

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**JELATİN-ALJİNAT-TİTANYUM DİOKSİT-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Utku KARAKAYA

KİMYA ANABİLİM DALI

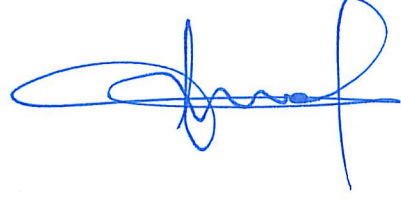
**ANKARA
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Utku KARAKAYA tarafından hazırlanan “Jelatin-Aljinat-Titanyum Dioksit-Süperoksit Dismutaz Biyosensörünün Geliştirilmesi ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ” adlı tez çalışması 15/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Emel EMREGÜL

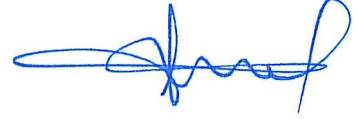


Jüri Üyeleri:

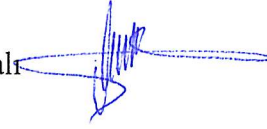
Başkan: Prof. Dr. Zeliha HAYVALI
Ankara Üniversitesi / Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Emel EMREGÜL
Ankara Üniversitesi / Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Fatma ARSLAN
Gazi Üniversitesi / Kimya Anabilim Dalı



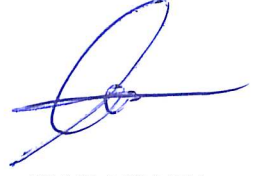
Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

15.06.2017



Utku KARAKAYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JELATİN-ALJİNAT- TİTANYUM DİOKSİT-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Utku KARAKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu tez çalışmasında, platin elektrot yüzeyine SOD'un (Süperoksit dismutaz) jelatin-aljinat-titanyum dioksit (J-AL-TiO₂) içine immobilizasyonu yapıldı. Bu nedenle jelatin-aljinat oranı, SOD konsantrasyonu, TiO₂ miktarı, glutaraldehit konsantrasyonu ve pH gibi biyosensörün performansını etkileyen parametreler incelendi. EIS (Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi) ve CV (Döngüsel voltametri) ile immobilizasyon basamakları çalışılmış ve biyosensörün elektrokimyası incelenmiştir. Farklı tarama hızlarında döngüsel voltametri ile yapılan çalışmalarda TiO₂ nanopartiküllerin ve redoks probunun etkisi araştırılmıştır. ks ve α değerleri hesaplanarak bu etki sayısal olarak açıklanmıştır. Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrot ile yapılan kalibrasyon çalışmasında iki lineer aralık belirlenmiştir. Küçük lineer aralık 0.0009 mM – 0.125 mM aralığında ve büyük lineer aralık için 0.25 mM - 2 mM arasında bulunmuştur. Algılama limiti ise 0,9 μ M olarak belirlenmiştir. Ayrıca biyosensörün kullanılabilirliği araştırılmıştır ve geliştirilen biyosensör ile 10. gün sonunda alınan ölçümde kalan aktivite % 61.56 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör O₂^{•-} tayini için yüksek seçicilik, düşük tayin sınırı, uzun süreli kararlılık gibi önemli analitik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.

Haziran 2017, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Jelatin, Aljinat, Titanyum dioksit, Süperoksit radikali, Süperoksit dismutaz, Döngüsel Voltametri, Amperometri, Biyosensör.

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF GELATIN-ALGINATE- TITANIUM DIOXIDE- SUPEROXIDE DISMUTASE BIOSENSOR AND INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL PROPERTIES

Utku KARAKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

In this thesis, the biosensor was constructed by immobilization of SOD, in gelatin-alginate-titanium dioxide on a platinum electrode. For this, parameters affecting the performance of the biosensor such as amount of gelatin-alginate ratio, TiO_2 , concentration of SOD, glutaraldehyde and pH were investigated. Immobilization steps were studied by using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (CV) techniques, and the electrochemistry of the biosensor were examined. By using CV at different scan rates, the effect of TiO_2 nanoparticles and redox probe were investigated. This effect was explained as numerical by calculating k_s and α values. The calibration curve of gelatin-alginate- TiO_2 -SOD electrode consisted of two linear range. The smaller linear range was observed between 0.0009 mM – 0.125 mM and the higher linear range was between 0.25 mM – 2 mM. Detection limit of the biosensor was 0,9 μM . The stability of the biosensor also studied and after 10 days the retained activity was 61.56%, compared with the first day. Constructed biosensor shows that it has significant analytical properties such as high selection for $\text{O}_2^{\cdot -}$, low detection limit, long-term stability.

