

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PIRÜVAT TAYİNİ İÇİN ALÜMİNYUM NANOPARÇACIKLARLA MODİFİYE
EDİLEN BİYOSENSÖRÜN TASARIMI

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLAYDA DİKKULAK

HAZİRAN 2024

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PİRÜVAT TAYİNİ İÇİN ALÜMİNYUM NANOPARÇACIKLARLA MODİFİYE
EDİLEN BİYOSENSÖRÜN TASARIMI

BIYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlayda DİKKULAK

DANIŞMAN : Doç. Dr. Muhammet Samet KILIÇ

İKİNCİ DANIŞMAN : Prof. Dr. Şeyda KORKUT URU

ZONGULDAK

Haziran 2024

KABUL:

İlayda DİKKULAK tarafından hazırlanan “Pirüvat Tayini İçin Alüminyum Nanoparçacıklarla Modifiye Edilen Biyosensörün Tasarımı” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle/oyçokluğuyla kabul edilmiştir. 25/06/2024

Danışman: Doç. Dr. Muhammet Samet KILIÇ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal
Mühendisliği Bölümü

Üye: Doç. Dr. Atakan TOPRAK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Çaycuma Gıda ve Tarım Meslek Yüksekokulu,
Kimya Teknolojisi Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Veli BAYSAL

Bartın Üniversitesi, Mühendislik, Mimarlık ve Tasarım Fakültesi, Bilgisayar
Mühendisliği Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

....../....../20....

Prof. Dr. Fikret GÖLGELEYEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

İlayda DİKKULAK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PIRÜVAT TAYİNİ İÇİN ALÜMİNYUM NANOPARÇACIKLARLA MODİFİYE EDİLEN BİYOSENSÖRÜN TASARIMI

İlayda DİKKULAK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Muhammet Samet KILIÇ

İkinci Danışman: Prof. Dr. Şeyda KORKUT URU

Haziran 2024, 43 sayfa

Polikaprolakton filmi alüminyum nanopartiküllerle modifiye edilerek yeni, basit ve güvenilir bir biyosensör geliştirilmiş ve pirüvatı tespit etmek için ilk kez kullanılmıştır. Alüminyum nanopartiküller ile modifiye edilmiş film kaplı altın elektrotun elektrokimyasal özellikleri ve yüzey özellikleri döngüsel voltametri, taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Biyosensör, uygulanan +0,4 V potansiyelde 2,30 μA $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ hassasiyetle 1 μM ila 1000 μM konsantrasyon aralığında pirüvata yanıt vermiştir. Biyosensörün doğruluğu $\%99,5 \pm 0,002$ ve bağıl standart sapması sadece $\%0,041$ olarak hesaplanmıştır. Dedeksiyon limiti 0,45 μM olarak hesaplanmıştır. Biyosensör, erkek AB plazmasından elde edilen insan serumu kullanılarak test edilmiş ve $\%105,11 \pm 0,02$ 'lik yüksek ölçüm doğruluğuna sahip bir sonuç vermiştir. Başlangıçtaki yanıt 10 ve 20 gün sonra sırasıyla $\%98$ ve $\%87$ olarak korunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Pirüvat biyosensörü, diferansiyel puls voltammetri, alüminyum nanopartiküller, polikaprolakton, insan serumu.



ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL PYRUVATE BIOSENSOR FOR PYRUVATE DETERMINATION

İlayda DİKKULAK

**Zonguldak Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biomedical Engineering**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammet Samet KILIÇ

Co-Advisor: Prof. Dr. Şeyda KORKUT URU

June 2024, 43 pages

A novel, simple, and reliable biosensor was developed by modifying a polycaprolactone film with aluminum nanoparticles and used for the first time to detect pyruvate. The electrochemical properties and surface characteristics of the aluminum nanoparticles-modified film-coated gold electrode were investigated using cyclic voltammetry, scanning electron microscopy, and energy dispersive X-ray spectroscopy. The biosensor responded to pyruvate within a concentration range of 1 μM to 1000 μM with a sensitivity of $2,30 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ at an applied potential of +0,4 V. The obtained accuracy was $99,5\% \pm 0,002$ with a relative standard deviation of only 0,041%. The limit of detection was calculated to be 0,45 μM . The biosensor was tested using human serum from male AB plasma and gave a result with a high measurement accuracy of $105.11 \pm 0.02\%$. The initial response was maintained at 98% and 87% after 10 and 20 days, respectively.

Keywords: Pyruvate biosensor, differential pulse voltammetry, aluminum nanoparticles, polycaprolactone, human serum.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, destek ve yardımlarıyla hep yanımda olan, hoşgörölü, anlayışlı ve bana her zaman yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhammet Samet KILIÇ' a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımı yapabilmek için çevre laboratuvarını kullanımımıza açan ve tüm süreçte çalışmalarımı izleyerek fikir ve tecrübeleri ile çalışmamı yönlendiren değerli hocam İkinci Danışman Prof. Dr. Şeyda KORKUT URU' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da beni sabırla destekleyen, maddi manevi yanımla olan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

ZBEU-2023-39971044-02 numaralı ve “Pirüvat Tayini İçin Alüminyum Nanoparçacıklarla Modifiye Edilen Biyosensörün Tasarımı” başlıklı projemizi finanse eden Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
BÖLÜM 1 PİRUVAT MOLEKÜLÜ	1
1.1 PİRUVAT VE ÖNEMİ	1
1.2 KONVANSİYONEL PİRUVAT TAYİN METOTLARI.....	2
1.2.1 Spektrofometri Yöntem	2
1.2.2 Enzimatik Analiz	3
1.2.3 Kolorimetrik Yöntem.....	3
1.2.4 Kromatografik Yöntemler.....	3
BÖLÜM 2 ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLER	5
2.1 ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR ÇEŞİTLERİ	7
2.2 BİYOMEDİKAL ALANINDA KULLANILAN BİYOSENSÖRLER.....	8
2.3 PİRUVAT BİYOSENSÖRLERİ	10

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

BÖLÜM 3 MATERYAL METOT.....	15
3.1 KİMYASALLAR.....	15
3.2 CİHAZLAR	15
3.3 BİYOSENSÖR PROBUNUN HAZIRLANMA AŞAMALARI.....	15
3.3.1 Tampon Çözeltinin Hazırlanması	16
3.3.2 AINPs Modifiye Polimer Çözeltisinin Hazırlanması	16
3.3.3 Enzim Çözeltinin Hazırlanması.....	16
3.3.4 Elektrot Temizleme Prosedürü	16
3.3.5 Elektrot Yüzeyinin Polimerik Filmle Kaplanması ve Enzim İmmobilizasyonu	17
3.4 PİRUVAT ÖLÇÜM SİSTEMİ VE PARAMETRELERİ	17
BÖLÜM 4 BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1 PCL/AINPs FİLMİNİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI.....	19
4.1.1 Yüzey Morfolojisi.....	19
4.1.2 Elektrokimyasal Yüzey Karakterizasyonu	21
4.2 PİRUVAT TESPİTİ İÇİN UYGULANAN POTANSİYELİN BELİRLENMESİ	23
4.3 OPTİMUM AINPs DOZUNUN BELİRLENMESİ	25
4.4 OPTİMUM pH DEĞERİNİN BELİRLENMESİ	27

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.5 BİYOSENSÖRÜN ANALİTİK PARAMETRELERİ.....	27
4.6 İNSAN SERUMUNDA PİRUVAT ÖLÇÜMÜ	32
BÖLÜM 5 SONUÇLAR	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Pirüvatın kimyasal yapısı.	1
Şekil 2.1 Biyosensörlerin bileşenleri ve genel çalışma mekanizması..	6
Şekil 2.2 Üçlü elektrot sistemi deney düzeneği	7
Şekil 3.1 Pirüvat biyosensör elektrodunun fabrikasyon aşamalarının şematik gösterimi.	17
Şekil 3.2 Biyosensör ölçüm sisteminin şematik diyagramı.	18
Şekil 4.1 PCL/Au elektrodunun $\times 1000$ büyütmedeki SEM görüntüsü.	19
Şekil 4.2 AlNPs/PCL/Au elektrodunun $\times 1000$ büyütmedeki SEM görüntüsü.....	20
Şekil 4.3 AlNPs/PCL/Au elektrot yüzeyinin EDX analizi.	20
Şekil 4.4 PyOx immobilize PCL/Au ve AlNPs/PCL/Au elektrotlarının CV'leri.....	21
Şekil 4.5 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ve 0,1 M KCl içeren 50 mM pH 7,0 PBS tamponu içinde 0,08 ile 0,9 V s ⁻¹ arasındaki tarama hızlarında gerçekleştirilen CV grafiği.	22
Şekil 4.6 CV'den elde edilen redoks akımlarına karşı tarama hızının karekökünün grafiği.....	23
Şekil 4.7 100µM ile 500 µM arasında artan H ₂ O ₂ konsantrasyonlarından elde edilen DPV grafiği.....	25
Şekil 4.8 AlNP konsantrasyonunun +0,4 V'ta biyosensör yanıtı üzerindeki etkisi.....	26
Şekil 4.9 pH'ın biyosensör yanıtına etkisi.....	27
Şekil 4.10 1µM ile 1000 µM arasında artan pirüvat konsantrasyonlarına karşı DPV'nin verdiği yanıtlar	30
Şekil 4.11 Pirüvat biyosensörünün logaritmik kalibrasyon grafiği.....	30



ÇİZELGELER DİZİNİ

No

Sayfa

Çizelge 4.1 Pirüvat tespiti için kullanılan bazı biyosensörlerin analitik parametrelerinin özeti.....31





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

V	: Volt
μ A	: Mikroamper
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
μ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mV	: Milivolt
s	: Saniye
μ L	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
$\emptyset$	: Çap

KISALTMALAR

AlNPs	: Alüminyum nanopartiküller
ATP	: Adenozin trifosfat
Au@CNT	: Karbon nanotüp yüzeyine modifiye altın nanopartükülleri
AuE	: Altın elektrot nanopartikülleri
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
c-MWCNT	: Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler
CNT	: Karbon nanotüp
CuNPs	: Bakır Nanopartikülleri

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam ediyor)

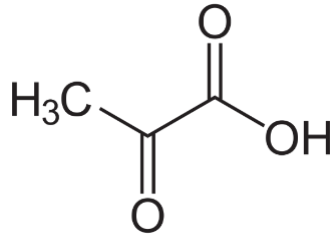
CV	: Döngüsel voltametri
DPV	: Diferansiyel puls voltametrisi
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
GA	: Gluteraldehit
GOx	: <i>Glikoz oksidaz</i>
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
LDH	: <i>Laktat dehidrojenaz</i>
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidritin
PANI	: Polianilin
PCL	: Polikaprolakton
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PtNP	: Platin nanopartikül
PyOx	: <i>Pirüvat oksidaz</i>
SCE	: Doymuş kalomel elektrot
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TPP	: Tiamin pirofosfat klorürün

BÖLÜM 1

PİRUVAT MOLEKÜLÜ

1.1 PİRUVAT VE ÖNEMİ

Pirüvat ($C_3H_4O_3$), tüm canlı hücrelerin hücre bileşenlerinde belirgin olarak bulunan alfa-keto yapısında bir maddedir. IUPAC'ın resmi terminolojisi pirüvatı, α -keto propanoik asit olarak isimlendirmektedir. Pirüvatın kimyasal yapısı Şekil 1'de sunulmuştur [1]. Üç karbon atomu içeren pirüvat, yapısında bir keton grubu ve bir karboksil grubu barındırır [2]. Karboksilik asidi oluşturan karbon, ilk karbon atomu olarak yazılmaktadır ve karbon omurgası boyunca karboksilik asit terminalinden uzaklaşarak bağlanma devam etmektedir. Ardından α -karbon olarak da adlandırılan ve ana fonksiyonel gruba en yakın pozisyonda bulunan ikinci karbon atomuna keton grubu bağlanmaktadır. Pirüvatın yapısında bulunan metil grubu üçüncü karbona bağlanmaktadır [3].



Şekil 1.1 Pirüvatın kimyasal yapısı.

Pirüvat; substrat, ürün veya ara madde olarak protein, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında önemli bir molekül olarak görev yapar [4]. Biyolojik enerji üretiminde rol oynayan glikolitik ve pirüvat dehidrojenaz yollarında önemli bir ara üründür. Canlı organizmalarda yaygın olarak bulunur ve vücut hücrelerinde sentezlenebildiği için temel bir besin maddesi değildir [5]. Hücrenin karşılaştığı duruma göre aerobik ve anaerobik koşullar altında biyolojik enerji üretiminde rol alan glikoliz de dahil olmak üzere çeşitli metabolik yollarda yer alan anahtar molekül olduğu bilinmektedir [6]. Glikoliz, glikozun çeşitli enzimlerle pirüvata (pirüvik asit) kadar yıkılması olayıdır. Bir başka deyişle hücre devamlılığını sağlamak için gerekli olan enerjinin kazanıldığı enzimatik reaksiyonlar zinciridir. Bu reaksiyonlar sonunda glukoz pirüvik

asite (pirüvata) kadar parçalanarak ATP kazanılır [7]. Glikoliz; 1 mol glukozun, 2 mol pirüvat oluşturmak üzere, net 2 mol ATP ortaya çıkararak yıkılmasıdır. Reaksiyon zincirinde aslında 4 mol ATP açığa çıkmasına rağmen; 2 mol ATP, ilk basamaklarda reaksiyonların başlayıp ilerlemesi için hidrolize edilmektedir. Glukoz oksidasyonu ise, glikoliz reaksiyonları sonucu açığa çıkan pirüvatın, oksijen varlığında yıkımıdır. İki reaksiyon zinciri de, çeşitli fonksiyonların gerçekleşmesi için kullanılmak üzere farklı miktarlarda enerji açığa çıkarır [8].

Vücudumuz için elzem olan pirüvat kanda 40-120 μ M seviyeleri arasında olması beklenmektedir [9,10,11,12]. Bu seviyelerin çeşitli hastalık durumlarında normal seviyelerin dışına çıktığı bilinmektedir. Bu metabolitin anormal seviyelerinin kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, siroz, metabolik asidoz ve ciddi beyin anormallikleri gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir [1]. Özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve koroner enfarktüs gibi kardiyojenik şiddetin neden olduğu çeşitli hastalık durumları, yüksek pirüvat seviyelerini kalp yetmezliğindeki biyokimyasal değişikliklerle ilişkili olarak açıklamaktadırlar [13,14,15]. Bazı literatür sonuçlarında kardiyojenik ve karaciğer hastalığı olan bireylerde kan pirüvat düzeylerinde artış tespit edilirken, beyin dokusu disfonksiyonu olan hastaların beyin omurilik sıvısında (BOS) artan pirüvat düzeyleri tespit edilmiştir [16,17,18]. Kan ve BOS'da yüksek laktat ve pirüvat düzeyi, Leigh sendromu hastalığının tespitinde tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır [19]. Araştırmalar pirüvatın kanser için bir tarama molekülü olduğunu da göstermiştir. Oral kanserli hastaların serum ve tükürüklerindeki pirüvat konsantrasyonlarının normal seviyelerden 2 ila 2,8 kat daha yüksek olduğu bilinmektedir, bu da pirüvat testinin yararlı bir ağız kanseri tarama yöntemi olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir [20]. Ayrıca, asit-baz dengesini korumaya yardımcı olan pirüvatın, *laktat dehidrogenaz* reaksiyonunu teşvik ederek egzersize bağlı metabolik asidozu önleyebileceği öne sürülmüştür [14]. Sonuç olarak pirüvatın klinik ve tanısal açıdan tespiti, yukarıda bahsi geçen ve pirüvat eksikliğinde ortaya çıkabilecek sorunların takibinde önemli bir parametre olarak yer almaktadır.

1.2 KONVANSİYONEL PİRUVAT TAYİN METODLARI

1.2.1 Spektrofotometrik Yöntem

Spektrofotometri, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak bir maddenin tranmittans/absorbans özelliklerini incelemekte ve kantitatif bir ölçüme olanak sağlamaktadır. Yöntemin temeli, ışık konsantrasyonun belirli dalga boyu aralığında emilmesi veya iletilmesi prensibi ile çalışmaktadır. Spektrofotometre iki cihazdan olmaktadır. Bu cihazlar spektrometre ve

fotometredir. Spektrometre herhangi bir dalga boyunda ışık üretir. Fotometre ise ışığın yoğunluğunu ölçer [21]. Bu yöntem ile maddenin niceliksel analizi yapılabilir. Spektrofotometri kimya, fizik, biyokimya ve klinik uygulamalar gibi geniş bir alana hitap eden yöntemlerinden birisidir. Yöntemin geniş analiz yelpazesi (görünür ışık, UV, IR), tahribatsız ölçüm, yüksek hassasiyet ve doğruluk gibi çeşitli kazanımları bulunmaktadır. Ancak, prosedürün zaman alması, bazı numunelerin ön işleme tabi tutulabilmesi, uzman personel gereksinimi ve pahalı bir yöntem olması, dikkate alınması gereken unsurlar olarak nitelendirilmektedir [1].

