hale getirilen biyoaktif tabakadaki enzimin aktivitesine göre optimize edilmiştir.
3. Serum demiri biyosensörünün optimum değerleri; 0,5 mg/mL HRP, 30 mg BSA, 67,5 mg jelatin, %3 glutaraldehit, pH'sı 5,0 olan 200 mM'lık asetat tamponu, 40 dakika UV ışık süresi, 40 dakika sıcaklık, 0,06 V/s tarama hızı ve 50 mg/dL hidrojen peroksit derişimi olarak belirlenmiştir.
4. Geliştirdiğimiz serum demiri biyosensörü için, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarından, serum demiri tayini çalışılan 25 adet kan serumu örneği alınmıştır. Geliştirdiğimiz serum demiri biyosensörü ile bu örneklerin serum demiri tayini gerçekleştirilmiştir. İçerisinde 5 mL, pH'sı 5,0 olan 200 mM'lık asetat tamponu bulunan ölçüm hücreesi içerisine serum örneklerinden eklenmiş ve taşıyıcı bir protein olan transferrinden ferrik demirin salınması için yaklaşık bir dakika beklenmiştir. Daha sonra hidroksilamin hidroklorür kullanılarak serbest kalan ferrik demir ferröz demire indirgenmiş ve

hücreye hidrojen peroksit ilave ederek serum demiri biyosensörü ile ölçüm alınmıştır.

5. Geliştirilen Serum demiri biyosensörü ile klinik biyokimya laboratuvarından alınan sonuçlar arasındaki ilişki Spearman'ın rho, sınıf-içi korelasyon katsayısı ile kontrol edildi. Spearman'ın rho katsayısına göre kan demiri biyosensörü ile klinik biyokimya laboratuvarı sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yüksek bir ilişki bulundu ($p=0,865$, $p<0,05$).
6. Sonuç olarak voltametrik yöntemle dayalı yeni bir kan-serum biyosensörü geliştirilmiştir. Serum demiri biyosensörü ile daha fazla örnek çalışması yapılarak, atomik absorpsiyon spektroskopisi gibi ikinci bir gold standart ile ölçüm sonuçları karşılaştırılabilir. Transferrinden ferrik demirin salınması aşamasında pH'sı 5,0 olan asetat tamponu kullanılmış, transferrinin Fe^{3+} e olan affinitesini azaltacak farklı biyomoleküller kullanılarak salınım incelenebilir.
7. Daha ileriki çalışmalarla; Otomasyona sistemin uyarlanabilmesi ve aynı enzimin tekrar kullanılabilmesi için biyoaktif tabakanın enzim stabilitesi ile ilgili olarak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
8. Geliştirilen serum demiri biyosensörünün biyolojik sıvılarda yapılacak çalışmalar için biyouyumlu olduğu görülmüştür. Gelecekte doku örneklerinden demir biyosensörünü destekleyecek çalışmalar yapıldıktan sonra toksikoloji gibi klinik çalışma alanlarında kullanılmaya başlanabilir.
9. Bu çalışma bir adım daha ileriye götürülerek değişik anemilerde eritrosit içi demir tayini yapılabilir.
10. Aynı yöntemden yararlanılarak serum ve vücut sıvılarındaki Cu^{+} ve Cu^{2+} gibi oksidoredüksiyona katılan iyonlar ve ilişkili protein analizlerine uygulamaları geliştirilebilir.
11. Adli tıp ve kriminolojik analizlerde, kurutulmuş kan olanağı olan vakalarda kan demiri biyosensörü nitel ve nicel olarak geliştirilebilir. Çevre kirliliği ve gıda teknolojisinde de yöntemin geliştirilmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. **Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C.** Two to Tango: Ragulation of Iron Metabolism. *Cell*, **2010**; 142(1): 24-38.
2. **Ponka P.** Cellular iron metabolism. *Kidney International*. **1999**; 55(69):S2-S11
3. **Uysal Z.** Hepsidin ve Demir Metabolizması. 6. Hematoloji İlk Basamak Kursu. Ankara, **2007**.
4. **Camaschella C.** Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2013**; 1-8.
5. **Wallerstein RO, Mettje SR.** Iron in clinical medicine. ed, Los Angeles, University of California press, **1958**.
6. <http://www.scienzagiovane.unibo.it/English/scientists/menghini-1.html>. Erişim tarihi. 04.01.2020
7. **Fontés G, Thivolle L.** Sur la teneur du sérum en fer non hémoglobinique et sur sa diminution au cours de l'anémie expérimentale. *Compt Rend Soc Biol*, **1925**; 93: 687-689.
8. **Laufberger V.** Sur la cristallisation de la ferritine. *Bull Soc Chim Biol*, **1937**; 19, 1575–1582.
9. **McCance RA, Widdowson EM.** The absorption and excretion of iron following oral and intravenous administration. *J. Physiol*, **1938**; 94:148-154.
10. **Morgan EH, Appleton TC.** Autoradiographic localization of ¹²⁵I- labelled transferrin in rabbit reticulocytes, *Nature*, **1969**; 223:1371–1372.
11. **Clark LC, Lyons C.** Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, **1962**; 102:29-45.
12. **Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, Latte G, Madeddu G, Galleri G, Nuvoli S, Bagella P, Demartis ML, Fiore V, Manetti R, Serra PA.** Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors*, **2016**; 16(6):780.
13. **Wang J.** Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J Pharm Biomed Anal*, **1999**; 19(1-2): 47-53.
14. **Yao SJ.** Chemistry and potential methods for in vivo glucose sensing. In: Wise DL.ed. *Bioinstrumentation and biosensor*, New York, Marcel Dekker, **1991**:229-247.
15. **Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DM, Vojinovic V, Cabral JM, Fonseca LP.** Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*, **2003**; 9: 199–247.
16. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed, New York, Garland Science, **2002**;91(3):401.
17. **Ganz T, Nemeth E.** Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*, **2006**; 1763(7):690-9.
18. **Lee GR.** Iron-deficiency anemia. In: Lee GR, Bithel TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Eds. *Wintrabe's clinical hematology*, Malvern: Lea Febiger;**1993**.
19. **Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA.** *Harper's Biochemistry*. 31th ed, New York, McGraw-Hill, **2018**.