June 2017, 102 pages

Key Words: Gelatin, Alginate, Titanium dioxide, Superoxide radical, Superoxide dismutase, Cyclic Voltametry, Amperometry, Biosensor.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında ve tezimin hazırlanmasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini, hoşgörüsünü esirgemeyen, sabırla hep destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı),

Hayatım boyunca her koşulda beni maddi ve manevi her türlü yönden destekleyen sevgili annem, babam ve kardeşime,

Sürekli desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Burak DERKUŞ, Vuslat BÜK, Derya YILMAZ, Mustafa ÖZKAN, Selin GEREKÇİ, Gizem ÖZBEK, Ecem BOZTUNA ve Murat Mesut YILDIRIM'a

Teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım.

UTKU KARAKAYA

Ankara, Haziran 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Elektrokimya	4
2.1.1 Elektriksel çift tabaka	4
2.1.2 Dönüşümlü voltametri (CV).....	7
2.1.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)	10
2.1.4 Amperometri	13
2.2 Serbest Radikaller	15
2.3 Biyosensörler	25
2.3.1 Biyoreseptörler	26
2.3.1.1 Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması	27
2.3.1.1.1 Enzim temelli biyosensörler	28
2.3.1.1.2 İmmünosensörler	29
2.3.1.1.3 Genosensörler	29
2.3.1.1.4 Hücre temelli biyosensörler	30
2.3.1.1.5 Biyomimetik sensörler (Aptsensörler).....	31
2.3.2 İleticiler (Transduserler)	32
2.3.2.1 Biyosensörlerin ileticilere göre sınıflandırılması	32
2.3.2.1.1 Elektrokimyasal biyosensörler	32
2.3.2.1.2 Optik temelli biyosensörler	34
2.3.2.1.3 Piezoelektrik temelli biyosensörler	35
2.3.2.1.4 Kalorimetrik biyosensörler	35
2.3.3 Biyolojik materyellerin immobilizasyonu	35

2.3.3.1 Geri dönüşümsüz immobilizasyon metotları	37
2.3.3.1.1 Kovalent bağ düzenlenmesi	37
2.3.3.1.2 Tutuklama	38
2.3.3.1.3 Çapraz bağlama	38
2.3.3.2 Geri dönüşümlü immobilizasyon metotları	39
2.3.3.2.1 Nonspesifik adsorpsiyon	39
2.3.3.2.2 İyonik bağlama	40
2.3.3.2.3 Affinite bağlama	40
2.4 Çalışmada Kullanılan Biyomolekül, Taşıyıcı Sistem, Nanopartikül ve Çapraz Bağlayıcılar	41
2.4.1 Enzim	41
2.4.2 Substrat	43
2.4.3 Taşıyıcı	44
2.4.4.1 Jelatin	44
2.4.4.2 Aljinat	45
2.4.4 Çapraz bağlayıcı	46
2.4.5 TiO ₂ nanopartiküller	47
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI ve ÇALIŞMANIN AMACI	49
4. MATERYAL ve YÖNTEM	53
4.1 Materyaller	53
4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	53
4.1.2 Kullanılan cihazlar	53
4.1.3 Kullanılan elektrotlar	54
4.1.4 Kullanılan çözeltiler	54
4.2 Yöntem	55
4.2.1 İmmobilizasyon jelinin hazırlanması	55
4.2.2 J-AL-TiO ₂ -SOD elektrotlarının ve mikrotabakanın hazırlanması	55
4.2.3 Bağlanmayan enzimin uzaklaştırılması	56
4.2.4 Enzim aktivitesi tayini	56
4.2.4.1 Elektrokimyasal yöntem	56
4.2.5 Optimizasyon çalışmaları	57
4.2.5.1 Jelatin-Aljinat oranı optimizasyonu	57
4.2.5.2 Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonu	57
4.2.5.3 Enzim konsantrasyonu optimizasyonu	58