1.2.2 Enzimatik Analiz

Enzimatik analiz spesifik, hızlı ve gerçekleştirilmesi kolay olan deneysel bir metottur. Bu yöntem, kandaki pirüvat düzeylerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan analiz metotlarından birisidir. Bu yöntem nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) ile laktatı, pirüvata dönüştürmek için kullanılır. Oluşan nikotinamid adenin dinükleotid hidritin (NADH) oranı doğrudan laktat konsantrasyonuyla ilişkilidir. Bu reaksiyonun tersi pirüvatın miktarının belirlenmesi için kullanılır [22].

1.2.3 Kolorimetrik Yöntem

Bir çözelti içinde bulunan maddenin konsantrasyonunu çözeltinin renginden yararlanarak ölçme yöntemine kolorimetri, bu tip ölçümler için tasarlanan fotometre temelli cihazlara da kolorimetre denir. Yöntemde renk yoğunluğu hesaplanmakta ve numune konsantrasyonuyla ilişkilendirilmektedir. Kolorimetride numunenin rengi ile bilinen bir renk standardının rengi karşılaştırılmaktadır. Bu yöntemin, hücrelerdeki laktat/pirüvat oranının izlenmesi, su kalitesinin kimyasal analizi ve besin maddelerinin konsantrasyonun belirlenmesi gibi yaygın bir kullanım alanı mevcuttur. Yöntem, renkli maddelerin analizi için ucuzluk, taşınabilirlik ve kolay kullanım sunması sebebiyle avantaj sağlamaktadır. Ancak rengi olmayan maddelerin analizinin yapılamaması, hassasiyetin düşük olması ve hataya açık kullanım şekli yöntemin dezavantajları olarak gösterilebilmektedir [23].

1.2.4 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kompleks bir numunenin bileşenlerini tek tek ayırmak ve tanımlamak için kullanılan bir tekniktir. Yöntemin esasında; sabit bir faz üzerinden hareketli faz geçirilmektedir. Numunedeki bileşenler dağılma ve adsorpsiyon gibi mekanizmalarla zamanla taşınmakta ve

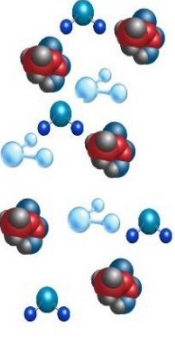
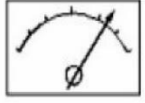
ayrılmaktadır [24]. Pirüvatın tespiti için çeşitli kromatografik ayırma teknikleri mevcuttur. Bu teknikler; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) olarak adlandırılmaktadır [1]. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, bileşikleri yüksek basınçta ayırmakta ve analiz etmekte kullanılır. Gaz kromatografisi, maddelerin gaz halinde olduğu veya ayrışmadan gaz fazına getirilebildiği karışımları ayırmakta kullanılır. Sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometresi isminden de anlaşılacağı üzere iki yöntemin bir arada kullanılabildiği bir cihazdır ve çok düşük konsantrasyonlardaki maddelerin analizinin yapılabilmesini sağlamaktadır [25,101]. Günümüzde kromatografi; kimya, biyoloji, çevre bilimi ve bunların yanı sıra petrol endüstrisi gibi birçok akademik ve endüstriyel alanda aktif olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bu yöntemin seçilmesinde bazı öne çıkan özellikleri vardır. Bu özellikler; yüksek çözünürlük, hızlılık, hassasiyet, küçük boyuttaki numune analizi ve bileşiklerin kimyasal özelliklerine göre ayrılabilmesi olarak söylenebilmektedir. Yöntemin dezavantajlı olduğu noktalarda bulunmaktadır. Bu noktalar; yöntemin kullanımının pahalı olması, nitelikli personel ihtiyacı, özel koşullara ihtiyaç duyması ve bazı durumlarda işlem süresinin uzunluğudur [102].

BÖLÜM 2

ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, biyolojik olarak aktif maddelerin (biyoreseptör) analiz sistemleriyle birleştirilmesinden oluşan ve biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektrik sinyallerine çeviren analitik cihazlardır [26,27]. Biyosensörler önemli avantajlarından dolayı birçok alanda oldukça başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Özellikle geleneksel yöntemlere kıyasla çok daha ucuz, farklı analitlere uyarlanabilme ve yüksek seçicilik gibi nitelikleri, biyosensörleri son yıllarda tercih edilen multidisipliner bir konu haline getirmiştir [28]. Biyosensörler, temelde çevirici ve biyoreseptör olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Biyoreseptörler; analitin tanınmasından ve büyük ölçekte sensörün spesifikliği ve hassasiyetinden sorumlu olan kısmı oluşturmaktadırlar [29]. Biyosensörlerin tasarımında enzimler, antijen-antikorlar, mikroorganizmalar, organeller, dokular ve hücreler gibi çeşitli biyolojik materyaller kullanılabilmektedir. Enzimler bahsi geçen biyolojik materyaller arasında, yüksek duyarlılıkları ve özgüllükleri nedeniyle en fazla tercih edilen ve kullanım alanı bulunan biyomatemaryallerdir [30]. Enzimlerin bu yüksek duyarlılıkları ve özgüllükleri tıpkı bir anahtar-kilit ilişkisi gibi kendilerine özgü substratlarıyla oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarına girmelerinden ileri gelmektedir. Genel olarak amaç, biyoreseptörün bağlandığı belirli bir analitin veya analit grubunun konsantrasyonu ile ilişkili bir sinyal üretmektir [31,32]. Bu sinyal çevirici diye adlandırılan kısımda işlenmekte ve konsantrasyon bağımlı bir sinyal üretilmesi beklenmektedir. Çeviricilerin sinyal iletim şekline bağlı olarak fiziksel bileşenlerini; optik, kütle, termal ve elektrokimyasal olarak sınıflandırmak mümkündür [33]. Bahsi geçen çeviriciler arasında elektrokimyasal çeviricileri kullanan biyosensörler, düşük tayin sınırı, yüksek tekrarlanabilirlik, hızlı yanıt, düşük maliyet ve minyatürleştirilebilme gibi çeşitli avantajlar sunmaktadırlar [34-37]. Bu durum elektrokimyasal çeviricilerle tasarlanan biyosensörleri son yıllarda oldukça popüler bir duruma getirmiştir. Elektrokimyasal biyosensörlerin temel çalışma prensibi, biyosensör probu üzerinde bulunan genellikle bir polimer film yüzeyine immobilize edilmiş biyoreseptör ile hedef analit arasında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlara dayanmaktadır. Bu reaksiyonlar sayesinde ölçüm yapılan ortamın elektrik akımı veya potansiyeli gibi ölçülebilir elektriksel özelliklerini etkileyen iyonları veya elektronları üretmesi

veya tüketmesiyle bir sinyal oluşturulmaktadır [38]. Sonuç olarak tayin edilmek istenen analit konsantrasyonu belirlenebilmektedir. Biyosensörlerin bileşenleri ve genel mekanizması Şekil 2.1’de özetlenmiştir.

BİYOSENSÖR			
1. ANALİT	2. BİYORESPTÖRLER (BİYOBİLEŞEN)	3. ÇEVİRİCİ	4. ELEKTRİKSEL SİNYAL
	Enzimler Antikorlar Mikroorganizmalar Nükleik Asitler Dokular Hücreler Yapay Biyolojik Reseptörler	Elektrokimyasal Optik Termal Mekanik Kütle Duyarlı	

Şekil 2.1 Biyosensörlerin bileşenleri ve genel çalışma mekanizması.

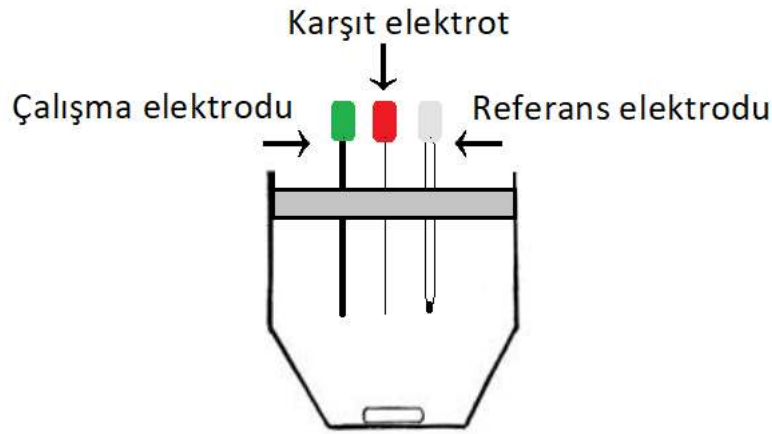
Elektrokimyasal temelli çalışmalarda çoğunlukla üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır [39]. Üçlü elektrot sisteminde, ilgili reaksiyonun meydana geldiği çalışma elektrodu (camsı karbon, altın, platin vb.), çalışma elektroduna kıyasla sabit bir potansiyeli koruyan referans elektrot (Ag/AgCl veya kalomel elektrot) ve karşıt elektrot (genellikle platin çubuk) bulunmaktadır [40]. Ayrıca bu üç elektrodu bir çözelti ortamında kullanabilmek için bir elektrokimyasal hücreye ihtiyaç vardır. Üçlü elektrot sistemi Şekil 2.2’de sunulmuştur.

Çalışma elektrodu; yük aktarımının gerçekleştiği, yüzeyinde elektro aktif türün yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Çok çeşitli türde çalışma elektrodu bulunmaktadır. En sık kullanılan elektrotlar metal (platin veya altın gibi) ve karbon elektrotlardır. Kullanılan çalışma elektrotlarının yüzey alanları, polarizasyonu arttırmak için küçük tutulmalıdır. İdeal bir çalışma elektrodu geniş bir potansiyel aralığına ve düşük dirence sahip olmalı, kolay temizlenebilmeli ve sinyal/gürültü oranı yüksek olmalıdır. Biyosensör çalışmalarında ince film ve enzim immobilizasyonu gibi deneysel modifikasyonlar çalışma elektrot yüzeyinde

gerçekleştirilmektedir ve bu durum aslında çalışma elektrodunu biyosensör probuna dönüştürme işlemidir [41].

Referans elektrotları; elektrokimyasal çalışmalar sırasında içinde bulunduğu çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen ve potansiyeli dış ortamdan bağımsız olan elektrotlardır. Ag/AgCl ve kalomel referans elektrotları yaygın olarak tercih edilmektedirler [42,43].

Karşıt elektrot; çalışma elektroduyla bir çift oluşturarak onu elektronlarla besler, ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir. Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözeltiden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. Karşıt elektrodun yüzey alanı çalışma elektrodundan büyük olmalıdır. Karşıt elektrotta genellikle bir platin tel kullanımının yanı sıra civa havuzu, grafit, tantal ya da tungsten çubuklar kullanılmaktadır [44].



Şekil 2.2 Üçlü elektrot sistemi deney düzeneği.

2.1 ELEKTROKİMYASAL BİYSENSÖR ÇEŞİTLERİ

Biyoalgılama esnasında meydana gelen değişikliklere dayanan elektrokimyasal biyosensörler, amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik olarak üç bölümde incelenebilmektedirler.

Amperometrik biyosensörler, gerçekleşen biyokimyasal bir reaksiyon ile analitin oksidasyonundan veya redüksiyonundan kaynaklanan akımı ölçmektedirler. Clark oksijen elektrodu, oksijen konsantrasyonu ile orantılı olarak bir akımın üretildiği amperometrik biyosensörlerin temelini temsil etmektedir. Amperometrik sistemler, çalışma elektrodunda bir elektro-aktif bileşenin indirgenmesi veya yükseltgenmesiyle oluşan akımın ölçülmesi temeline dayanır. Ayrıca amperometrik biyosensörler, kondüktometrik ve potansiyometrik

biyosensörlerle karşılaştırıldığında; yüksek duyarlılık, hızlılık ve ucuzluk gibi avantajlara sahiptir [45]. Bu avantajlarından dolayı bugün piyasada bulunan ticari biyosensörlerin çoğunluğu amperometrik enzim biyosensörü tipindedir [46].

Potansiyometrik, duyuusal analizlerde köklü bir yere sahip olan en eski enstrümental yöntemlerden birisidir. Elektrokimyasal hücrede oluşan gerilim değerlerinin bir çalışma elektrodu ve referans elektrot kullanılarak ölçüldüğü yöntemdir. Eğer, konsantrasyonu değişen numune çözeltisinin potansiyelinde bir değişim meydana gelirse, bu değişim potansiyometre ile ölçülerek konsantrasyonla ilişkilendirilmektedir. Potansiyometrik biyosensörler; yüksek seçicilikleri, düşük maliyetleri ve basit olmaları nedeniyle çevre, sağlık ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [47].

Kondüktometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon sırasında çözeltinin elektriksel iletkenliğini ölçmektedirler. Elektrokimyasal reaksiyonlar iyon veya elektron ürettiğinde çözeltinin genel iletkenliği veya direnci değişmektedir. Zayıf sinyal-gürültü oranı nedeniyle, özellikle de kullanılan biyolojik reseptörün bir enzim olduğu biyo-algılama uygulamalarında, daha az tercih edilmektedirler [48,49].

2.2 BİYOMEDİKAL ALANDA KULLANILAN BİYOSENSÖRLER

Günümüzde fizyolojik sıvılar içerisinde bulunan maddelerin dikkate değer bir bölümü için biyosensörler tasarlanmıştır. Tasarlanan bu biyosensörlerin bazıları ticari olarak üretilirken bazıları da henüz akademik yayın olarak literatürde bulunmaktadır. Glikoz biyosensörü (glikometre), gebelik testi ve Covid-19 testi gibi biyosensörler kişinin kendisi tarafından uygulanabilen ve sağlık alanında büyük kolaylık sağlayan ticari biyosensörlere örneklerdir. Biyomedikal alanında kullanılan bazı biyosensörler aşağıda özetle sunulmuştur. Glikoz biyosensörü, literatürde bilinen ilk biyosensördür [50].

Glikoz biyosensörlerinin genel çalışma prensibi, immobilize *glikoz oksidaz* (GOx) ile glikozun enzimatik reaksiyonuna dayanmaktadır ve moleküler oksijen varlığında gerçekleşmektedir. Reaksiyonda glikoz, glikolik aside okside olurken yan ürün olarak hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır.

Glikoz biyosensörleri kompakt, kullanımı kolay, güvenilir, hızlı ve doğru sonuçları üretebilen analitik cihazlardır. Literatürde, kan veya dokudaki glikozu ölçmek için implante edilebilir sensörler de dahil olmak üzere çok sayıda farklı glikoz biyosensörü geliştirilmiştir. Glikoz sensörleri, deri altı yağ dokusunda interstisyel glikoz seviyelerini ölçen küçük, minimal invaziv

cihazlar olarak ticarileştiği de bilinmektedir [51]. Günümüzde bilhassa diyabet hastası olan kişilerin ve hastanelerin yaygın olarak kullandığı bir cihaz konumundadır [52].

Gebelik testleri biyosensörlerin en bilinen ve en sık kullanılan örneklerinden bir tanesidir. Bu tip biyosensörler, hamilelik sürecinde ortaya çıkan ve gebelik hormonu olarak bilinen koryonik gonadotropin maddesini idrar örneğinde tespit etme prensibi ile çalışmaktadırlar. Hamilelik testleri, pozitif veya negatif sonuç veren ve sadece 2 ile 5 dakika içinde %99'dan fazla doğru sonuç üretmektedirler. Yanal akış analizleri olarak adlandırılan bu sensör örneği, görsel ve tutarlı sonuçlar verdiği için uluslararası ticari bir başarıya ulaşmıştır. Uygulamasının ve ulaşılmasının basit, güvenilirliğinin ve doğruluğunun yüksek olması bu biyosensörün ticari başarısına büyük katkı sağlamıştır.[103].

Biyosensörler, Covid-19 tanısında da kullanılarak pandemi süresince hastane ve bilhassa havaalanlarında büyük kolaylık sağlamışlardır. Bu tip sensörler, birbirine spesifik maddeler olan antijen ve antikor etkileşimi prensibi ile sonuç verebilen immünosensör olarak adlandırılan biyosensör örneklerindendir. Covid-19 biyosensörleri tipine göre tüm vücut sıvılarında ölçüm yapabilmektedirler. Medyatör gibi elektro aktif maddelerin kullanımıyla beraber halihazırda kullanılan yöntemlere göre tayin alt sınırları oldukça düşüktür. Bu özelliğinden dolayı Covid-19 test kitleri hem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) güvenilirliğine sahip hem de hızlı bir yöntem olarak kısa zamanda kabul görmüştür [50,53].

Yeni bir ilaç geliştirmek 12-15 yıl sürebilen ve maliyeti 1 milyar doları aşabilen karmaşık bir süreçtir. Bu sürenin ve maliyetin daha aza indirilebilmesi için elektrokimyasal, optik ve mikrobiyal biyosensörler kullanılabilir. Literatürde hücre canlılığı, sitotoksite gibi parametrelerin değerlendirilmesi için hücre kültürü çalışmaları ile kıyaslandığında elektrokimyasal biyosensörlerin de benzer sonuçlar verdiğine yönelik çalışmalar mevcuttur. Elektrokimyasal biyosensörlerin dışında optik biyosensörler de ilaç tayininde kullanılabilir. Genellikle antijen-antikor ve ilaç-protein etkileşiminin yüksek seçiciliğinden yararlanan optik biyosensörler, fizyolojik parametrelerin belirlenmesi ve bazı karmaşık ilaç analizleri için geliştirilen afinite ligand bazlı biyosensörler olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra ilaç araştırmalarında genotoksik ve karsinogenik kimyasalların tespiti ve taranması için geliştirilen mikrobiyal biyosensörler ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar ışığında ilk ticarileşen VITOTOX® adlı bir ilaçtır VITOTOX®, ilaç geliştirmenin erken aşamalarında çeşitli ilaç adaylarının genotoksite değerlendirmesi için kullanılan bir biyosensördür. Ames testinden elde edilen sonuçlarla iyi bir korelasyon gösteren VITOTOX®

testi ile 1-4 saat içinde test edilen bileşenlerin genotoksisite potansiyeli hakkında veriye ulaşılabilmektedir [54,55].