20. **Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG.** The Hemoglobinopathies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D, Eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, USA: International Edition; **1995**: 3417-3484
21. **Ho PJ, Thein SL.** Gene regulation and deregulation: A β globin perspective. *Blood Rev*, **2000**; 14(2):78-93.
22. **Wada Y.** Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2002**; 781(1-2):291-301.
23. <https://www.getbodysmart.com/respiratory-gases-and-their-transport/hemoglobin-structure>. Erişim tarihi: 20.01.2020.
24. **Hoffbrand AV, Moss PAH.** Essential Haematology, 6th ed, Wiley-Blackwel, **2011**.
25. **Lambert LA.** Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors, *Biochim Biophys Acta*, **2012**; 1820(3): 244-255.
26. **Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM.** Ferritin for the clinician. *Blood Rev*, **2009**; 23(3):95-104
27. **Donlin MJ, Frey RF, Putham C, Proctor JK, Boshkin JK.** Analysis of iron in ferritin, the iron-storage protein. *J Chem ed. General Chemistry Experiment*, chem wisch edu, **1998**;75(4):437-441
28. **Nakao A, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR.** Therapeutic antioxidant medical gas. *J Clin Biochem Nutr*, **2009**; 44(1): 1-13.
29. **Fiedler TJ, Davey CA, Fenna RE.** X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution, *J Biol Chem*, **2000**; 275(16): 11964-11971.
30. **Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S.** The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*, **2013**; 65: 1174-1194.
31. **Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA.** Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta*, **2012**; 1823(9): 1468-1483.
32. **Fleming RE, Bacon BR.** Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med*, **2005**; 352(17):1741-1744.
33. **Mackenzie B, Garrick MD.** Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2005**; 289(6):G981-G986.
34. <https://themedicalbiochemistrypage.org/iron-copper.php#top>. Erişim tarihi: 07.01.2020.
35. **Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI.** Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **2000**; 403(6771):776-81.
36. **Andrews NC.** Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, **2008**; 112(2):219-30.
37. **Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA.** An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*, **2009**; 15(37): 4617-26.
38. **West AR, Oates PS.** Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World J Gastroenterol* **2008**; 14(26):4101-4110.