4.2.5.4 TiO ₂ nanopartikül konsantrasyonu optimizasyonu.....	58
4.2.5.5 Ksantin konsantrasyonu	58
4.2.5.6 pH optimizasyonu	58
4.2.5.7 J-AL-TiO ₂ -SOD biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	58
4.2.5.8 J-AL-TiO ₂ -SOD biyosensörünün kullanım süresi	59
4.2.5.9 Biyosensörün elektrokimyasal davranışı	59
4.2.5.10 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi	59
5. BULGULAR	61
5.1 SEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi	61
5.2 FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi	62
5.3 Optimizasyon Çalışmaları	63
5.3.1 SOD aktivitesi üzerine J-AL oranlarının etkisi	63
5.3.2 SOD aktivitesi üzerine glutaraldehit konsantrasyonu etkisi	64
5.3.3 Enzim Konsantrasyonu	65
5.3.4 TiO ₂ nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi	66
5.3.5 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi	67
5.4 Tekrar Üretilebilirlik	68
5.5 J-AL-TiO ₂ -SOD Biyosensörünün Kullanım Süresi	69
5.6 Geliştirilen Biyosensörün Elektrokimyasal Davranışı	70
5.6.1 Döngüsel voltametri (CV)	70
5.6.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)	71
5.6.3 Tarama hızı çalışması	73
5.6.3.1 Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD elektrodun [Fe(CN) ₆ ^{4-/3-}] varlığında tarama hızı çalışması	73
5.6.3.2 Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun [Fe(CN) ₆ ^{4-/3-}] varlığında tarama hızı çalışması	75
5.7 Ksantin Konsantrasyonu	76
5.8 Sağlıklı ve Kanserli Dokular Üzerine Testler	78
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ.....	102

SİMGELER DİZİNİ

A	Amper
AC	Alternatif akım
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
Au	Altın
aq	Çözelti
C	Kapasitör
CCl ₃ •	Triklorometil
CeO ₂	Seryum dioksit
cm ⁻²	Santimetre kare
CO	Karbonmonoksit
Cu	Bakır
Fe	Demir
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HOCl	Hipoklorik asit
HO•	Hidroksil radikali
KCl	Potasyum Klorür
ks	Elektron-Transfer Sabiti
m	Metalik elektrot
mA	Miliamper
mM	Milimolar
M	Molar
Mn	Manganez
MnO ₂	Manganez dioksit
mV	Milivolt
nM	Nanomolar
NO•	Nitrik Oksit Radikali
NO ₂ •	Azot dioksit Radikali
O ₂	Moleküler Oksijen
O ₂ •-	Süperoksit Radikali

$\text{OH}^\bullet$	Hidroksil Radikali
$\text{ONOO}^\bullet$	Peroksinitrit Radikali
Pt	Platin
$\text{RO}^\bullet$	Alkoksil
$\text{ROO}^\bullet$	Peroksil Radikal
ROOH	Lipid hidroperoksit
s	Saniye
SiO_2	Silisyum dioksit
TiO_2	Titanyum Dioksit
w/w	Ağırlık oranı
Zn	Çinko
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
Ω	Ohm
$\Delta\phi$	Potansiyel düşüşü
ϕ_m	metal potansiyeli
ϕ_s	çözelti potansiyeli
ω	Açısal frekans
σ	Warburg katsayısı
α_s	Elektron-Transfer Katsayısı