Biyosensörler kanser patolojisi ve biyolojisi konularında da bilim insanlarına yeni bakış açıları kazandırmıştır. Tümör hücrelerinin erken tanısında genel olarak elektrokimyasal biyosensörler kullanılmaktadır. Bu yöntemin bilinen uygulamalarından biri tümör hücrelerinin, hücre empedans algılama teknolojisine dayalı biyosensörler tarafından tespit edilmesidir. Yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal bir araştırma yöntemi olan siklik voltametri, elektrot yüzeyindeki hücrelerin büyümesinin neden olduğu elektrot ara yüzündeki empedans veya mikro akımdaki değişikliği tespit etmek için kullanılabilmektedir [51].

Anaerobik koşullar altında laktat üretimi, insan performans seviyelerinin, yorulmanın ve hidrasyonun bir göstergesidir. Yüksek laktat seviyeleri, konjestif kalp yetmezliği, hipoksi ve diyabetik ketoasidoz, iskemi, felç gibi çeşitli tıbbi durumlardan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla laktatın gerçek zamanlı olarak saptanması yukarıda bahsi geçen tıbbi durumların değerlendirilmesinde yararlı olabilmektedir. 1976 yılında La Roche (İsviçre), ilk defa enzim tabanlı bir laktat biyosensörünü geliştirmiştir ve bu biyosensör Lactate Analyzer LA 640 ismiyle piyasaya sürülmüştür. Daha sonraları ticari olarak kullanılan bazı önemli laktat biyosensörleri, Yellow Springs Instruments –3L, Eppendorf (Almanya), Nova Biomedical (ABD) – Lactate Plus firmaları tarafından kullanıma sunulmuştur [56].

Başka bir literatür verisinde araştırmacılar, spesifik olarak geliştirilen ve bor nitrür kuantum nanoparçacıklarının kullanıldığı elektrokimyasal bir biyosensör ile kalp kasında meydana gelen hasarlar sonrasında kan dolaşımına salınan ve kalp krizini tetikleyen troponin değerlerini anlık ve yüksek seçicilikle tespit edilebildiğini sunmuşlardır. Böylelikle troponin kaynaklı oluşabilecek sağlık riskleri için kullanılabilecek bir biyosensörün temelleri literatürde raporlandırılmıştır [57].

Biyosensörlerin geleneksel analizlere kıyasla bilgiye hızlı bir şekilde ulaşması ve ticarileşme potansiyeline sahip olması son yıllarda üzerine yapılan çalışmaların eksponansiyel olarak artışını sağlamaktadır ve her geçen gün literatüre yeni bir araştırma eklenmektedir.

2.3 PİRUVAT BİYOSENSÖRLERİ

Kulys ve arkadaşları aracı olarak metilen yeşili ile modifiye edilmiş karbon macunu bazlı ve enzim temelli (*pirüvat oksidaz*) pirüvata duyarlı bir amperometrik biyosensör elektrodu

tasarlamışlardır. İnsan terindeki pirüvatın belirlenmesi için tasarlanan ve 2 aydan uzun süre stabil kaldığı ifade edilen biyosensörün doymuş kalomel elektroda (SCE) karşı 0-0.5 V aralığında anodik bir akım ürettiği belirtilmiştir. Tasarlanan biyosensör hassasiyeti $51,8 \mu\text{A } 1 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ 'dir. Lineer aralığı çözeltideki normal oksijen konsantrasyonuna bağlı olmadığı rapor edilmiştir [10].

Arai ve arkadaşları elektron alıcı olarak pirüvat dehidrojenaz ve 2-metil-1,4-naftokinon içeren bir karbon macun bazlı bir amperometrik çalışma elektrodu tasarlanmıştır. Elektroda *pirüvat oksidaz* enzimi immobilize edilmiştir. Sisteme flavin adenin dinükleotit disodyum tuzunun (FAD) ve tiamin pirofosfat klorürün (TPP) eklemeleri yapılmıştır ve pirüvat ile reaksiyonunda gerekliliği ele alınmıştır. FAD' ın yokluğunun, muhtemelen enzimle olan yüksek enerjili bağı nedeniyle enzimatik aktivite üzerinde çok küçük bir etkiye sahip olduğu ve TPP 'nin yokluğunun ise enzimatik aktivite üzerinde çok çarpıcı bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada $1 \mu\text{M}$ ila 2 mM aralığında ölçüm alınmış ve tespit sınırı $1 \mu\text{M}$ ($2,9 \text{ nA cm}^{-2}$) olarak belirtilmiştir. 7 gün boyunca yapılan ölçümlerde %5'ten daha az düşüş gözlemlenmiştir [58].

Akyılmaz ve Yorgancı'nın yaptığı bir çalışmada; pirüvat ve fosfat tayini için *pirüvat oksidaz* bazlı amperometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör tasarımında kullanılan *pirüvat oksidaz*, jelatin ve glutraldehit (çapraz bağlama ajanı olarak, %2,5) ile immobilize edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında optimum sıcaklık 35°C , pH değeri 7,0 olarak tespit edilmiştir. Biyosensör; glikoz, askorbik asit, laktik asit, oksalik asit ve sitrik asit gibi muhtemel girişim yapabilecek maddelerle test edilmiş ve girişimin etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu rapor edilmiştir. Biyosensörün $0,0025$ ile $0,05 \mu\text{M}$ arasındaki konsantrasyonlarda doğrusallık sunduğu belirtilmiştir. Biyosensörün tepki süresi de 3 dakika olarak tespit edilmiştir. Aynı grubun yapmış olduğu bir başka çalışmada, *pirüvat oksidaz* enzimine dayalı bir biyosensör tasarlanmış ve tiamin (B1 vitamini) molekülünün enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Biyosensör, jelatin ve glutraldehit kullanılarak çözünmüş oksijen probu üzerinde kovalent immobilizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Tiaminin, *pirüvat oksidaz* enzimi için bir aktivatör olduğu belirtilmiş ve biyosensörün tespit yöntemi, tiaminin enzim aktivitesi üzerindeki bu etkisine dayandırılmıştır. Biyosensör tepkilerinin tiamin varlığında artış gösterdiği rapor edilmiştir. Tasarlanan biyosensörün cevap süresi 2 dakika olarak belirtilmiştir. Biyosensörün optimizasyon çalışmalarında en uygun enzim miktarı $2,5 \text{ U cm}^{-2}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca 35°C sıcaklık ve pH 7,0; 50 mM fosfat tamponu, optimum çalışma koşulları olarak belirlenmiştir [13].

Malik ve arkadaşları; polianilin (PANI) filmi üzerine *pirüvat oksidaz* (*Aerococcus* sps.), karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (c-MWCNT), bakır nanopartiküller (CuNPs) kullanarak bir biyosensör tasarlamışlardır. Çalışmada kullanılan çalışma elektrodu altındır (AuE). Bakır nanopartiküller kimyasal indirgeme yöntemiyle hazırlanmış ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM), UV-görünür spektroskopisi ve X-ışını kırınımı (XRD) ile karakterize edilmiştir. Çalışma elektrodu (POx/c-MWCNT/CuNPs/PANI/AuE), yapımının farklı aşamalarında taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile incelenmiştir. Biyosensör, 35°C'de ve pH 5.0 tampon ortamında optimum aktivite göstermiştir. Ayrıca, pirüvat için 0.1 μM ila 2000 μM konsantrasyon aralığında doğrusallık sunmuştur. Eklenen pirüvatın analitik geri kazanımının %99,6 ve %99,2 olduğu tespit edilmiş ve standart spektrofotometrik yöntemle ölçülen serum pirüvat değerleri ile mevcut yöntem arasında yüksek korelasyon olduğu rapor edilmiştir [3].

Malik ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada; kalem grafit elektrot üzerine kovalent olarak immobilize edilen *pirüvat oksidaz* nanopartikülleri ile hassas ve geliştirilmiş bir amperometrik biyosensör üretilmesi amaçlanmıştır. Biyosensör; pH 6,0 tampon ortamında, -0,1 V uygulama potansiyelinde ve 30 °C sıcaklıkta optimum değerlerini sunmuştur. Biyosensörün lineer aralığının 0,001 ila 6000 μM arasında olduğu rapor edilmiştir. Biyosensörün 210 günden fazla bir süre boyunca sürekli olarak kullanıldığı ve uzun bir depo kararlılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Tasarlanan biyosensör, sağlıklı ve kalp rahatsızlığı olan bireylerin serumlarındaki pirüvat seviyesinin ölçümü için kullanılmıştır [16].

Shao ve arkadaşları; kan serumu örneklerinden pirüvat tespiti için amperometrik bir pirüvat biyosensörü tasarlamışlardır. Çalışma elektrodu olarak camı karbon elektrot kullanılmıştır. Elektrot yüzeyine Au@CNT (Karbon nanotüp yüzeyine modifiye altın nanopartikülleri) nanokompozitinin elektrodepozisyonu sağlanmış ve ardından *pirüvat oksidaz* immobilize edilmiştir. XRD ve SEM kullanılarak yapılan yapısal çalışmalar, metalik altın nanopartiküllerin (AuNPs'lerin) CNT yüzeyinde etkin bir şekilde dekore edildiğini ve Au@CNT nanokompozitin camı karbon elektrodun (GCE) yüzeyinde elektrodepozisyonunu göstermiştir. Gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçüm sonuçları biyosensörün iyi bir özgülüğe, hassasiyete ve stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Biyosensör; 10 ila 480 μM konsantrasyon aralığında doğrusal aralık, 5 nM dedeksiyon limiti ve 0,12482 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ hassasiyet sunmuştur. Biyosensörün pratikliği ve kesinliği, sağlıklı yetişkinlerin kan serumundaki pirüvat düzeyinin belirlenmesi için kullanılmıştır [59].

Wen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serumundaki pirüvatın hassas analizi için platin nanopartikülleri (PtNP'ler) ile değiştirilmiş 2D MXene bazlı bir biyosensör geliştirilmiştir. Çalışmada döngüsel voltametri ve kronoamperometri teknikleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın klinik uygulamasını göstermek için tasarlanan biyosensör ve standart bir test kiti; insan serum örnekleri ile test edilmiştir. Biyosensör ve test kiti arasında ihmal edilebilir bir düzeyde farklılık (%6) olduğu rapor edilmiştir. Çalışma, pH 5,0 tampon ortamında ve 0,1 V çalışma potansiyelinde gerçekleştirilmiştir [60].

Camsı karbon elektrodun (GCE) kullanıldığı bir pirüvat biyosensöründe, enzim olarak *laktat dehidrojenaz* (LDH) kullanılmıştır. Çalışmada enzim sol-jel yöntemi kullanılarak GCE'ye immobilize edilmiştir. Çalışma elektrodunun sinyal gücünü artırmak için elektrot AuNPs-rGO ile modifiye edilmiştir. Biyosensör; 37 °C'de, pH 7.4, 100 mM fosfat tamponunda diferansiyel puls voltametrisi tekniği ile çalıştırılmıştır. Biyosensör için 1-4500 μM lineer aralık ve 254,54 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ hassasiyet rapor edilmiştir. Ayrıca, D-glikoz, sitrik asit, dopamin, ürik asit ve askorbik asit gibi muhtemel girişimci maddelerin varlığında oldukça başarılı sonuçlar verdiği vurgulanmıştır [12].



BÖLÜM 3

MATERYAL METOD

3.1 KİMYASALLAR

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar; *pirüvat oksidaz* (*Aerococcus* sp., liyofilize toz, ≥ 35 U/mg protein), sodyum pirüvat ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$ ≥ 99), insan serumu (AB kan plazmasına sahip erkek bireylerden temin edilmiş, ABD menşeli, steril filtreli), polikaprolakton (PCL, ortalama Mn 80000), magnezyum klorür heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ≥ 99), flavin adenin dinükleotit disodyum tuzu (FAD, ≥ 95), hidrojen peroksit (H_2O_2 , %35) potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), lityum perklorat (LiClO_4 , %99), hidroklorik asit (HCl, %36. 5-38), potasyum klorür (KCl), potasyum hekzasiyanoferrat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), gluteraldehit (GA, H_2O içinde %25), diklorometan (%99,9) ve potasyum hidroksit (KOH, ≥ 85) Sigma-Merck Corporation (Almanya) firmasından satın alınmıştır. tiamin pirofosfat klorür (TPP, > 98) Tokyo Chemical Industry markasından (Japonya) temin edilmiştir. Alüminyum nanopartiküller (AlNPs, 80 nm, %99,9) Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. (ABD) şirketinden satın alınmıştır.

3.2 CİHAZLAR

Deneylerde kullanılan ekipmanlardan CHI1040B marka potansiyostat, altın çalışma elektrodu ($\varnothing=2$ mm), platin karşıt elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot, cam hücreler ve elektrot temizleme kiti (0.05, 0.3 ve 1 mikron boyutunda alümina tozları ve zımparaları) CH Instruments firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan otomatik mikropipetler Eppendorf, hassas tartı cihazı Denver Instrument, manyetik karıştırıcı DragonLab MS-H-S, ultasonik banyo Isolab, ultra saf su cihazı Milipore Direct-Q 3 UV ve pH metre Inolab pH 7110 markalarından temin edilmiştir. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) cihazı Quanta FEG 450 markadır.

3.3 BİYOSENSÖR PROBUNUN HAZIRLANMA AŞAMALARI

3.3.1 Tampon Çözelti Hazırlanması

pH 7,0, 50 mM fosfat tamponu potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) kimyasalları kullanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti içerisine destek elektroliti olarak $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ olacak şekilde lityum perklorat (LiClO_4) ilave edilmiştir. Son olarak çözelti içerisine enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ihtiyaç duyulan $50 \text{ }\mu\text{M}$ tiamin pirofosfat klorür (TPP), $5 \text{ }\mu\text{M}$ flavin adenin dinükleotit (FAD) ve 1 mM magnezyum klorür (MgCl_2) kofaktörleri eklenerek deneyler için hazır hale getirilmiştir.

3.3.2 AINPs Modifiye Polimer Çözeltisinin Hazırlanması

Polimer çözeltisini hazırlamak için ticari katı PCL kullanılmıştır. 10 mg PCL, 1 mL diklorometan içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. Bu çözeltiye $0,4 \text{ mg}$ AINPs ilave edilmiştir. Daha sonra AINPs'leri homojen bir şekilde disperse edebilmek için, çözelti kapalı bir tüp içerisinde ultrasonik banyoda 10 dakika boyunca muamele edilmiştir.

3.3.3 Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Pirüvat oksidaz (PyOx) enzim çözeltisi (2 mg mL^{-1}) pH 7,0 (50 mM) fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan enzim çözeltisi kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$) muhafaza edilmiştir. 5 mM 'lık stok pirüvat çözeltisi, (pH 7,0) fosfat tamponunda tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

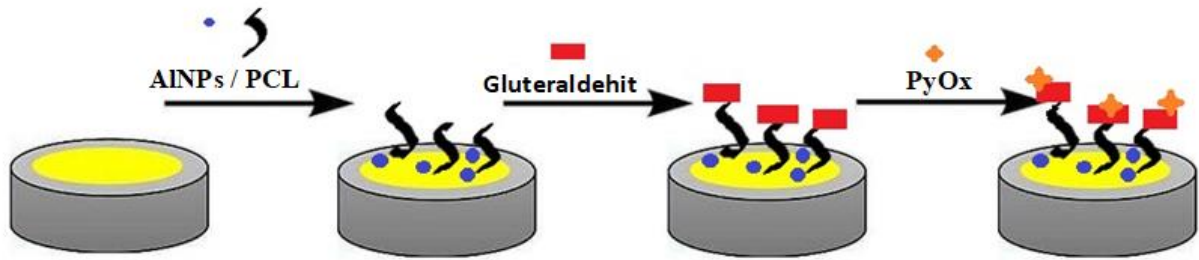
3.3.4 Elektrot Temizleme Prosedürü

Deney düzeneğinde kullanılacak olan altın çalışma elektrodu sırasıyla 1 ; $0,3$; $0,05$ mikron boyutlarındaki alüminyum tozları ile zımparalanmıştır. Elektrot, zımparalama işleminde boyutlar arasında ultra saf ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra 10 mL ultra saf su içerisinde $\%25$ 'lik hidrojen peroksit ve 50 mM potasyum hidroksit olacak şekilde bir çözelti hazırlanmıştır. Altın elektrot, hazırlanan çözelti içerisinde 10 dakika bekletilmiş ve tekrar ultra saf su ile yıkanıp, kurutulmuştur. Son aşama için 50 mM potasyum hidroksit içeren 10 mL ultra saf su çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti ile $-0,2 \text{ V}$ ile $-1,2 \text{ V}$ arasında 50 mV s^{-1} tarama hızında 2 dakika döngüsel voltametri (CV) tekniğiyle temizleme işlemi

gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında çalışma elektrodu ultra saf su ile son bir kez yıkanıp, oda sıcaklığında kurutulmuş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3.5 Elektrot Yüzeyinin Polimerik Filmle Kaplanması ve Enzim İmmobilizasyonu

Temizleme prosedürü uygulanan Au elektrot yüzeyine $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ AINPs ile modifiye PCL polimer çözeltisinden $3 \text{ } \mu\text{L}$ damlatılmış ve elektrot çözücünün buharlaşması için oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Ardından kaplama yapılan yüzey ultra saf su ile narince yıkanmıştır. Çapraz bağlama ajanı olarak kullanılan glutaraldehit çözeltisinden (H_2O_2 içinde %2,5) $3 \text{ } \mu\text{L}$, polimerik film kaplı Au yüzeyine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, 2 mg mL^{-1} PyOx çözeltisinden $6 \text{ } \mu\text{L}$ elektrot yüzeyine damlatılmış ve film yüzeyinde oluşturulan çapraz bağ ağları aracılığıyla kimyasal enzim immobilizasyonuna izin vermek için oda sıcaklığında 2 saat beklenmiştir. Elektrot yüzeye bağlanamayan enzim kalıntılarını temizlemek için her adımdan sonra ultra saf su ile yıkanmıştır. Biyosensörün fabrikasyon aşamaları şematik olarak Şekil 3.1'de sunulmuştur.