39. **Frazer DM, Anderson GJ.** Iron imports. I. Intestinal iron absorbtion and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2005**; 289(4): G631-G635.
40. **Ma Y, Yeh M, Yeh KY, Glass J.** Iron Imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2006**; 290(3):G417-22.
41. **Patel M, Ramavataram DVSS.** Non transferrin bound iron: Nature, manifestations and analytical approaches for estimation. *Indian J Clin Biochem.* **2012**; 27(4):322-332.
42. **Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, Tripoulas NA, Fox PL.** Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J Biol Chem*, **1999**; 274(2):1116-23.
43. **Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TJ.** Williams Hematology, 7th ed, New York, McGraw-Hill, **2005**.
44. **Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L.** Mechanisms of mammalian iron homeostasis *Biochemistry*, **2012**; 51(29): 5705-24.
45. **Batts KP.** Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol*, **2007**; 1:S31-9.
46. **Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V, et al.** Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem* 2009;284:24155–67.
47. **Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T.** The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*, **2006**; 107(1):328-33.
48. **Kong WN, Gao G, Chang YZ.** Heparin and sports anemia. *Cell Biosci*, **2014**; 4:19.
49. **Siddique A, Kowdley KV.** Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther*, **2012**; 35(8): 876-93.
50. **Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C.** The **2009** revised edition of the Handbook on Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism.
51. **Beşışık SK,** Demir eksikliği anemisi, *Klinik Hematoloji Nobel Tıp Kitabevleri*, **2003**; 4:47–62.
52. **Büyükyazı C.** Annelerde ve yenidoğan bebeklerde ferritin ve hemoglobin düzeyleri. *Uzmanlık Tezi.* Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, İstanbul, **1997**.
53. **Berk PD, Howe RB, Bloomer JR, Berlin NI.** Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest*, **1969**; 48(11): 2176-2190.
54. <https://themedicalbiochemistrypage.org/heme-porphyrin.php>. Erişim tarihi: 02.02.2020.
55. **Tenhunen R, Marver HS, Schmid R.** The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1968**; 61(2): 748-755.
56. **Kutty RK, Maines MD.** Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *J Biol Chem*, **1981**; 256(8): 3956–3962.
57. **Fleming RE, Ponka P.** Iron overload in human disease. *N Engl J Med*, **2012**; 366(4):348-59.
58. **Oliveira F, Rocha S, Fernandes R.** Iron metabolism: from health to disease. *J Clin Lab Anal*, **2014**; 28(3): 210-218.
59. **Tunalı A.** Kan hastalıkları. İç hastalıkları, Bursa: Güneş Kitapevi. **1990**;7:699-716.