Kısaltmalar

AL	Aljinat
ANP	Altın Nanopartikül
BDM	Bochris, Devanathan ve Muller modeli
CV	Dönüşümlü Voltametri
DHP	Dış Helmholtz Tabakası
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
ESR	Elektron Spin Rezonansı
GA	Glutaraldehit
GOD	Glukoz Oksidaz
HKs	Hipoksantin
IHP	İç Helmholtz Tabakası
IS	İyonik Sıvı
ITO	İndiyum Kalay Oksit
J	Jelatin
KMS	Karboksimetil Selüloz
Ks	Ksantin
KsOD	Ksantin Oksidaz
KT	Kitosan
LSV	Doğrusal taramalı voltametri
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
ROP	Reaktif Oksijen Partikülleri
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabaka
Sit-c	Sitokrom-c
SJ	Silika sol-jel
SPR	Yüzey Plasmon Rezonans
SOD	Süperoksit Dismutaz
U	Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Elektrot çözelti ara yüzeyi	5
Şekil 2.2	Stern elektriksel çift tabaka modeli	6
Şekil 2.3	Gouy-Chapman-Stern modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti ara yüzeyinde potansiyel düşüşü	7
Şekil 2.4	Dönüşümlü voltametri deney düzeneği	8
Şekil 2.5	Dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramanın zamanla değişimi	9
Şekil 2.6	İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap	10
Şekil 2.7	Tipik bir Nyquist impedans spektrum grafiği	11
Şekil 2.8	Randles devresi	12
Şekil 2.9	Nyquist ve Bode diyagramları (Uygun 2012) a. Nyquist diyagramı b.Bode diyagramı	13
Şekil 2.10	Kronoamperometrik uyarı ve cevap	14
Şekil 2.11	Reaktif oksijen partiküllerinin oluşumu	18
Şekil 2.12	Antioksidanların serbest radikalleri nötrleştirmesi	20
Şekil 2.13	ROP ve doku hasarı arasındaki ilişki (Stohs ve Bagchi 1995)	21
Şekil 2.14	Biyosensörün şematik gösterimi	26
Şekil 2.15	Çeşitli biyolojik sinyal mekanizmalarına göre biyosensör türleri.....	27
Şekil 2.16	İletici türleri	32
Şekil 2.17	Tersinmez immobilizasyon metotları (Brena ve Batista-Viera 2013)	37
Şekil 2.18	Tersinir immobilizasyon metotları (Brena ve Batista-Viera2013)	39
Şekil 2.19	Çeşitli metal merkezli SOD enzimleri	42
Şekil 2.20	SOD enziminin uygulamaları (Bafana vd. 2011)	43
Şekil 2.21	Ksantinin kimyasal yapısı	44
Şekil 2.22	Aljinatın monomerleri ve yapısı	46

Şekil 2.23	Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi	47
Şekil 4.1	Elektrot yüzeyindeki reaksiyon şeması (Emregül 2005).....	57
Şekil 5.1.a.	Jelatin-Aljinat, b. Jelatin-Aljinat-TiO ₂ , c. Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD SEM mikrografları	61
Şekil 5.2.a.	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ , b. Jelatin-Aljinat-SOD, c. Jelatin-Aljinat-TiO ₂ - SOD FT-IR spektrumları	62
Şekil 5.3	Jelatin-Aljinat oranı miktarının biyosensör cevabına etkisi	63
Şekil 5.4	GA molar oranının biyosensör cevabına etkisi	64
Şekil 5.5	J-AL-TiO ₂ -SOD elektrotlarında değişik enzim konsantrasyonlarının amperometrik cevaba etkisi.....	65
Şekil 5.6	TiO ₂ nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi	66
Şekil 5.7	pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi	67
Şekil 5.8	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD elektrodun tekrar üretilebilirlik grafiği	68
Şekil 5.9	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD biyosensörün kullanım süresi	69
Şekil 5.10	Jelatin-Aljinat enzim sensörün dönüşümlü voltamogramı.....	70
Şekil 5.11	Biyosensörün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği	72
Şekil 5.12	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği	73
Şekil 5.13	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD elektrodun tarama hızının doğal logaritmasına karşı pik potansiyelleri grafiği	74
Şekil 5.14	Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun değişen tarama hızlarındaki anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği.....	75
Şekil 5.15	Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun tarama hızının doğal logaritmasına karşı pik potansiyelleri grafiği	76
Şekil 5.16	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD biyosensörünün yüksek konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği	77
Şekil 5.17	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD biyosensörünün düşük konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği	77
Şekil 5.18	Jelatin-Aljinat-TiO ₂ -SOD biyosensörünün sağlıklı ve kanserli doku ilavesi ile değişimi	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Reaktif oksijen partikülleri	17
Çizelge 2.2	Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları	19
Çizelge 2.3	Bazı ROP'ları nötralize eden antioksidanlar	20



1. GİRİŞ

Reaktif oksijen partikülleri (ROP), oldukça reaktif indirgenmiş oksijen moleküllerinin bir sınıfıdır. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit gibi yapılar içermektedirler. Birincil tür olan süperoksit radikalleri normal fizyolojik şartlar altında düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Süperoksit dismutaz ile dismutasyonu sonucunda H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülürler (McCord ve Fridovich 1968).