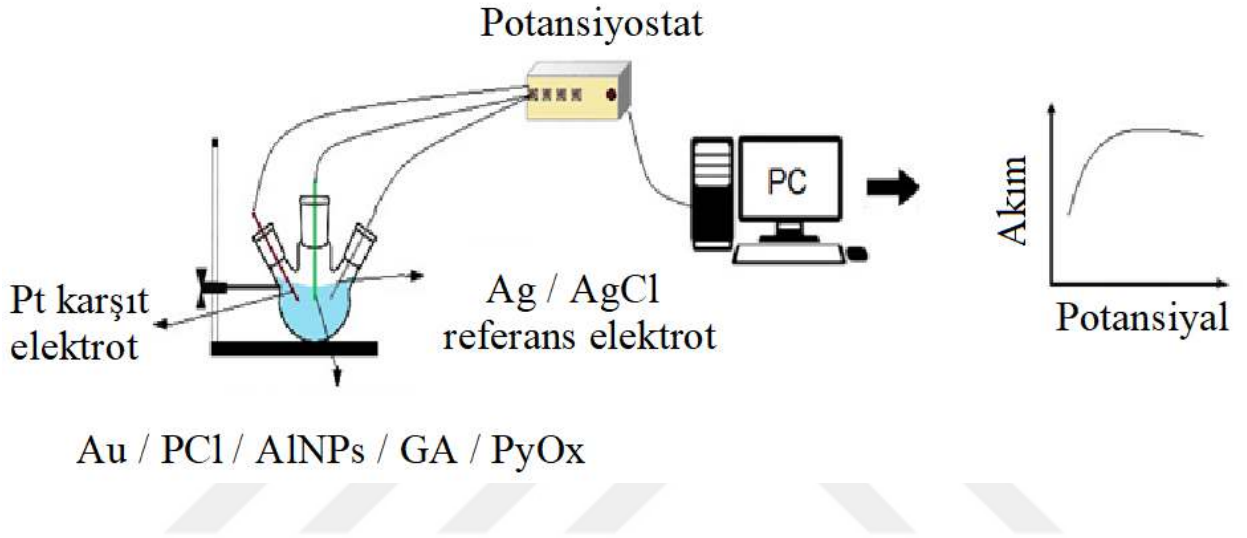


Şekil 3.1 Pirüvat biyosensör elektrodunun fabrikasyon aşamalarının şematik gösterimi.

3.4 PİRUVAT ÖLÇÜM SİSTEMİ VE PARAMETRELERİ

Geleneksel biyosensör sistemi referans elektrot (Ag/AgCl), altın çalışma elektrodu (Au , $\text{Ø}=2 \text{ mm}$), platin tel karşıt elektrot, cam hücre ve CH 1040B çok kanallı potansiyostattan oluşmuştur. Pirüvat ölçümleri, artan genlikte bir potansiyel puls serisi kullanan diferansiyel puls voltametri (DPV) ile gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan DPV tekniği [61-65], yüzeye bağlı moleküllerin elektrokimyasal davranışını izleyebilirken, faradaik olmayan akımın azalmasına izin vererek hassasiyette önemli bir artış sağlamaktadır [66,67]. Analizler, elektrotların destek elektrolit

olarak kullanılan $0,7 \text{ mg mL}^{-1} \text{ LiClO}_4$ ve $5 \text{ } \mu\text{M FAD}$, $50 \text{ } \mu\text{M TPP}$, 1 mM magnezyum (Mg^{+2}) (enzim kofaktörleri) içeren $10 \text{ mL } 50 \text{ mM}$ pH 7,0 havalandırılmış PBS içine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. FAD, TPP ve Mg^{+2} kofaktörlerinin konsantrasyonları önceki çalışmamızda optimize edilmiş ve bu çalışmada da kullanılmıştır [68,69]. DPV deneysel şartları; $0,002 \text{ V}$ 'luk bir artış, $0,1 \text{ V}$ 'luk bir genlik, $0,06 \text{ s}$ 'lik bir darbe genişliği, $0,02 \text{ s}$ 'lik bir örnekleme genişliği ve $-0,1 \text{ V}$ ila $+0,1 \text{ V}$ 'luk uygulanan bir potansiyel aralığında $0,75 \text{ s}$ 'lik bir darbe periyodu şeklinde ayarlanmıştır. Biyosensör ölçüm sisteminin şematik diyagramı Şekil 3.2'de sunulmuştur.



Şekil 3.2 Biyosensör ölçüm sisteminin şematik diyagramı.

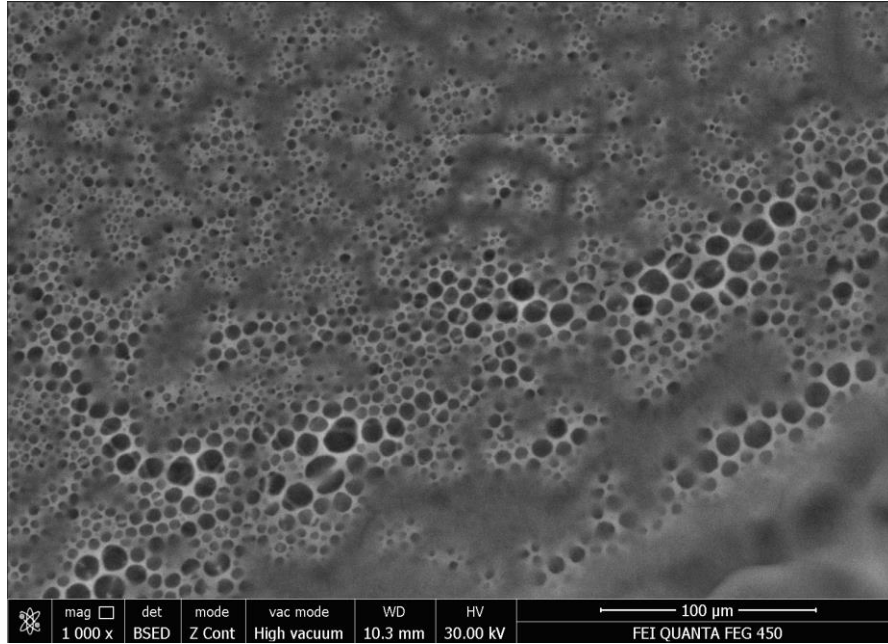
BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

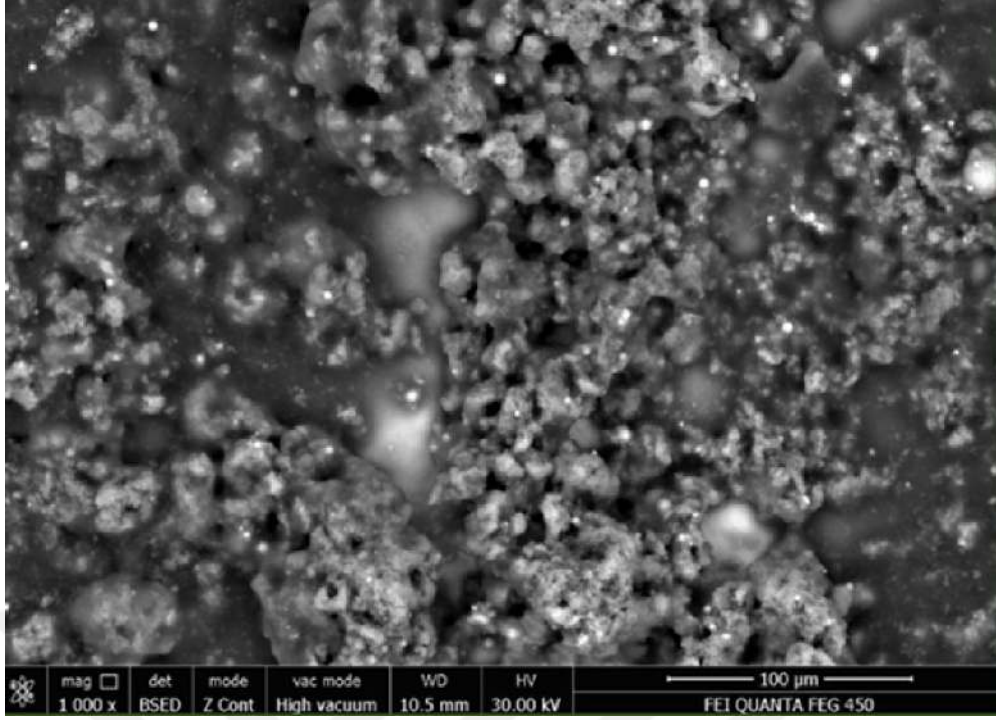
4.1 PCL/AINPs FİLMİNİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

4.1.1 Yüzey Morfolojisi

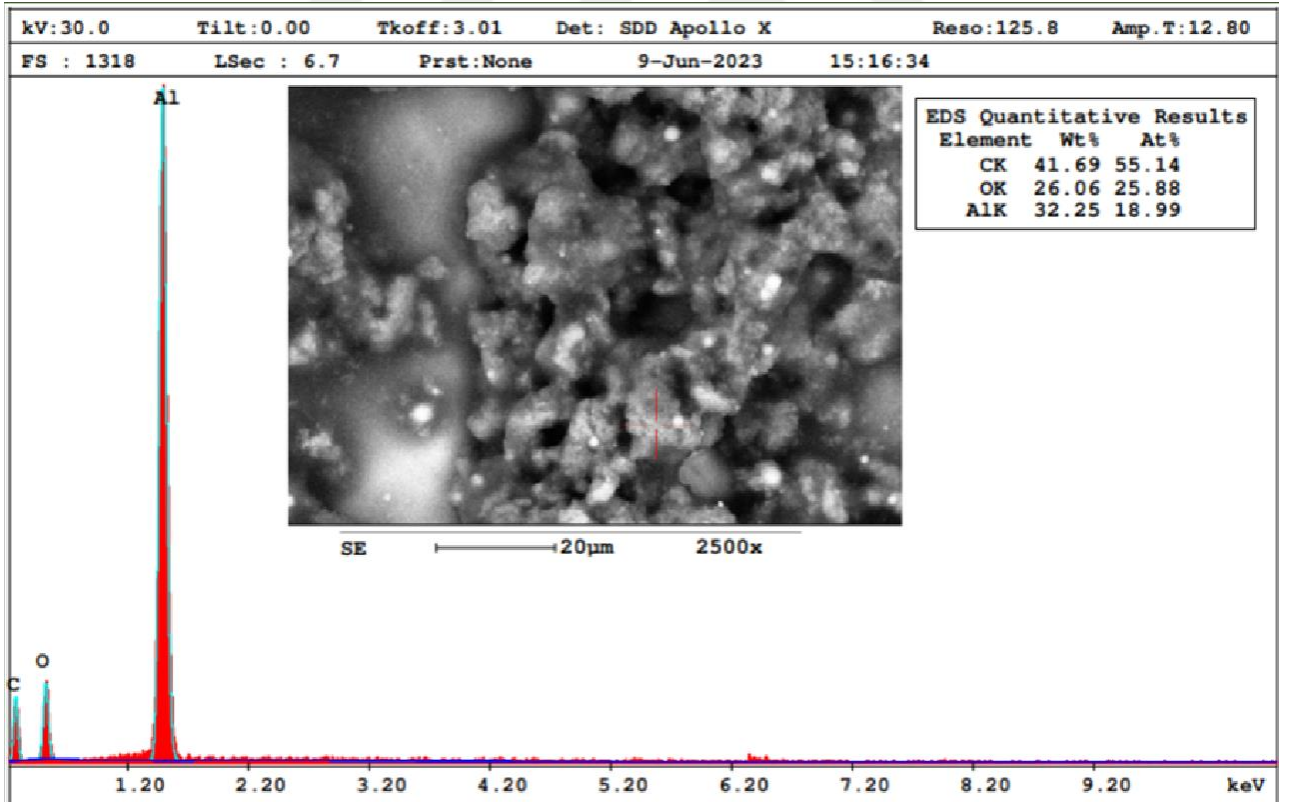
Yüzey karakterizasyon çalışmaları Quanta FEG 450 (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) model taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elektrot yüzeyinin SEM ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. PCL/Au ve AINPs/PCL/Au elektrotlarının yüzey morfolojileri $\times 1000$ büyütmedeki SEM görüntüsünden analiz edilmiş ve sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 'de verilmiştir. Elektrot yüzeyindeki PCL ince filminin oldukça gözenekli olduğu (Şekil 4.1) ve PCL ince filminin gözeneklerinin AINP'lerle dolduğu ve yüzeyde kümелendiği gözlenmiştir (Şekil 4.2). EDX analizi elektrot yüzeyinde oluşan kümelerin saf AINP'lerden kaynaklandığını doğrulamış ve ilgili grafik Şekil 4.3'de sunulmuştur. Elde edilen filmin, elektrot yüzey alanını artırarak daha fazla enzim molekülünü bağlayabilmesi beklenen muhtemel sonuçtur.



Şekil 4.1 PCL/Au elektrodunun $\times 1000$ büyütmedeki SEM görüntüsü.



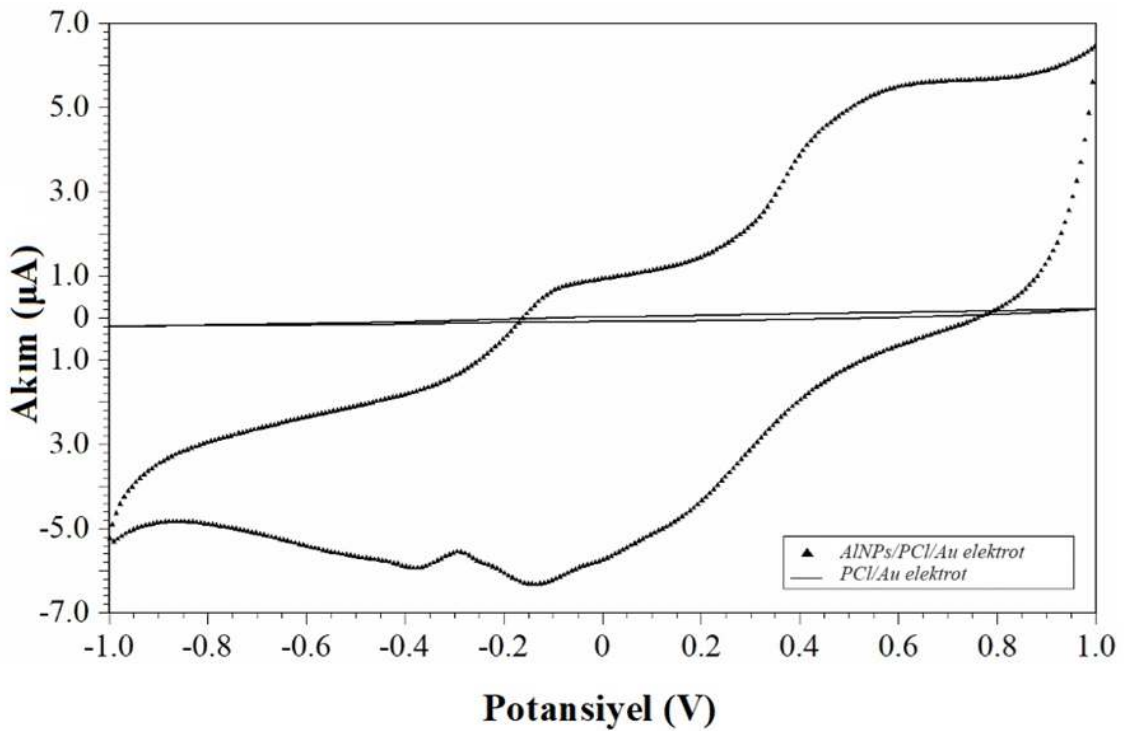
Şekil 4.2 AINPs/PCL/Au elektrodunun $\times 1000$ büyütmedeki SEM görüntüsü.