60. **Pehlivanoğlu FB.** Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi Gebe Polikliniğine Başvuran Gebelerde Anemi Prevalansı Ve Etiyolojisi. Uzmanlık tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, **2008**.
61. **Castillo J, Gaspar S, Leth S, Niculescu M, Mortari A, Bontidean I, Soukharev V, Dorneanu SA, Ryabov AD, Csöregi E.** Biosensors for Life Quality Design, Development and Applications. Sensors and Actuators B: Chemical, **2004**; 102(2):179–194.
62. **Sharmat A, Rogers RK.** Biosensors. Measurement Science and Technology, **1994**; 5:461-472.
63. **Garipcan B, Çağlayan M, Demirel G.** New generation biosensors based on ellipsometry. In: Serra PA. Ed. New perspectives in biosensor technology and application. Hırvatistan: InTech, **2011**; 197-241.
64. **Eggins BR.** Chemical sensors and biosensors. Analytical Techniques in the Sciences. Wiley J. Sons Limited, **2002**; 1-4.
65. **Eggins BR.** Biosensors: an introduction. Wiley j. Sons Limited, **1996**; 1-13.
66. **Thevenot DR, Toth K, Durst R, Wilson G.** Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Biosensors and Bioelectronics, **2001**; 16 (1–2):121-131.
67. **Borgmann S, Schulte A, Neugebauer S, Schuhmann W.** Amperometric Biosensors. In: Alkire RC, Kolb DM, Lipkowski J. Eds. Advances in electrochemical science and engineering: Bioelectrochemistry, **2011**;13:1-83.
68. **Spichiger-Keller UE.** Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications. Weinheim: Wiley-WCH Verlag GmbH, **1998**; 455.
69. **Yavuz AG.** Polivinil ferrosen modifiye elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, **2005**.
70. **Telefoncu A.** Biyosensörler. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, **1999**: 1-280.
71. **Wang J.** Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. electroanalysis, **2001**; 13(12):983–988.
72. **Newman JD, Turner AP.** Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. Biosens Bioelectron, **2005**; 20 (12):2435–2453.
73. **Telefoncu, A. Kılınç A.** Biyosensörler: metodlar, uygulamalar ve son gelişmeler. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **2012**: 1-189.
74. **Bhalla N, Pawan J, Nello F, Estrela P.** Introduction to biosensors. Essays Biochem, **2016**;60(1):1-8.
75. **Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E.** Electrochemical biosensors-pensor principles and architectures. Sensors, **2008**; 8(3):1400-1458.
76. **Coulet PR.** “What is a biosensor”.In: Blum LJ, Coulet PR. Eds. Biosensor principles and applications, NewYork: Marcel Dekker Inc; **1991**: 1-6.
77. **Topçu M.** Altın biriktirilmiş polivinil ferrosen modifiye Pt elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, **2003**; 21-22.

78. **Justino CIL, Santos RTA, Duarte AC.** Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, **2010**; 29(10):1172-1183.
79. **Babkina SS, Ulakhovich NA, Zyavkina YI.** Amperometric DNA biosensor for the determination of auto-antibodies using DNA interaction with Pt(II) complex. *Anal Chim Acta*, **2004**; 502:23–30.
80. **Koyun A, Ahlatçioğlu E, İpek YK.** Biosensors and their principles. In: Kara S. Eds. *A Roadmap of biomedical engineers and milestones*. Hırvatistan: InTech, **2012**; 115-142.
81. **Buerk DG.** Biosensors: theory and applications, ABD: CRC Press, **1993**.
82. **Newton AJH, Wall MJ, Richardson MJE.** Modeling microelectrode biosensors: free-flow calibration can substantially underestimate tissue concentrations. *J Neurophysiol*, **2017**;117(3): 937-949.
83. **Dursun, F.** Medyatör Bağlı Matrikslerden Tyrosinase Tabanlı Fenol Biyosensörüne Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, **2009**; 31-34.
84. **Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS.** Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, **2007**; 34(5):635-659
85. **Emre FB.** Kolesterol biyosensörü tasarımında bazı polimerik materyallerin enzim immobilizasyon ortamı olarak kullanımı, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, **2007**.
86. **Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR.** Electrochemical biosensors, *Chem Soc Rev*, **2010**;39:1747-1763
87. **Hall EAH.** Biosensors in context, Biosensors, İngiltere: Open University Press, **1990**.
88. **Ammon HPT, Ege W, Oppermann M, Goepel W, Eisele S.** Improvement in the long-term stability of an amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin. *Anal Chem*, **1995**; 67(2):466-471.
89. **Kimmel WD, LeBlanc G, Meschievitz ME, Cliffel DE.** Electrochemical sensors and biosensors. *Anal Chem*, **2012**; 84(2) 685-707
90. **Topkaya SN.** Biyolojik ve kimyasal bazı maddelerin DNA ile etkileşiminin elektrokimyasal biyosensörlerle algılanması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2009**.
91. **Mendes KR, Arruda SA, de Souza EF, Nogueira ab, Teschke O, Bonugli LO, Etchegaray A.** Determination of chlorophenol in environmental samples using a voltametric biosensor based on hybrid nanocomposite. *J Braz Chem Soc*, **2017**; 28(7)
92. **Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ, Fermin CD, Kim M.** Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 2019;12(1):121.
93. **Sheldon RA,** Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *American Chemical Society*, 2011; 15(1):213-223
94. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immethod.html>. Erişim tarihi: 16.01.2020.
95. **Abolfazl MK, Kobra T, Shahla C, Taghi JM, Fateme M, Mohammad TS, Sadat MNA, Nasrın L, Sahram PB, Abbas FAY, Mehr AS.** How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). *Galen Med J*, **2014**; 3(2):63-80.
96. **Borrow GM.** Introduction to molecular spectroscopy, London, Mc graw-hill, **1962**.