Süperoksit anyonları çoğunlukla toksik olarak değerlendirilir, çünkü biyolojik sistemlerde alkoksil ($RO^\bullet$), hidroksil radikali ($HO^\bullet$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi başka radikallere çevrilmektedirler. Süperoksit anyonundaki artış ile hücre büyümesi, mutajenezis (mutagenez) ve hücre ölümleri ile sonuçlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1984, Kehrer 2000, Auchere ve Rusnak 2002, Cepinskas vd. 2002, Alfonso vd. 2007, Seifried vd. 2007). Ayrıca, travmatik beyin yaralanmalarında süperoksit konsantrasyonu önemli miktarda artabilmektedir (McCord ve Fridovich 1969, Kontos ve Wei 1986, Globus vd. 1995, Thomas vd. 1996, Wrona ve Dryhurst, 1998, Sadek vd. 2004, Ellis vd. 2008, Ji vd. 2009, Komatsu vd. 2009). Süperoksit radikalleri; yaşlanma, kanser, parkinson gibi kademeli nerodejeneratif hasar hastalıklarda oluşabilmektedir (Hall ve Braughler 1989, Floyd 1990, Vanella vd. 1993, Mossine vd. 1999, Wang vd. 2008, Barroso vd. 2011). Bu yüzden süperoksit anyonları konsantrasyonunun kantitatif olarak belirlenmesi ve antioksidan bileşenlerinin yararlı etkileri oldukça ilgi çekmektedir (Wang vd. 2009).

Süperoksit radikallerinin belirlenmesinde, elektron spin rezonansı (Kroh vd. 1961, Nilsson vd. 1969, Bray vd. 1970), kondüktometrik analiz (Ander 1967), kütle spektroskopisi (Foner ve Hudson 1962), spektrofotometre (Andrew 1969) vb. ortak yöntemler kullanılmaktadır. Son zamanlarda, elektrokimyasal olarak süperoksit radikalının belirlenmesi için önemli sayıda araştırma yapılmıştır. Çünkü elektrokimyasal metot basit, seçici, düşük maliyetli, direkt ve gerçek zamanlı olarak biyolojik sistemlerde saptanmalarını sağlayabilir (Wang vd. 2012). Elektrokimyasal süperoksit sensörü olarak iki ana tip bulunmaktadır. İlk grup sitokrom c'nin süperoksit tarafında indirgenmesi esaslıdır. Sitokrom c'nin elektrot yüzeyinde yeniden

oksidasyonu ile oluşan akım süperoksit konsantrasyonu ile orantılıdır. Redoks proteini ve elektrot arasındaki elektrokimyasal iletişimi kurmak için mediyatörlü ve mediyatörsüz düzenlemeler kullanılmıştır (Campanella vd. 1997, Tammeveski vd. 1998, Lisdat vd. 1999, Scheller vd. 1999, Gobi ve Mizutani 2000, Gobi vd. 2001, Ge ve Lisdat 2002, Ignatov vd. 2002). Fakat sitokrom c, süperoksit radikalleri için spesifik enzimler değildir. İkinci grup sensörler ise SOD ile süperoksitlerin spesifik dismutasyonu temellidir. SOD'lar süperoksitlerin O_2 ve H_2O_2 'e dismutasyonları için çok iyi adreslenmişlerdir ve bu strateji doğrultusunda süperoksit sensörlerinin geliştirilmesinde kullanılmışlardır (Campanella vd. 1997, 2000a,b, 2001, Mesároš vd. 1998a,b, Descroix ve Bedioui 2001, Endo vd. 2002, Tian vd. 2002a,b). Çoğu sensör süperoksitlerin SOD ile dismutasyonu sonucu oluşan H_2O_2 'in saptanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Di vd. 2004). Polimerle hazırlanmış enzim membranlı biyosensörlerde enzim hazırlanmış polimer film içerisine hapsedilerek hazırlanmaktadır (Malitesta vd. 1990). Enzimin polimer yüzeyine kovalent olarak bağlanması için glutaraldehit, epiklorohidrin ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimmit gibi değişik çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır (Curilli vd. 2001).

Nanopartiküller düşük erime noktaları, özel optiksel özellikleri, yüksek katalitik aktiviteleri ve sıradan olmayan mekanik özellikleri nedeniyle kendi yığın malzemelerine göre daha çok ilgi çekmektedirler (Siegel 1991). Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, bileşenleri ve homojenlik derecelerine bağlıdır. Bu nedenle değişik sentez yöntemleri geliştirilmiştir (Toba vd. 1994, Gao ve Wachs 1999, Balachandaran vd. 2010). SiO_2 , altın, gümüş, CeO_2 , MnO_2 ve TiO_2 nanopartikülleri gibi birçok malzeme nanobiyosensörlerin yapımında kullanılmaktadır (Rahman vd. 2010). Bunlar arasında TiO_2 nanopartikülleri üstün özellikleri, geniş yüzey alanları ve harika biyoyumlulukları gibi özelliklerinden dolayı oldukça ilgi görmektedir (Li vd. 2009). Bao vd. (2008), TiO_2 nanopartiküllerinin elektrot yüzeyine modifiyesi ve enzimin immobilizasyonu ile glukoz sensörü geliştirmişlerdir. TiO_2 'lerin yüzey alanını arttırmalarından dolayı enzim için daha iyi bir ortam oluşturdıkları gözlemlenmiştir (Jang vd. 2012).