Şekil 4.3 AINPs/PCL/Au elektrot yüzeyinin EDX analizi.

4.1.2 Elektrokimyasal Yüzey Karakterizasyonu

Enzim immobilize AlNPs modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş PCL film kaplı Au elektrotlarının elektrokimyasal özellikleri CV analizleri ile karakterize edilmiştir. CV çalışmasında $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ LiClO_4 ve kofaktörleri içeren 50 mM pH 7,0 oksijenlendirilmiş PBS tamponu kullanılmıştır. Sistem, $0,1 \text{ V s}^{-1}$ tarama hızı ve $-1,0$ ile $+1,0 \text{ V}$ arasındaki voltaj aralığında çalıştırılmıştır (Şekil 4.4). PCL film kaplı elektrot, AlNPs-modifiye PCL film kaplı elektroda kıyasla taranan her potansiyelde daha düşük akım değerleri sergilemiştir. Bu durum PCL'nin iletken olmayan doğası nedeniyle beklenen bir sonuçtur. Şekil 4.4, elektrodun AlNP'lerle modifiye edildiğinde akım değerlerinde kayda değer bir artış olduğunu göstermektedir. Analiz, iletken metalik AlNPs'lerin PCL filmine entegre edildiğini, çalışma elektrodunun modifikasyonunun sağladığını ve pirüvat tespiti için biyosensörün sinyal kapasitesini artıracak olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4 PyOx immobilize PCL/Au ve AlNPs/PCL/Au elektrotlarının CV'leri.

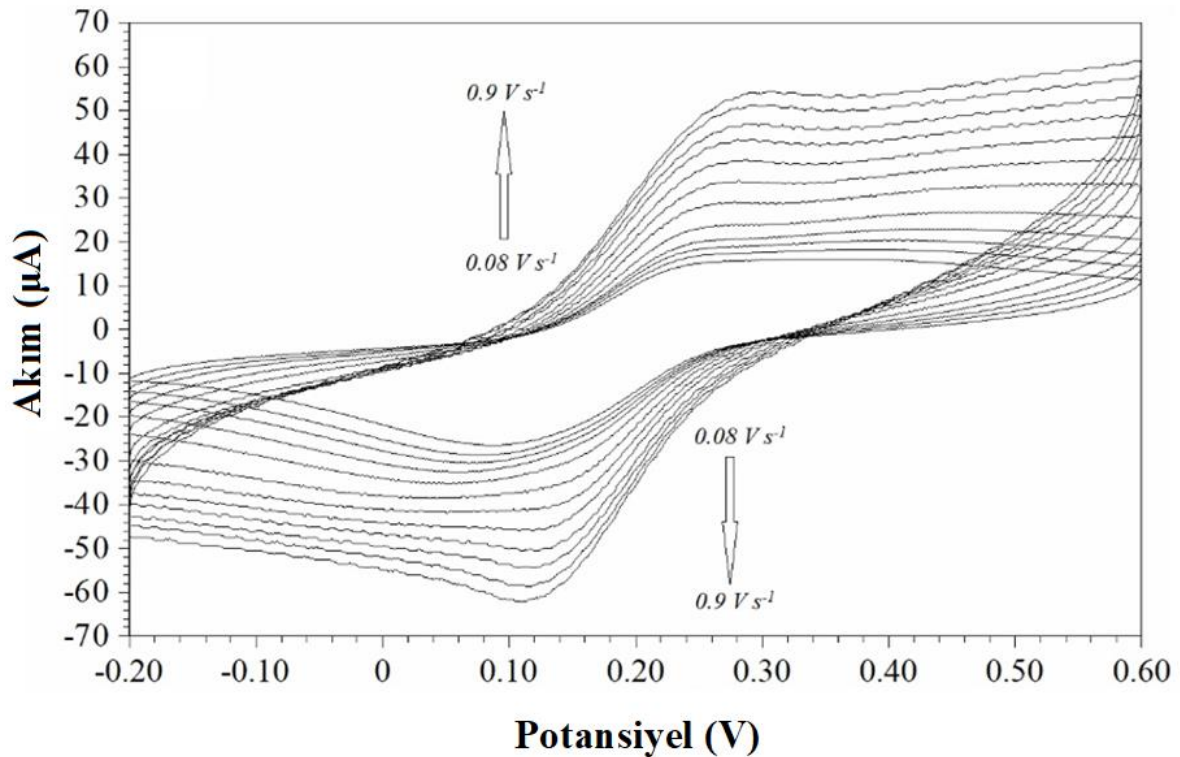
CV analizi, 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve $0,1 \text{ M}$ KCl içeren 50 mM pH 7,0 PBS içinde (Şekil 4.5), enzim immobilize AlNPs modifiye elektrodun difüzyon katsayısını belirlemek için $-0,2$ ila $+0,6 \text{ V}$ potansiyel aralığında, $0,08 \text{ V s}^{-1}$ ile $0,9 \text{ V s}^{-1}$ arasında artan tarama hızlarında gerçekleştirilmiştir. Akım değerleri, artan tarama hızı ile oksidasyon ve redüksiyon yönünde

orantılı olarak artmıştır. Voltamogram Şekil 4.5’de sunulmuştur. CV’lerden elde edilen redoks akımları, tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.6’da verilmiştir. Ortaya çıkan doğrusal eğriler difüzyon kontrollü kütle aktarım reaksiyonlarını ve AlNPs ile modifiye edilmiş PCL film üzerindeki redoks dönüşüm ve elektron transfer reaksiyonlarının oksidasyon ve redüksiyon akımları için tersinir özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Biyosensör elektrodunun difüzyon katsayısı, Denklem 1’de sunulan Randles-Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

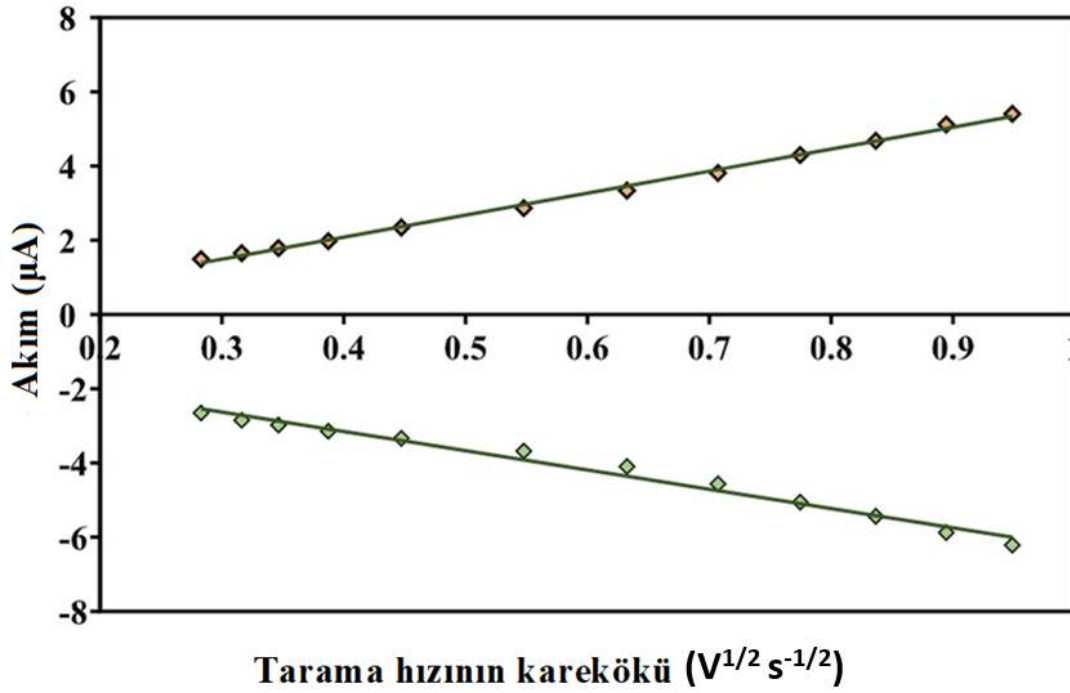
$$I_p = (2.69 \times 10^5) \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times C \times v^{1/2} \dots\dots\dots(1)$$

[I_p : pik akımı (A), n : elektron sayısı, A : elektrot alanı (cm^2), D : difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C : analit konsantrasyonu (mol cm^{-3}), v : tarama hızı (V s^{-1})].

AlNPs ile modifiye edilmiş elektrot için oksidasyon [$D_{\text{Fe(ox)}}$] ve redüksiyon [$D_{\text{Fe(red)}}$] difüzyon katsayıları sırasıyla $4.92 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ve $3.79 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Deney, oksitlenmiş demir iyonunun indirgenmiş demir iyonundan 1,3 kat daha hızlı difüze olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum elektrot yüzeyi ile indirgenmiş demir iyonu arasındaki elektrostatik itmeye bağlanabilir [70].



Şekil 4.5 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve 0,1 M KCl içeren 50 mM pH 7,0 PBS tamponu içinde 0,08 ile 0,9 V s^{-1} arasındaki tarama hızlarında gerçekleştirilen CV’lerin grafiği.



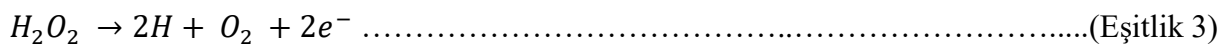
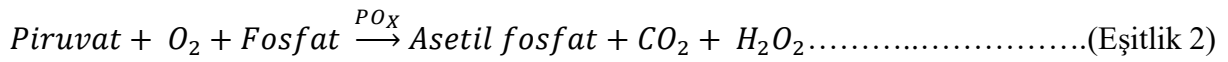
Şekil 4.6 CV'den elde edilen redoks akımlarına karşı tarama hızının karekökünün grafiği.

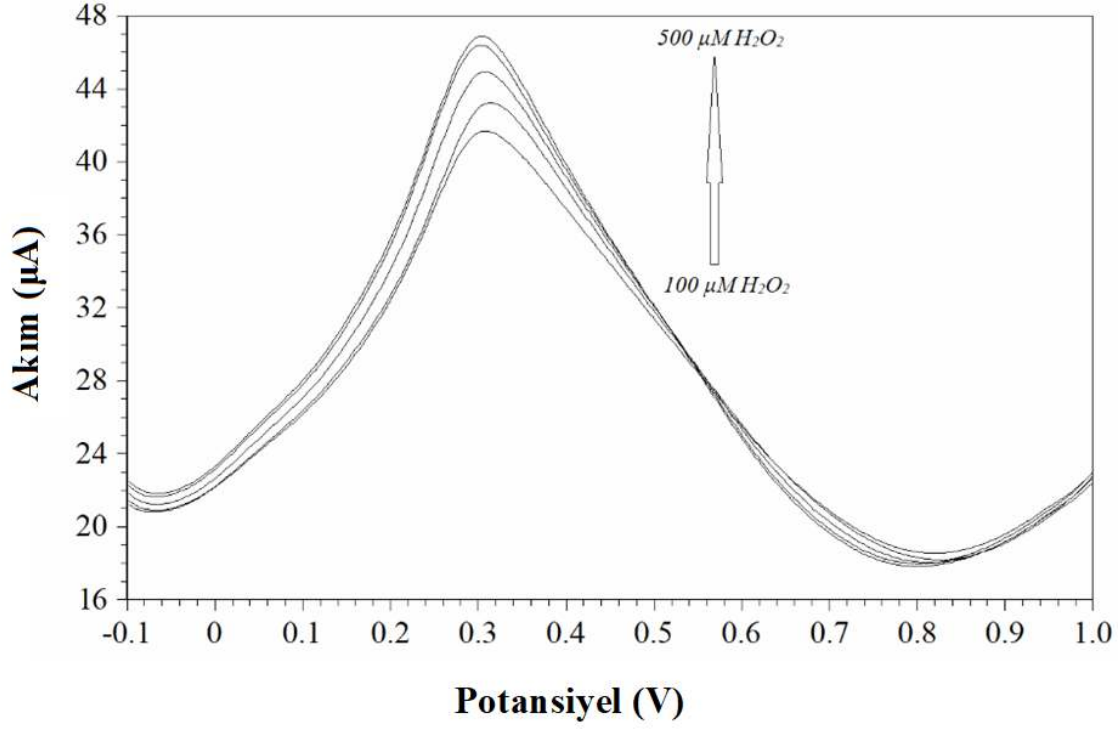
4.2 PİRUVAT TESPİTİ İÇİN UYGULANAN POTANSİYELİN BELİRLENMESİ

Biyosensöre uygulanacak potansiyeli belirlemek için enzimatik reaksiyon mekanizmasını ortaya çıkarmak gerekmektedir. Biyosensörün yanıtı, substrattan ya da enzimatik reaksiyonun ürününden gelen elektrokimyasal sinyale dayanmaktadır. Enzimatik üründen tespit edilen sinyal, istenen analitin dolaylı olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, belirli bir potansiyelde bir analitin veya ürünün spesifik yanıtını kesin olarak belirlemek önemlidir. Bu amaçla, analitin tespit edilebileceği kesin potansiyel değeri deneysel olarak belirlenmelidir. PyOx; fosfat, pirüvat ve oksijenin asetil fosfat (enerji depolama metaboliti), karbon dioksit ve hidrojen peroksit oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder (Eşitlik 2). Kovalent olmayan ve sıkıca bağlanmış FAD, TPP ve TPP'nin difosfat kısmını bağlayan Mg^{+2} , oksidatif pirüvat dekarboksilasyonunun enzimatik reaksiyonunda vazgeçilmez kofaktörlerdir [71]. Eşitlik 3'de sunulan enzimatik reaksiyon birkaç adımda gerçekleşebilir. Enzime bağlı TPP'nin 4-imino kısmı C2-TPP'yi deprotonlayarak pirüvatın karbonil grubuna nükleofilik bir şekilde saldırır ve laktıl-TPP oluşturur. Laktıl-TPP hidroksietil-TPP'ye dönüşür. Daha sonra hidroksil-TPP, dihidroflavin adenin dinükleotid ($FADH_2$) ve asetil-TPP oluşturmak üzere FAD tarafından oksitlenir. $FADH_2$ iki elektronu O_2 'ye (son alıcı) aktarır ve analitin biyosensörle dolaylı ölçümünü yapmak için gerekli olan H_2O_2 'i açığa çıkarır. Son adımda, asetil-TPP, asetilfosfat

ve TPP oluşturmak üzere fosforolitik olarak parçalanır, böylece yukarıda bahsedilen reaksiyonlar tekrarlanabilir[68-70,72,73].

Pirüvat biyosensörünün analitik yanıtı, üretilen H_2O_2 'nin elektrokatalitik oksidasyonu ile dolaylı olarak ölçülür. (Eşitlik 3). H_2O_2 termodinamik olarak kararsızdır ve -0,682 V teorik indirgeme potansiyeline sahiptir [74]. Potansiyel değeri, çalışma elektrodunun yüzey yapısından doğrudan etkilenir. Bugüne kadar yapılan biyosensör çalışmalarında H_2O_2 'yi algılamak için uygulanan potansiyel değerler farklı şekilde rapor edilmiştir [75-78]. Bu amaçla, tasarlanan biyosensör ile doğru bir ölçüm sağlamak için, H_2O_2 'nin oksidasyon potansiyelinin kesin olarak belirlenmesi elzemdir. Pirüvatın algılama potansiyelinin belirlenmesi için H_2O_2 , PyOx immobilize AlNPs/PCL/Au elektrot yüzeyinde DPV kullanılarak test edilmiştir. DPV analizi (-1.0 V ile +1.0 V arasında değişen bir potansiyel taramada), $LiClO_4$ ve enzim kofaktörleri içeren 50 mM pH 7,0 tamponuna 100 μM 'dan 500 μM 'a kadar (100, 200, 300, 400 ve 500 μM) artan konsantrasyonlarda H_2O_2 eklenerek gerçekleştirilmiştir. İlgili voltamogram, Şekil 4.7'de sunulmuştur. +0,3 V ile +0,4 V potansiyel bir aralıkta, elektrodun geniş pik akımlarının artan H_2O_2 konsantrasyonu ile arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada pirüvat ölçümlerinin üretilen H_2O_2 'nin oksidasyonu yoluyla gerçekleştirilmesi beklendiğinden, bu potansiyel aralığında pirüvat ölçümlerinin yapılması sunulan reaksiyon mekanizmalarını doğrulamaktadır.