97. **Dole MN, Patel PA, Sawant SD, Priyanka SS.** “Advance applications of fourier transform infrared spectroscopy”, *Rev Artic*, **2011**; 7(2):159-166.
98. **Aslantatar E.** Bis (2-izobutirilamidofenil) amin bileşiminin titreşim spektrumunun incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2013**.
99. **Lowe CR.** Biosensors. *Trends in Biotechnology*. **1984**; 2(3):59–65.
100. **Chaubey A, Malhotra BD.** Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **2002**; 17(6-7):441–456.
101. **Eggins B.** Chemical sensors and biosensors. John Wiley & Sons; West Sussex: (Analytical Techniques in the Sciences.), **2002**.
102. **Johnson-Wimbley TD, Graham DY.** Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap Adv Gastroenterol*, **2011**;4(3):177–184.
103. **Gautham KA, Chanchal KM.** Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase- Gold Nanoparticles Conjugate. Department of Biochemistry, School of life science, University of Hyderabad, Hyderabad, Andhra Pradesh, India, **2006**; 9(2):881-894.
104. **Opwis K, Knittel D, Bahners T, Schollmeyer E.** Photochemical enzyme immobilization on textile carrier materials. *Eng Life Sci*, **2005**; 5(1): 63-67.
105. **Bernard MC, Chausse A, Cabet-Deliry E, Chehimi MM, Pinson J, Podvorica F, Vautrin-UI C.** Organic layers bonded to industrial coinage and noble metals through electrochemical reduction of aryldiazoniumsalts. *Chem Mater*, **2003**; 15, 3450–3462.
106. <https://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>. Erişim tarihi: **07.01.2020**
107. **Beynon RJ, Easterby JS.** Buffer solutions. Oxford: IRL Press; **1997**;244-245
108. **Chagas PM, Torres JA, Silva MC, Correa AD.** Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. *Intern Journ of Biol Macromol*, **2015**; 81:568–575.
109. **Eed J.** Factors affecting enzyme activity. *Essai*, **2013**; 10(19): 48-51
110. **eag AN, Byrne SL, Chasteen ND, Mason AB.** Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**; 1820(3):326-33.
111. **Teepoo S, Dawan P, Barnthip N.** Electrospun chitosan-gelatin biopolymer composite nanofibers for horseradish peroxidase immobilization in a hydrogen peroxide biosensor. *Biosensors*, **2017**;7(4): 47.
112. **Nadar SS, Muley AB, Ladole MR, Joshi PU.** Macromolecular crooss-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of a-amylase. *Int J Biol Macromol*, **2016**; 84: 69-78
113. **Magro LD, Hertz PF, Lafuente RF, Klein MP, Rodrigues RC, Rodrigues RC.** Preparation and characterization of a combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification. *RSC Adv*, **2016**; 32:26490-27259.
114. **Islan GA, Martinez YN, Illanes A, Castro GR.** Development of novel alginate lyase cross-linked aggregates for the oral treatment of cystic fibrosis. *RSC Adv*, **2014**; 4(23):11758-11765
115. **Shah S, Sharma A, Gupta MN.** Preparation of cross-linked enzyme agregates by using bovine serum albümin as a proteic feeder. *Anal Biochem*, **2006**; 351(2):207-213