Bu çalışmada, süperoksit radikallerinin hassas, hızlı, spesifik ve kolay bir şekilde saptanabilmesi için SOD biyosensörü geliştirilmiştir. Bu amaçla polimer olarak jelatin ve aljinat (J-AL) kullanılarak enzimin çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ile polimerlere kovalent olarak platin (Pt) elektrot yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Optimizasyon aşamalarında enzim konsantrasyonu, nanopartikül miktarı, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve Jelatin-Aljinat oranları gibi farklı parametreler elektrokimyasal olarak çalışılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Optimizasyon işlemlerinden sonra hazırlanan SOD biyosensörü ksantin ve ksantin oksidaz (KsOD) ile in vitro olarak süperoksit radikali elde edilmiş ve bu süperoksit radikalleri “Gamry Instruments Framework Chronoamperometry” kullanılarak amperometrik olarak tayin edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Elektrokimya

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimi sonucunda gerçekleşen kimyasal ve fiziksel değişimleri inceleyen bilim dalıdır. Elektroanalitik teknikler maddenin yük, potansiyel ve akım gibi elektriksel ve kimyasal parametrelerin arasındaki ilişkiyi inceler. Ölçümler için gerekli sinyalin türüne bağlı olarak kendi içinde potansiyometrik ve potansiyostatik olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Bu iki ana sınıfta da en az iki elektrot ve elektrolit çözeltisi içermektedir. Bu sistem ile elektrot yüzeyi iyonik iletici ve elektronik iletici arasında bağlantı görevi görmektedir. İki elektrottan biri ölçümü yapılacak hedef analite cevap vermektedir. Referans elektrot ise çözelti özelliklerinden bağımsız olarak sabit potansiyele sahiptir.

Metalik bir elektrot (m) çözelti (aq) içerisindeki bir elektron kaynağına konursa elektrot/çözelti ara yüzeyinde bir yük transferi gerçekleşecektir.



Zamanla dengeye ulaşan bu reaksiyon ve elektrot/çözelti ara yüzeyindeki elektron transferi iki faz arasında potansiyel farkına sebep olarak net bir yük ayrımı meydana getirir (Fisher 1996). Elektrot/çözelti ara yüzeyindeki potansiyel düşüşü $\Delta\phi_{m/s}$:

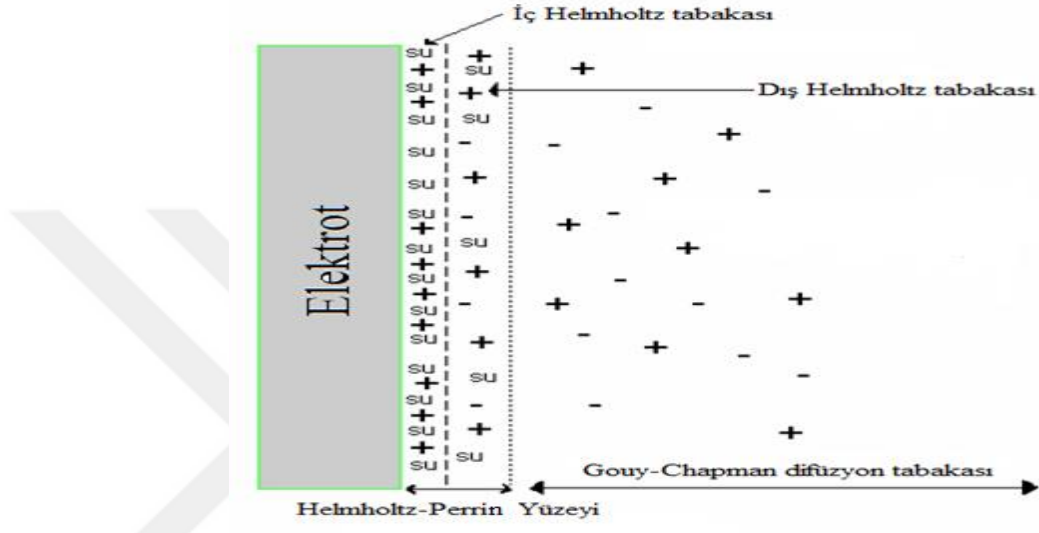
$$\Delta\phi_{m/s} = \phi_m - \phi_s \quad (2.2)$$

ϕ_m metal potansiyeli ve ϕ_s ise çözelti potansiyelidir.