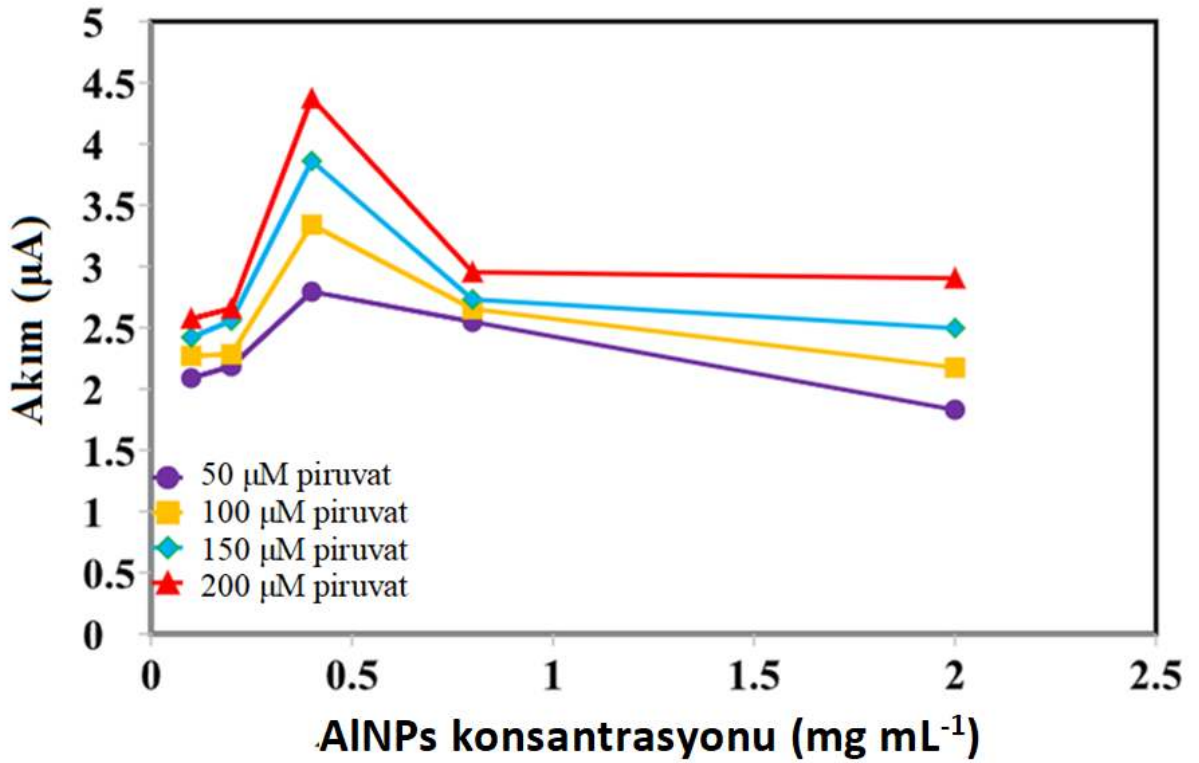


Şekil 4.7 100 μM ile 500 μM arasında artan H_2O_2 konsantrasyonlarından elde edilen DPV grafiği.

4.3 OPTİMUM AINPs DOZUNUN BELİRLENMESİ

Bir biyosensördeki dedeksiyon limiti (LOD) ve hassasiyet, enzim immobilizasyonunu sağlayan kaplama malzemesinin arka plan akımından etkilenmektedir. Ayrıca, malzemenin morfolojisi ve elektrot yüzeyindeki film yoğunluğu da elektron transfer hızını ve biyosensörün yanıt süresini belirleyen önemli parametrelerdir [79]. Bu bağlamda, analitik performansa katkıda bulunan çeşitli polimer türleri ve bunların nanopartiküllerle modifikasyonu biyosensörlerde yaygın olarak tercih edilmektedir [68,80]. Nanopartiküllerin yığın formlarına göre çok daha reaktif olmalarının yanı sıra, çalışma elektrodu yüzey alanını üstel olarak artırmaları ve bunun sonucunda birim alan başına biyokatalizör bağlanması için aktif bölgelere katkı sağlamaları tercih edilmelerinde büyük rol oynamaktadır. Bununla birlikte, elektrot yüzeyine kaplanmış nanopartiküllerle modifiye edilmiş malzemeler, biyokatalitik reaksiyonları engellemeden enzimatik reaksiyonları kolaylaştıran veya hızlandıran bir konsantrasyona sahip olmalıdır [81]. Au elektrot yüzeyindeki PCL filmi, pirüvat biyosensöründen etkili bir yanıt alınması için uygun miktarda AINP içerecek şekilde tasarlanmıştır. Spesifik olarak, değişen

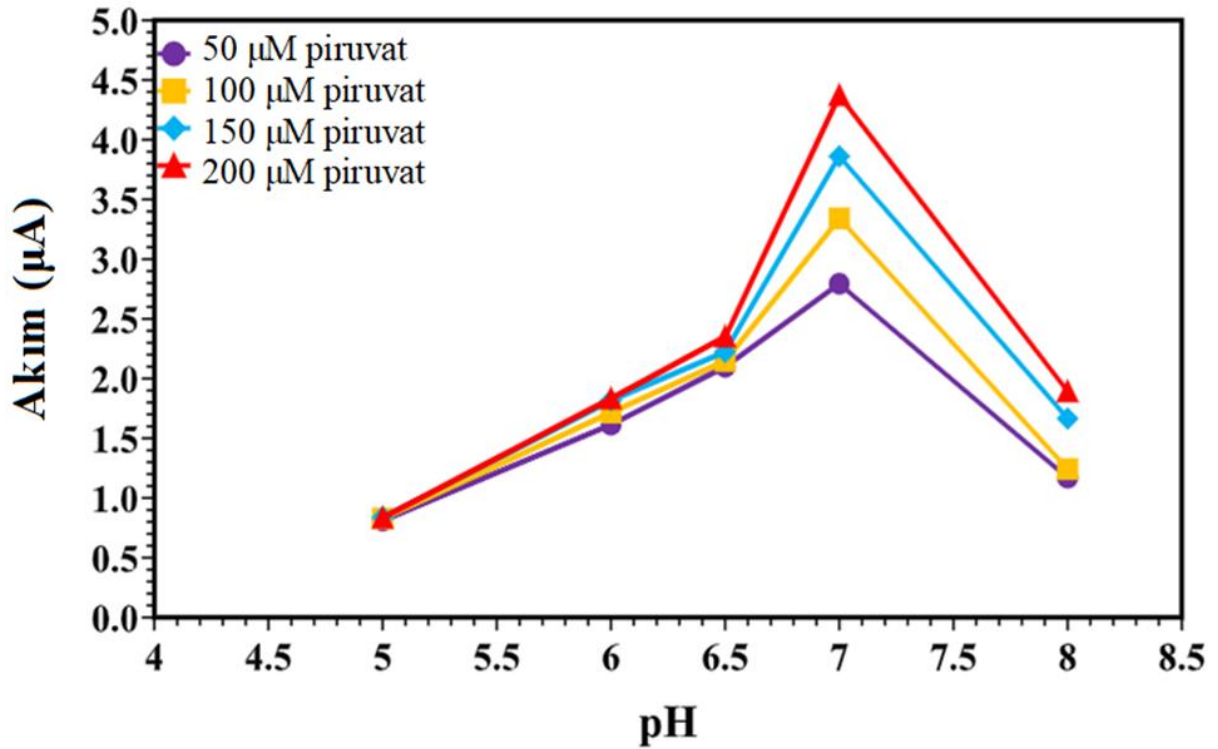
konsantrasyonlarda AINP'lerle (0,1, 0,2, 0,4, 0,8 ve 2 mg mL⁻¹) modifiye edilmiş 3 µL PCL (10 mg mL⁻¹), oda sıcaklığında 5 ayrı Au elektrot yüzeyine damlatılmıştır (bkz. Bölüm 3.3.5). Daha sonra, Bölüm 3.3.5'te açıklanan glutaraldehit ve enzim immobilizasyon adımları izlenerek 5 farklı AINPs-modifiye PCL film kaplı elektrot hazırlanmıştır. Elektrotların her biri için 0,7 mg mL⁻¹ LiClO₄ ve enzim kofaktörleri (5 µM FAD, 50 µM TPP, 1 mM Mg⁺²) içeren 50 mM pH 7,0 oksijenlendirilmiş PBS tamponuna çeşitli pirüvat konsantrasyonları (50, 100, 150 ve 200 µM) eklenmiştir. DPV ölçümleri -1.0 V ile +1.0 V potansiyel tarama aralığında gerçekleştirilmiştir. +0,4 V'ta DPV'lerden elde edilen akımlar işlenerek Şekil 4.8'de grafikleştirilmiştir. DPV'ler, biyosensör yanıtının 0,4 mg mL⁻¹ AINP konsantrasyonuna kadar artarak maksimum akıma ulaştığını ve ardından test edilen elektrotların her biri için artan AINP konsantrasyonu ile akımların azaldığını göstermiştir. Elektrot yüzeyinin 0,4 mg mL⁻¹ 'den daha yüksek bir AINP konsantrasyonu ile modifiye edilmesinin, önerilen biyosensörde pirüvat molekülleri için bir iç difüzyon bariyeri oluşturduğu sonucuna varılabilir. Bu konsantrasyon seviyesine kadar pirüvat ölçümleri için yeterli sinyal gücü elde edilemediğinden, sonraki deneylerde PCL film modifikasyonu için maksimum akıma ulaşılan 0,4 mg mL⁻¹ AINP konsantrasyonu seçilmiştir.



Şekil 4.8 AINP konsantrasyonunun +0,4 V'ta biyosensör yanıtı üzerindeki etkisi.

4.4 OPTİMUM PH DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

Optimum pH değerinin belirlenmesi, enzimin üç boyutlu yapısının maksimum aktivitesini göstermek için çok önemlidir. İdeal pH koşullarından sapmalar, bağlanma bölgesindeki aktif merkezin şeklini değiştirerek enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açabilmekte ve biyosensör performansını olumsuz yönde etkileyebilmektedir [82]. Biyosensör 50, 100, 150 ve 200 μM pirüvat varlığında farklı pH değerlerinde (kofaktörleri içeren pH 5,0-6,0-6,5-7,0 ve 8,0 PBS) -1,0 V ile +1,0 V arasında değişen bir potansiyel taraması ile DPV kullanılarak test edilmiş ve pH'nın etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.9, test edilen her bir pH'a karşı +0,4 V'daki akım değerlerini göstermektedir. Biyosensörün yanıtı pH 7,0'ye kadar artmış ve ardından tüm pirüvat konsantrasyonları için pH 8,0'e kadar azalmıştır. Tespit edilen pH, PyOx tabanlı biyosensörler için literatürden tespit edilen 6,5 - 7,2 pH aralığı ile benzer bir değerdir [6,75,83-85]. Elde edilen maksimum akım göz önünde bulundurularak optimum pH değeri, 7,0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9 pH'nın biyosensör yanıtına etkisi.

4.5 BİYOSENSÖRÜN ANALİTİK PARAMETRELERİ

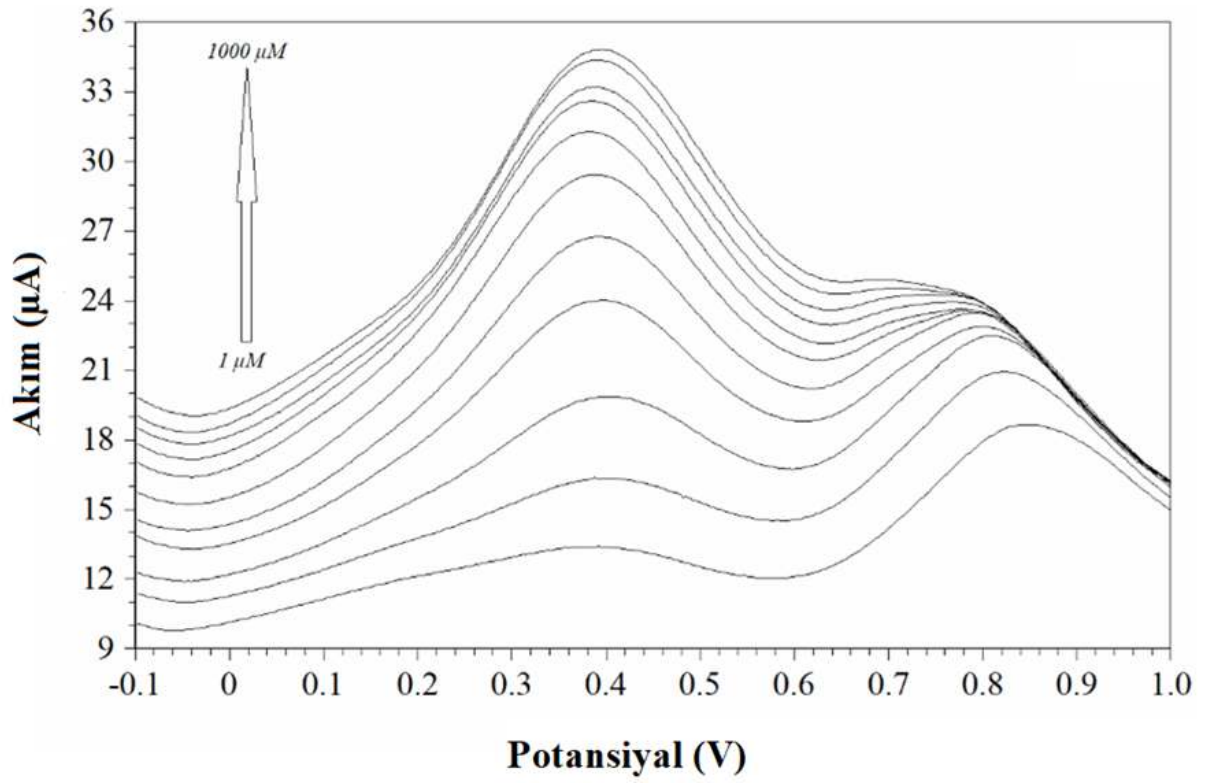
Biyosensörün analitik performansı, 5 μM FAD, 50 μM TPP ve 1 mM Mg^{+2} kofaktörlerini

içeren $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ LiClO_4 konsantrasyonuna sahip oksijenlendirilmiş PBS'de (pH 7,0) gerçekleştirilmiştir. Bahsi geçen biyosensör ortamına 1 ila 1000 μM arasında artan pirüvat konsantrasyonları eklenmiştir. Biyosensör DPV tekniği kullanılarak -1,0 ila +1,0 V arasındaki potansiyel aralıkta analiz edilmiştir. Şekil 4.10 üst üste bindirilmiş ve yakınlaştırılmış akım-potansiyel grafiğini göstermektedir. 10 μM 'a kadar artan pirüvat konsantrasyonlarındaki akımlarda orantılı bir artış gözlenirken, 10 μM 'den yüksek pirüvat konsantrasyonları için doğrusal olmayan bir akım artışı gözlenmiştir. Bu tür doğrusal olmayan durumlarda logaritmik kalibrasyon eğrisi kullanılabilir [70,86-90] Şekil 4.11'deki logaritmik kalibrasyon eğrisi, Şekil 4.10'dan elde edilen pirüvat konsantrasyonlarına karşı çizilen akım değerleri kullanılarak oluşturulmuştur ($[y=0,3374\ln(x)+0,3024]$, $R^2=0,986$). Sonuçlar, tasarlanan pirüvat biyosensörünün önceki çalışmalarda raporlanan biyosensörlerin pek çoğundan daha geniş bir konsantrasyon aralığına sahip olduğunu göstermektedir. Bir biyosensör elektrodu, karbon nanotüpler ve altın nanopartiküllerden oluşan bir nanokompozitin camı karbon elektrot üzerine elektrobirikim tekniği kullanılmasıyla elde edilmiştir. PyOx elektrot üzerinde immobilize edilmiş ve 0,5 μM ila 480 μM 'lik doğrusal bir aralık elde edilmiştir [59]. PyOx'un platin disk elektrot üzerine immobilize edilmesiyle hazırlanan amperometrik pirüvat biyosensörünün doğrusal aralığı 10-2500 μM olarak belirlenmiştir [91]. Yumei ve arkadaşları, ferrosen modifiye altın elektrot yüzeyini PyOx, FAD, β -siklodekstrin doymuş su, taze yumurta akı ve %25 glutaraldehit içeren izometrik bir çözelti ile muamele etmişlerdir. Hazırlanan pirüvat biyosensörünün doğrusal aralığını 2.67-66.7 μM olarak bildirmişlerdir [92]. PyOx'un glutaraldehit yardımıyla 3-merkaptopropiyonik asit ve 6-aminokaproik asit modifiye altın disk elektrot üzerine immobilize edilmesiyle hazırlanan pirüvat biyosensöründe doğrusal aralık 2,5-50 μM olarak bulunmuştur [6]. Çalışmamız, PCL/PyOx filminin geniş ve gözenekli aktif yüzey alanının, AlNPs'lerin yüksek elektrokatalitik etkisi ve elektroiletkenliği ile birleştiğinde, geniş bir ölçüm aralığında elektrot performansını artıran önemli bir sinerjik etki ile sonuçlandığını ortaya koymuştur.