116. **Pena C, de la Caba K, Eceiza A, Ruseckaite R, Mondragon I.** Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresour Technol* **2010**; 101(17): 6836–6842.
117. **Sheelu G, Kavitha G, Fadnavis NW.** Efficient immobilization of lecithase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. *Am Oil Chem Soc*, **2008**; 85(8):739–748.
118. **Sheldon RA, Van PS.** Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev*, **2013**; 42(15) 6223–6235.
119. **Cui JD, Jia SR.** Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates Technology: current development and future challenges. *Crit Rev Biotechnol* **2015**; 35(1): 15-28.
120. **Jie C, Hye IP, Seok LY, Yeol SC, Jun sf, Subhosh MC, Lark YC.** Immobilization of β -glucosidase from *exiguobacterium* sp. DAU5 on chitosan bead for improved enzymatic properties *Korean Journ of Life Sci*, **2010**; 20 (11): 1589~1594.
121. **Robinson PK.** Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 2015;59:1-41
122. **McIntyre S. N. and Walzak M. J.,** 1995, New uv/ozone treatment improves adhesiveness of polymer surfaces, *Modern Plastics* 72, 79-83.
123. <https://www.ushio.eu/excimer-explained/>. Erişim zamanı: 07.01.2020
124. **Zhang JY, Esrom H, Kogelschatz U, Emig G,** Modification of polymers with uv excimer radiation from lasers and lamps, *J Adh Sci Techn*, **1994**; 8, 1179-1210.
125. **Feller G.** Psychrophilic Enzymes: From folding to fonction and biotechnology. *Scientifica*, **2013**.
126. **Sylvia S, Stefan R, Karl HJ,** Simultaneous Determination of Iron(III), Iron(II), and Manganese (II) in Environmental Samples by Ion Chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **1998**; 32, 10, 1530-1537

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adananın Ceyhan ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokulu Tatarlı Çataklı Bakırlı İlköğretim okulunda, Liseyi Ceyhan Endüstri Meslek Lisesi'nde okudu. 1998 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde öğrenime başladı. 2002 yılında Biyolog ünvanı alarak mezun oldu. 2002 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Öğretmenliği Programında Tezsiz Yüksek Lisans eğitimine başladı ve eğitimini 2004 yılında tamamladı.

2005 yılında Askerlik hizmetini Erzurum'da yaptı. 2006 yılında İçişleri Bakanlığında devlet memuru olarak göreve başladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2009 yılında öğrenimini '**Tamiflu'nun insan periferal lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve sitotoksik etkileri**' isimli tezi hazırlayarak tamamladı.

2011 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladı. Evli ve bir kız çocuğu sahibi.

Bilimsel etkinlikler

İla HB, **İlhan A.** In vitro genotoxic perspective of Tamiflu. Cytotechnology, **2012**; 64:443-449.

İlhan A, Kökbaş U, Yaşar Ü, Kartlaşmış K, Kayrın L. Can obtaining the blood sample in different anticoagulant containing tubes effect whole blood count as preanalytical error?. Turk J. Biochem, **2016**;41(S2).

Kartlaşmış K, Kökbaş U, Alparslan M, Sanna B, **İlhan A**, Kayrın L. To the distinction from thalassemia cases of iron deficiency anemia a casual of preanalytical errors. Turk J. Biochem, **2016**;41(S2).

İlhan A, Kartlaşmış K, Kökbaş U, Tuli A, Kayrın L. pH Optimization of the biosensor developed for the determination of carbondioxide. Turk J. Biochem, **2017**;42 (S1).

İlhan A, Kartlaşmış K, Kökbaş U, Tuli A, Kayrın L. Design of a new biosensor for the determination of ferrous iron in blood. Turk J. Biochem, **2018**; 43(S5).

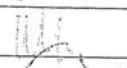
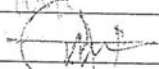
İlhan A, Kökbaş U, Tuli A, Kayrın L. Design of a new biosensor for the determination of ferric iron in blood. Turk J. Biochem, **2019**;44(S3).

İlhan A, Kökbaş U, Tuli, Kayrın L. Application of UV light and temperature period of biosensors developed for determination of serum iron. Turk J. Biochem, **2019**;44(S3).

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

Toplantı Sayısı		Tarih
62		3 Mart 2017

KARAR NO 40- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Levent Kayrın yönetiminde, doktora öğrencisi Umut Kökbaş'ın katkılarıyla, Ahmet İlhan tarafından yürütülmesi öngörülen, "Kanda Demir Ölçümüne Yönelik Biyosensör 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 Kanaoğlu Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik 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	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22