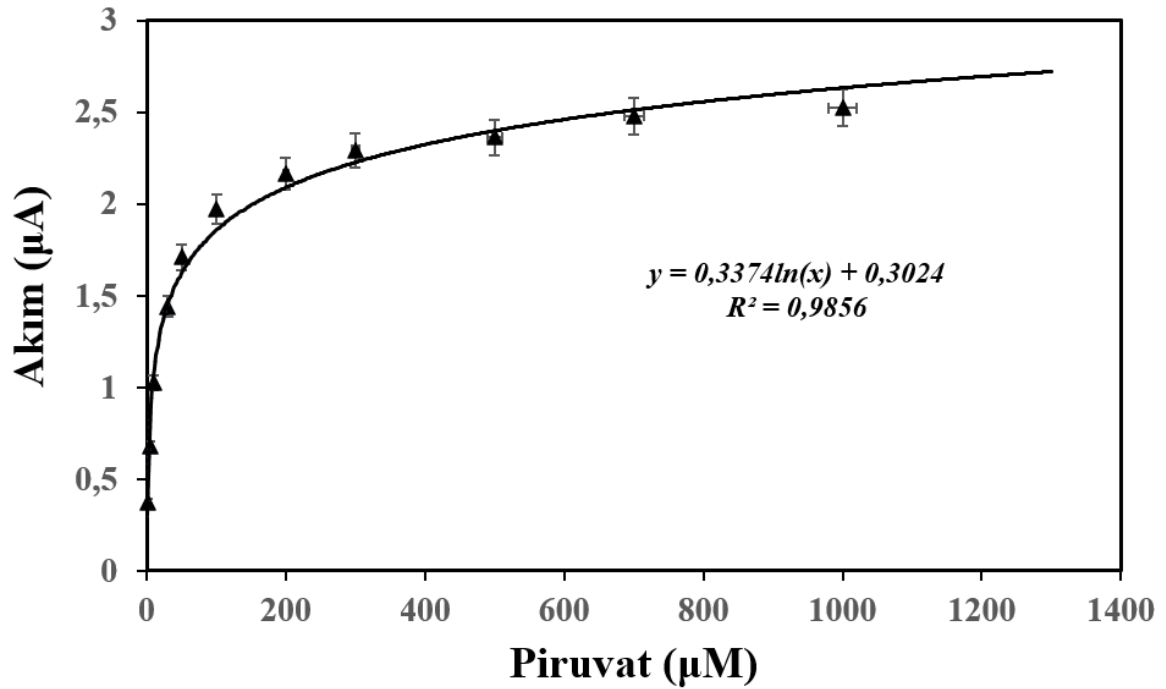
LOD, Şekil 4.11'de gösterilen logaritmik kalibrasyon eğrisinin doğrusal bölgesi kullanılarak belirlenmiştir. Hesaplanan LOD değeri 0,45 μM olup, $3 \times S_d/m$ formülü (burada 3, sinyal-gürültü oranı, m çizginin eğimi ve S_d regresyon çizgisinin y-kesişiminin standart sapmasıdır) ile belirlenmiştir. Literatürde PyOx, politiramin yüzeyine kovalent olarak immobilize edilerek bir biyosensör tasarlanmıştır. LOD 50 μM olarak rapor edilmiştir [84]. Altın elektrot üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş PyOx nanopartikülleri ile inşa edilen bir başka pirüvat biyosensöründe, 0,67 μM 'lik bir LOD bildirilmiştir [11]. Bir başka makalede, platin disk

elektrot üzerine strilpiridin grupları içeren polivinil alkol polimerinin fotopolimerizasyonu ile tasarlanan PyOx tabanlı amperometrik pirüvat biyosensörü için LOD 8,1 μM olarak bildirilmiştir [93]. Prusya mavisi ile modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrot yüzeyinde PyOx ile grafen kuantum noktalarının çapraz bağlanmasıyla tasarlanan pirüvat biyosensörü için LOD 0,91 μM olarak bulunmuştur [94].

Biyosensörün pirüvata 5 dakikadan daha kısa bir süre içinde yanıt verdiği gözlemlenmiştir. Geleneksel tekniklerle karşılaştırıldığında elde edilen sonuç oldukça kısa bir zaman dilimi olarak yorumlanabilir. Spektrofotometrik olarak numune yanıt süresi 120 dakika [95], kolorimetrik olarak 8 dakika [96], enzimik florimetrik olarak 40 dakika [97], HPLC ile örnek başına 41 dakika [98], kütle spektral analizi ile 30 dakika [99] ve HPLC (florimetrik) ile örnek başına <12 dakika [100] olarak bildirilmiştir. Biyosensör hassasiyeti, logaritmik kalibrasyon eğrisinin doğrusal bölgesinden DPV aracılığıyla 2,30 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ olarak hesaplanmıştır. Ölçümün doğruluğu $[(\text{ölçülen konsantrasyon}/\text{gerçek konsantrasyon}) \times 100]$ formülü kullanılarak $\%99,5 \pm 0,002$ olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrarlanabilirliği 50 μM pirüvatın 15 ardışık ölçümünün bağıl standart sapmasından (RSD%) hesaplanmış ve $\%0,041$ olarak bulunmuştur. Biyosensör, aynı numunenin tekrarlanan çoklu ölçümleri için mükemmel çalışma kararlılığı göstermiştir. Önerilen biyosensörün uzun vadeli depolama kararlılığı, 10. ve 20. günlerde üç ardışık 10 μM pirüvat ölçümüne verdiği yanıt izlenerek değerlendirilmiştir. DPV test sonuçları, biyosensörün 10 gün boyunca ilk tepkisinin $\%98'$ ini ve 20. günün sonunda ilk tepkisinin $\%87'$ sini koruduğunu göstermiştir. Elektrot kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$) PBS içinde saklanmıştır. Biyosensör tatmin edici ve uzun vadeli bir stabilite sergilemiştir. Yanıtlardaki hafif akım düşüşleri, çalışma elektrodunun kofaktörler ve pirüvat içeren çalışma tamponundaki ardışık işlemlerine bağlanabilir. Elektrodun bu koşullara sürekli maruz kalması enzim aktivitesi üzerine negatif bir etki sağlamış olabilir. Bunun nedeni, moleküllerin çözüldükten enzim molekülü ve film yapısı üzerine adsorpsiyonu olabilir. Daha önce yayınlanan bir pirüvat biyosensöründe PyOx, glutaraldehit kullanılarak poli(nötr kırmızı) redoks aracısı üzerine çapraz bağlanmıştır. Biyosensör iki hafta boyunca başlangıçtaki aktivitesinin $\%62'$ sini korumuştur. Stabilite ve RSD% sırasıyla 0.00013 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ve $\%2.8$ olarak rapor edilmiştir [83]. Daha önce yayınlanmış bazı pirüvat biyosensörlerinin analitik parametreleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Pirüvat biyosensörü olarak ilk kez kullanılan AINPs-modifiye PCL elektrot ile basit bir şekilde tasarlanan biyosensörün analitik performansının daha önce bildirilenlerle rekabet edebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.10 1µM ile 1000 µM arasında artan pirüvat konsantrasyonlarına karşı DPV'nin verdiği yanıtlar.



Şekil 4.11 Pirüvat biyosensörünün logaritmik kalibrasyon grafiği.

Çizelge 4.1 Pirüvat tespiti için kullanılan bazı biyosensörlerin analitik parametrelerinin özeti.

Elektrot tipi	Ölçüm tekniği	Doğrusal aralık (µM)	LOD(µM)	RSD%	Referanslar
Altın nanopartiküller/karbon nanotüpler/PyOx/cam karbon elektrot	Diferansiyel darbe voltammetri Amperometri	10-480	0.005	±0.12	(Shao et al. 2022)
MXene/platin nanopartikülleri/PyOx/manyetik camı karbon elektrot	Amperometri	10-1000	0.726	□5%	(Wen and Yang 2022)
PyOx/platin disk elektrot	Amperometri	10-5000	5	6.2	(Kucherenko et al. 2019b)
Ferrosen/FAD/β-siklodekstrin/yumurta akı/glutaraldehit/PyOx/altın elektrot	Amperometri	2.67-66.7	0.568	2.58	(Yumei et al. 2009)
3-merkaptopropiyonik asit/6-aminokaproik asit/PyOx/altın disk elektrot	Amperometri	2.5-50	1.87	-	(Bayram and Akyılmaz 2014)
Politramin/PyOx/ camı karbon disk elektrot	Amperometri	100-3000	50	0.3-4.8	(Situmorang et al. 2002)
Poli(Nötr Kırmızı)/PyOx/karbon film elektrot	Amperometri	90-600	34	2.8	(Ghica and Brett 2006)
Prusya mavisi/grafen kuantum noktaları/PyOx/ekran baskılı karbon elektrot	Amperometri	10-100	0.91	16	(Thirumalai et al. 2020)
3-aminopropil trietoksisilan çözeltisinin kapiler iç yüzeyindeki Si-OH ile kovalent olarak birleşmesi	Fluoresans fotometri	4-120	0.87	□1.70	(Li et al. 2017)
AINPs/PCL/PyOx/Au	Diferansiyel darbe voltammetri	1-1000	0.45	0.041	Bu çalışma

4.6 İNSAN SERUMUNDA PİRUVAT ÖLÇÜMÜ

İnsan serumu; glikoz, trigliseritler, endotoksin, hemoglobin ve proteinler gibi birçok yapıyı içeren karmaşık bir fizyolojik sıvıdır. Hedef analitin doğru ölçümünü test etmek ve kapasitesini ortaya koyabilmek için biyosensörü çeşitli kompleks maddeler içeren bir numunede analiz etmek oldukça önemlidir. Bu durum girişim yapabilecek maddelerin ölçüm üzerindeki potansiyel etkilerinin gözlemlenmesine yardımcı olmaktadır. Gerçek numune testlerinin yapılması, biyosensörün doğruluğunun ve geçerliliğinin kesin olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Deneylerde, erkek AB plazma örneğinden alınan insan serumu ön işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. Serum, analiz için $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ LiClO_4 ve kofaktörler ($5 \text{ } \mu\text{M}$ FAD, $50 \text{ } \mu\text{M}$ TPP ve 1 mM Mg^{+2}) içeren 50 mM , pH 7 PBS ile 10 kat seyreltilmiştir. Biyosensörün pratik uygulanabilirliğini değerlendirmek için seyreltilmiş insan serumu örneğine $10 \text{ } \mu\text{M}$ pirüvat eklenmiştir. Örnek, 5 mL test ortamında $-1,0 \text{ V}$ ile $+1,0 \text{ V}$ potansiyel tarama aralığı ile DPV tekniği kullanılarak üç kez test edilmiştir. Hazırlanan örnekten elde edilen pirüvat konsantrasyonu biyosensörün kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Üç ölçümün ortalama değeri $10,51 \text{ } \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Örnekteki pirüvat ölçümünün doğruluğu $\%105,11 \pm 0,02$ olarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensör ile gerçekleştirilen pirüvat ölçümünün doğruluğu standart pirüvat ölçümüyle ($\%99,5 \pm 0,002$) karşılaştırıldığında, $\%5,61$ 'lik pozitif bir girişim olduğu tespit edilmiştir. Bu varyans, insan serumunda bulunan birçok kompleks yapının toplam girişimine atfedilebilir. Ancak, bu girişim ihmal edilebilir düzeydedir. Geliştirilen biyosensör, insan serumundaki pirüvat seviyesinin gerçek zamanlı izlenmesi için hızlı ve güvenilir bir yöntem sağlamıştır. Ayrıca, AINP'ler sayesinde çalışma elektrodunun elektriksel iletkenliği iyileştirilmiş ve sonuç olarak, insan serumundaki pirüvat konsantrasyonunu neredeyse doğru bir şekilde tespit edebilen, yüksek sinyal gücüne ve kararlılığa sahip bir biyosensör tasarlanmıştır. Bu özelliği ile önerilen biyosensörün gerçek örneklerde pirüvatın kantitatif tayininde başarılı olabileceği gibi yüzey sularında, atık sularda, gıda örneklerinde ve tıp alanında sıklıkla ölçülen ve PyOx'un diğer substratı olan fosfat iyonunun tayininde de başarılı olabileceği sonucuna varılmıştır.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

Gerçekçi kısıtlar altında tasarlanan bu çalışmada, insan metabolizması için birincil enerji kaynağı olan ve eksikliğinde/fazlalığında çeşitli hastalıklara neden olan pirüvatın tespitinde kullanılmak üzere bir biyosensör geliştirilmiştir. PyOx immobilize PCL polimeri, daha önce herhangi bir pirüvat biyosensör modifikasyonunda kullanılmamış olan AlNPs ile modifiye edilerek altın elektrot yüzeyi üzerine kaplanmıştır. Pirüvat ölçüm aralığı +0,4 V'da 2,30 $\mu\text{A cm}^{-2}$ hassasiyetle 1-1000 μM olarak bulunmuştur. Doğruluk, bağıl standart sapma ve dedeksiyon limiti sırasıyla $99,5 \pm 0,002$, $0,041$ ve $0,45 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Biyosensör, insan serumundaki pirüvata $105,11 \pm 0,02$ ölçüm doğruluğu ile yanıt vermiştir. Gelecekteki çalışmalarda, farklı türde daha karmaşık moleküller içeren gerçek örneklerde kullanılabilirliğinin ayrıntılı olarak araştırılması önerilmektedir. Ölçüm doğruluğunun bozulması durumunda, potansiyel girişimleri önlemek için elektrot yüzeyine farklı iyonlar için seçicilik sunan membranlar uygulanabilir ve geliştirilen biyosensör, çeşitli gerçek numune türleri için pirüvatın güvenilir bir şekilde belirlenmesi için kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- [1] **Pundir C S, Malik M, Chaudhary R** (2019) Quantification of pyruvate with special emphasis on biosensors: A review. *Microchemical Journal*, 146:1102-1112.
- [2] **Kaklıkkaya İ, Menteşe Ü, Koramaz İ, Altun G, Menteşe A, Çakıroğlu Y, Özcan F** (2010) Results of ethyl pyruvate application in an experimental ischemia reperfusion model. *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 18(4):310-314.
- [3] **Malik, M., Chaudhary, R., & Pundir, C. S.** (2019a). Construction of an Amperometric Pyruvate Biosensor Based on Enzyme Bound to A Nanocomposite and Its Comparison with Enzyme Nanoparticles Bound to Electrode. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 7(2), 195–206.
- [4] **Engelking L R** (2015). Metabolic Fates of Pyruvate. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 169–173.
- [5] **Stanko R T, Tietze D L, Arch J E** (1992) Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a 4.25-MJ/d low-energy diet supplemented with pyruvate. *American Society for Clinical Nutrition*, 56:630-5.
- [6] **Bayram E, Akyilmaz E** (2014) A new pyruvate oxidase biosensor based on 3-mercaptopropionic acid/6-aminocaproic acid modified gold electrode. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 42(6): 418–422.
- [7] **Pelicano H, Martin D S, Xu R H, Huang P** (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, 25(34):4633–4646.
- [8] **van Bilsen M, van Der Vusse G J, Reneman RS** (1998) Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflügers Arch – Eur J Physiol*, 437:2–14.
- [9] **Malik M, Chaudhary R, Pundir C S** (2019b) Comparison with enzyme construction of an amperometric pyruvate biosensor based on enzyme bound to a nanocomposite and its comparison with enzyme nanoparticles bound to electrode. *Int. J. Appl. Sci, Biotechnol*, 7(2): 195-206.
- [10] **Kulys J, Wang L, Daugvalde N** (1992) Amperometric methylene green-mediated pyruvate electrode based on pyruvate oxidase entrapped in carbon paste. *Analytica Chimica Acta*, 265:15-20.
- [11] **Malik M, Chaudhary R, Pundir C S** (2019c) An improved enzyme nanoparticles based amperometric pyruvate biosensor for detection of pyruvate in serum. *Enzyme and Microbial Technology*, 123: 30–38.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [12] Zhao Y, Geng X, Zhou X, Xu L, Li S, Li Z, Guo Y, Li C (2023) A novel high-stability bioelectrochemical sensor based on sol-gel immobilization of lactate dehydrogenase and AuNPs-rGO signal enhancement for serum pyruvate detection. *Analytica Chimica Acta*, 1265.
- [13] Akyilmaz E, Yorganci E (2008) A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(12): 1874–1877.
- [14] Chen W, London R, Murphy E, Steenbergen C (1998) Regulation of the Ca²⁺ gradient across the sarcoplasmic reticulum in perfused rabbit heart A 19F nuclear magnetic resonance study. *American Heart Association*, 83:898-907.
- [15] Mallet R T, Bünger R (1994) Energetic modulation of cardiac inotropism and sarcoplasmic reticular Ca²⁺ uptake. In *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1224.
- [16] Malik M, Chaudhary R, Pundir C S (2020) An amperometric pyruvate biosensor based on pyruvate oxidase nanoparticles immobilized onto pencil graphite electrode. *Process Biochemistry*, 93: 12–20.
- [17] Essa M M, Subash S, Braidly N, Al-Adawi S, Lim C K, Manivasagam T, Guillemin G J (2013) Role of NAD⁺, Oxidative stress, and tryptophan metabolism in autism spectrum disorders. *International Journal of Tryptophan Research*, 6:15-28.
- [18] Gajovic N, Binyamin G, Warsinke A, Scheller F W, Heller A (2000) Operation of a miniature redox hydrogel-based pyruvate sensor in undiluted deoxygenated calf serum. *Analytical Chemistry*, 72: 2963-2968.
- [19] Fedakar A, Haliloglu B (2013) Leigh's syndrome presenting with encephalopathy. *Tuberculin Skin Test In Children*, 10(2): 94–97.
- [20] Bhat M, Prasad K V V, Trivedi D, Rajeev B, Battur H (2016) Pyruvic acid levels in serum and saliva: A new course for oral cancer screening? *Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology*, 20(1): 102–105.
- [21] Gore M G (2000) Spectrophotometry and spectrofluorimetry. *Practical Approach*.
- [22] Bücher T, Czok R, Lamprecht W, Latzko E (1965) Pyruvate. *Methods of Enzymatic Analysis*, 253-259.
- [23] Samanta A K (2023) Fundamentals of Colorimetry. Intech Open
- [24] (2013) Kromatografik analizler. *T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Kimya Teknolojisi*, Bölüm 1,4s.
- [25] Yiğit N, Öktem A B, Aksu P (2008) Gıdalarda Pestisit Kalıntı Analizlerinde Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC)' nin Kullanımı. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum.
- [26] Tüylek Z (2021) Biyolojik sistemlerde gelecekteki nano / biyosensör ürünlerine hazırlık. *Biyosistem Mühendisliği Dergisi*, 2(1):17-39.

KAYNALAR (devam ediyor)

- [27] **Sharma S K, Sehgal N, Kumar A** (2003) Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, 3(2–3): 307–316.
- [28] **Sezgintürk M K** (2022) Kanser biyobelirteçlerinin tespiti için tek kullanımlık biyosensörler. *Türkiye Klinikleri*, 85-102.
- [29] **Aykurt U, Temiz H** (2006) Biyosensör ve gıda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 51-59.
- [30] **Keskin M, Arslan F** (2020) Biyosensörler. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 1-2:51-60.
- [31] **Powner E T; Yalcinkaya F** (1997). Intelligent biosensors. *Sensor Review*, 17 (2), 107-116
- [32] **Turner A P F; Karube I; Wilson S W** (1986). Biosensors. Fundamentals and Applications. *Oxford Science Publications*, 33.
- [33] **Velasco-Garcia M N, Mottram T** (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 84: 1–12.
- [34] **Jiang D, Geb P, Wang L, Jiang H, Yang M, Yuan L, Geb Q, Fang W, Jua X** (2019) A novel electrochemical mast cell-based paper biosensor for the rapid detection of milk allergen casein. *Biosensors and Bioelectronics*, 130: 299–306.
- [35] **Alahi M E E, Mukhopadhyay S C** (2017) Detection methodologies for pathogen and toxins: A review. *Sensors*, 17(8): 1–20.
- [36] **Wu Q, Zhang Y, Yang Q, Yuan N, Zhang W** (2019). Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens. *Sensors (Switzerland)*, 19(22): 4916.
- [37] **Evtugyn G, Hianik T** (2019). Electrochemical immuno- and aptasensors for mycotoxin determination. *Chemosensors*, 7(1): 10.
- [38] **Narwal V, Deswal R, Batra B, Kalra V, Hooda R, Sharma M, Rana J S** (2019) Cholesterol biosensors: A review. *Steroids*, 143: 6–17.
- [39] **Rackus D G, Shamsi M H, Wheeler A R** (2015) Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chemical Society Reviews*, 44(15): 5320–5340.
- [40] **Baranwal J, Barse B, Gatto G, Broncova G, Kumar A** (2022) Electrochemical sensors and their applications: a review. *Chemosensors*, 10 (9): 363.
- [41] **Wang, J** (2006) Analytical electrochemistry. *Wiley-VCH*.
- [42] **Tural H, Gökçel İ H, Ertaş, F N** (2010) Enstrümental Analiz 1 Elektroanalitik Yöntemler. *Ege Üniversitesi Yayınları*, İzmir, Türkiye, 126: 339 s.

KAYNALAR (devam ediyor)

- [43] **Eren K** (2014) Bazı Geçiş Metallerinin Arginin Komplekslerinin Elektrokimyasal Özelliklerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Hitit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Çorum, 73 s.
- [44] **Şen S** (2014) Tetra Sodyum;3-[[4-[[4-[(6-Amino-1Hidroksi-3-Sülfonato-2- Naftilazo)]-6-Sülfonato-1-Naftil]Azo]-1-Naftil]Azo] Naftalin-1,5 Disülfonat 'ın elektrokimyasal indirgenme davranışının belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Giresun, 74 s.
- [45] **Eren E** (2021) Ters iyontoforez yöntemi ile homosistein molekülünün girişimsel olmayan amperometrik metotla tayin edilmesi. *Doktora Tezi*, 19 Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Samsun, 105s.
- [46] **Mulchandani A, Rogers K R** (1998) Enzim and microbial biosensors. Techniques and protocols. *Methods in Biotechnology*, 6:3-11.
- [47] **Özoğlu Ö** (2019) enzim temelli amperometrik laktat biyosensörü üretimi ve tayin sınırının belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bursa, 76s.
- [48] **Karyakin A A, Ulasova EA, Vagin M Y, Karyakina, E E** (2002) *Sensor*, 1:16-24.
- [49] **Korotkaya E V** (2014) Biyosensörler: gıda endüstrisinde tasarım, sınıflandırma ve uygulamalar. *Gıdalar ve hammaddeler*. 2(2): 161-171.
- [50] **KÖKBAŞ U** (2022) Corona Virus Diagnosis and Biosensors. *Archives Medical Review Journal*, 31(4): 273–278.
- [51] **Turgut B** (2023) Biosensors and healthcare. *International Academic Social Resources Journal*, 8(47): 2636-7637.
- [52] **Yang L, Wu N, Bai R, Chen M, Dong W, Zhou J, Jiang M** (2022) A novel strategy for the detection of pyruvate in fermentation processes based on well-distributed enzyme-inorganic hybrid nanoflowers on thiol graphene modified gold electrodes. *Electrochimica Acta*, 427.
- [53] **Samson R, Navale G R, Dharne M S** (2020) Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID 19. *3 Biotech*, 10:385.
- [54] **Özer İ, Tezel H, Sanajou S , Yirün A, Baydar T, Erkekoğlu P** (2021) Biosensors and Their Areas of Application: Traditional Review. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 11(1):35-48.
- [55] **Østergaard T G, Hansen L H, Binderup M L, Norman A, Sørensen S J** (2007) The cda GenoTox assay: a new and sensitive method for detection of environmental genotoxins, including nitroarenes and aromatic amines. *Mutation Research*, 631(2):77-84.

KAYNALAR (devam ediyor)

- [56] **Özoglu O, Ünal A M, Altuntas E G** (2018) Biyosensörler: gıda ve sağlık alanında laktat biyosensörleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 180-193.
- [57] **Demirkıran A** (2019) Nanoteknolojinin insan sağlığına faydalı ve zararlı yönleri. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(2):136-148.
- [58] **Arai G, Noma T, Habu H, Yasumori I** (1999) Pyruvate sensor based on pyruvate oxidase immobilized in a poly(mercapto-p-benzoquinone) film. *In Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464.
- [59] **Arai G, Noma T, Habu H, Yasumori** (1999) Pyruvate sensor based on pyruvate oxidase immobilized in a poly(mercapto-p-benzoquinone) film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464:143-148.
- [60] **Shao M, Shi Z, Pu S, Sun J, Bai Y** (2022) Development of nanostructured enzymic amperometric biosensor based on gold nanoparticles for detection of pyruvate in natural samples. *International Journal of Electrochemical Science*, 17(4): 220423.
- [61] **Wen Q, Yang M** (2022) Platinum nanoparticles modified MXene for highly sensitive detection of pyruvate. *Materials Letters*, 322: 132496.
- [62] **Ghoreishi S M, Behpour M, Khoobi A, Moghadam Z** (2013a) Determination of trace amounts of sulfamethizole using a multi-walled carbon nanotube modified electrode: application of experimental design in voltammetric studies. *Analytical Letters*, 46(2): 323-339.
- [63] **Ghoreishi S M, Behpour M, Khoobi A, Salavati-Niasari M** (2013b) Electrochemical study of a self-assembled monolayer of N, N'-bis [(E)-(1-pyridyl) methyldene]-1, 3-propanediamine formed on glassy carbon electrode: preparation, characterization and application. *Analytical Methods*, 5(23): 6727-6733.
- [64] **Khoobi A, Attaran A M, Yousofi M, Enhessari M** (2019) A sensitive lead titanate nano-structured sensor for electrochemical determination of pentoxifylline drug in real samples. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9: 29-37.
- [65] **Khoobi A, Ghoreishi S M, Masoum S, Behpour M** (2013) Multivariate curve resolution-alternating least squares assisted by voltammetry for simultaneous determination of betaxolol and atenolol using carbon nanotube paste electrode. *Bioelectrochemistry*, 94: 100-107.
- [66] **Mollaei M, Ghoreishi S M, Khoobi A** (2019) Electrochemical investigation of a novel surfactant for sensitive detection of folic acid in pharmaceutical and biological samples by multivariate optimization. *Measurement*, 145: 300-310.
- [67] **Brown A P, Anson F C** (1977) Cyclic and differential pulse voltammetric behavior of reactants confined to the electrode surface. *Analytical Chemistry*, 49(11): 1589-1595.

KAYNALAR (devam ediyor)

- [68] **Korkut S, Uzuncar S, Kilic M S, Hazer B** (2019) Electrochemical determination of urea using a gold nanoparticle-copolymer coated-enzyme modified gold electrode. *Instrumentation Science & Technology*, 47(1): 1-18.
- [69] **Kilic M S** (2021) A Novel Flow-injection Rhodium Nanoparticles Modified Phosphate Biosensor and its Operation in Artificial Urine. *Electroanalysis*, 33(8): 1963-1977.
- [70] **Korkut S, Göl S, Kilic M S** (2020) Poly (pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylic acid) / Pyruvate Oxidase Based Biosensor for Phosphate: Determination of the Potential, and Application in Streams. *Electroanalysis*, 32(2): 271-280.
- [71] **Korkut Uru S, Kilic M S, Yetiren F** (2021) Improved sensing performance of amperometric urea biosensor by using platinum nanoparticles. *Electroanalysis*, 33(8): 1911 -1922.
- [72] **Tittmann K, Golbik R, Ghisla S, Hübner G** (2000) Mechanism of elementary catalytic steps of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry* 39(35): 10747-10754.
- [73] **Gilbert L, Jenkins A T A, Browning S, Hart J** (2011) Development of an amperometric, screen-printed, single-enzyme phosphate ion biosensor and its application to the analysis of biomedical and environmental samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160(1): 1322-1327.
- [74] **Tittmann K, Proske D, Spinka M, Ghisla S, Rudolph R, Hübner G, Kern G** (1998) Activation of thiamin diphosphate and FAD in the phosphatedependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21): 12929-12934.
- [75] **Rizo R, Feliu J M, Herrero E** (2021) New insights into the hydrogen peroxide reduction reaction and its comparison with the oxygen reduction reaction in alkaline media on well-defined platinum surfaces. *Journal of Catalysis*, 398: 123-132.
- [76] **Abayomi L A, Terry LA, White S, Warner P** (2006) Development of a disposable pyruvate biosensor to determine pungency in onions (*Allium cepa* L.). *Biosensors and Bioelectronics*, 21(11): 2176-2179.
- [77] **Kucherenko I S, Soldatkin O O, Topolnikova Y V, Dzyadevych S V, Soldatkin A P** (2019b) Novel multiplexed biosensor system for the determination of lactate and pyruvate in blood serum. *Electroanalysis*, 31(8): 1608-1614.
- [78] **Leote R J, Ghica M E, Brett C M** (2022) Pyruvate oxidase biosensors based on glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and poly (neutral red) synthesized in ethaline deep eutectic solvent. *Electroanalysis*, 34(4): 724-734.
- [79] **Zhou K, Zhu Y, Yang X, Luo J., Li C, Luan S** (2010) A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-graphene-HRP-chitosan biocomposites. *Electrochimica Acta*, 55(9): 3055-3060.

KAYNALAR (devam ediyor)

- [80] Grennan K, Killard A J, Hanson C J, Cafolla A A, Smyth M R (2006) Optimisation and characterisation of biosensors based on polyaniline. *Talanta*, 68(5): 1591-1600.
- [81] Spychalska K, Zajac D, Baluta S, Halicka K, Cabaj J (2020) Functional polymers structures for (Bio) sensing application-A review. *Polymers*, 12(5): 1154.
- [82] Kilic M S, Korkut S, Hazer B (2017) Novel Enzymatic Rhodium Modified Poly (styrene-g-oleic amide) Film Electrode for Hydrogen Peroxide Detection. *Electroanalysis*, 29(10): 2377-2384.
- [83] Bowman L, Motamed R, Lee P, Aleem K, Berawala A S, Hayden K L, Bzik D J, Chattopadhyay D (2020) A simple and reliable method for determination of optimum pH in coupled enzyme assays. *Biotechniques*, 68(4): 200-203.
- [84] Ghica M E, Brett C M (2006) Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly (neutral red) modified carbon film electrodes. Application to natural samples. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(8): 748-756.
- [85] Situmorang M, Gooding J J, Hibbert D B, Barnett D (2002) The development of a pyruvate biosensor using electrodeposited polytyramine. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14(1): 17-21.
- [86] Yao T, Yano T, Nishino H (2004) Simultaneous in vivo monitoring of glucose, L-lactate, and pyruvate concentrations in rat brain by a flow-injection biosensor system with an on-line microdialysis sampling. *Analytica Chimica Acta*, 510(1): 53-59.
- [87] Casanova A, Cuartero M, Alacid Y, Almagro C M, García-Cánovas F, García M S, Ortuño J A (2020) A sustainable amperometric biosensor for the analysis of ascorbic, benzoic, gallic and kojic acids through catechol detection. *Innovation and Signal Processing. Analyst*, 145(10): 3645-3655.
- [88] Fakanya W M, Tothill I E (2014) Detection of the inflammation biomarker C-reactive protein in serum samples: towards an optimal biosensor formula. *Biosensors*, 4(4): 340-357.
- [89] Gauglitz G (2018) Analytical evaluation of sensor measurements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410: 5-13.
- [90] Kong D, Zhao J, Tang S, Shen W, Lee HK (2021) Logarithmic data processing can be used justifiably in the plotting of a calibration curve. *Analytical Chemistry*, 93(36): 12156-12161.
- [91] Song M J, Yun D H, Hong S I (2009) An electrochemical biosensor array for rapid detection of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(3): 474-478.

KAYNALAR (devam ediyor)

- [92] **Kucherenko D Y, Kucherenko I, Soldatkin O, Topolnikova YV, Dzyadevych S, Soldatkin A** (2019a) A highly selective amperometric biosensor array for the simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate. *Bioelectrochemistry*, 128, 100-108.
- [93] **Yumei L, Zhiqiang F, Kejun D, Yifeng T** (2009) Study on a pyruvate oxidase biosensor based on β -cyclodextrin with ferrocene as electron-transfer mediator. *Analytical Letters*, 42(2): 312-322.
- [94] **Knyzhnykova D, Topolnikova Y V, Kucherenko I, Soldatkin O** (2018) Development of pyruvate oxidase-based amperometric biosensor for pyruvate determination. *Biopolymers and Cell*.
- [95] **Thirumalai D, Kim S, Kim S, Chang S C** (2020) Reagentless amperometric pyruvate biosensor based on a Prussian blue-and enzyme nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode. *ACS Omega*, 5(46): 30123-30129.
- [96] **Berntsson S** (1955) Spectrophotometric determination of pyruvic acid by salicylaldehyde method. *Analytical Chemistry*, 27(10): 1659-1660.
- [97] **Anthon G E, Barrett D M** (2003) Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12): 1210-1213.
- [98] **Lloyd B, Burrin, J, Smythe P, Alberti K** (1978) Enzymic fluorometric continuous-flow assays for blood glucose, lactate, pyruvate, alanine, glycerol, and 3-hydroxybutyrate. *Clinical Chemistry*, 24(10): 1724-1729.
- [99] **Yoo KilSun YK, Pike L** (2000) Development of an automated system for pyruvic acid analysis in onion breeding.
- [100] **Metrani R, Jayaprakasha G, Patil B S** (2018) Optimized method for the quantification of pyruvic acid in onions by microplate reader and confirmation by high resolution mass spectra. *Food Chemistry*, 242: 451-458.
- [101] **Pailla K, Blonde-Cynober F, Aussel C, De Bandt J.-P, Cynober L** (2000) Branched-chain keto-acids and pyruvate in blood: measurement by HPLC with fluorimetric detection and changes in older subjects. *Clinical Chemistry*, 46(6): 848-853.
- [102] URL-1 <<https://daytam.atauni.edu.tr> >, Ziyaret Tarihi: 12.04.2024.
- [103] URL-2 <<https://www.pharmastuff4u.com> >, Ziyaret Tarihi: 01.02.2024.
- [104] URL-3 <<https://www.memorial.com.tr>>, Ziyaret Tarihi: 30.03.2024.

ÖZGEÇMİŞ

İlayda DİKKULAK, İlk ve orta
öğretimimi Kırklareli Pınarhisar'da tamamlamıştır. Daha sonra Şehit Gökten Özüpek Anadolu
Meslek Lisesi Hemşirelik bölümünden mezun olmuştur. 2017 yılında Zonguldak Bülent Ecevit
Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği bölümüne girmeye hak
kazanmıştır. 2021 yılında Biyomedikal Mühendisliği bölümünden birinci olarak mezun
olmuştur. Aynı yıl Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal
Mühendisliği ana bilim dalında yüksek lisans yapmaya hak kazanmıştır.