2.1.1 Elektriksel çift tabaka

Elektriksel çift tabakanın ilk modeli 1879 yılında Helmholtz tarafından geliştirildi. Helmholtz elektriksel çift tabakayı, iyonların yüzeyde tek tabaka halinde

adsorplanabileceğini fiziksel bir modele dayandırarak modeli basit bir kondansatöre benzetti. Daha sonra Gouy-Chapman (1910-1913) elektriksel çift tabakanın difüz modeline önemli katkılar yaptı. Gouy-Chapman, çözeltiden tanecik yüzeyine dengeleyici (counter, zıt yüklü) iyonların adsorpsiyonundan dolayı potansiyelin üstel olarak azalacağını ifade etti (Hiemenz vd. 1997).



Şekil 2.1 Elektrot çözelti ara yüzeyi (<https://zaferbayhan.files.wordpress.com>, 2012)

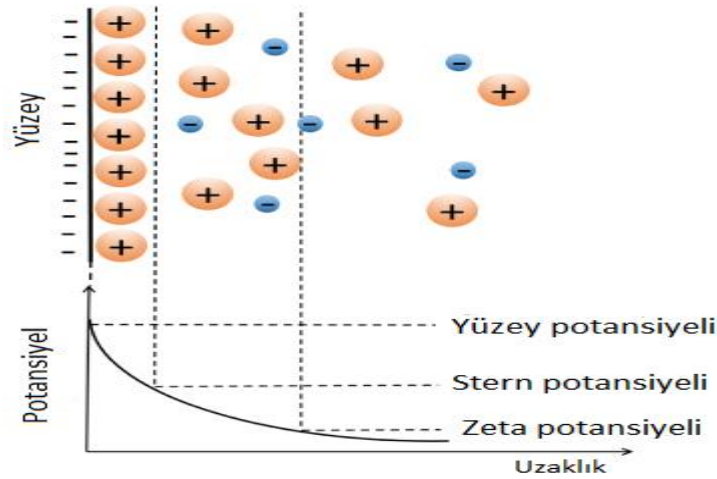
Metal yüzeyinin birinci sırası su molekülleri veya bazı özel iyonlarla kaplıdır ve bu elektrodun hidrasyon tabakasıdır. Genelde anyonlar ve büyük katyonlar çözeltide hidratize halde bulunmazlar.

İkinci sıra hidratlaşma eğilimi daha fazla olan küçük artı yüklü iyonlardan oluşur. Metal yüzeyine adsorplanmış iyonların merkezinden geçirilen düzleme İç Helmholtz Tabakası (IHP), hidratize iyonların merkezinden geçen düzleme ise Dış Helmholtz Tabakası (DHP) denir. Elektriksel ara yüzey kendi içinde iki katmandan oluşur (Şekil 2.1):

- 1) Metal ile dış helmholtz düzlemi arasında kalan yoğun elektriksel çift tabaka
- 2) Dış hemlholtz düzlemi ile çözelti içlerine doğru uzanan ve elektriksel yük yoğunluğu çözelti içine doğru gidildikçe azalan ve sıfıra düşen difüz tabakadır.

Kolloidal taneciklerin yüzeyindeki yük, tanecik yüzeyindeki asidik veya bazik grupların ayrışmasını ya da çözeltiden yüklü bir grubun adsorpsiyonunu içeren çok farklı mekanizmaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Taneciğin yükü, çözeltideki zıt yüklü iyonların eşdeğer miktarları ile dengelenir. Bu zıt yüklü iyonlar difüzyon bulutundaki taneciklerin etrafında toplanırlar. Tanecik yüzeyinin zıt yüklü iyonların difüz tabakası ile kaplanması sonucu oluşan tabakaya elektriksel çift tabaka adı verilir (Hunter vd. 1981). Elektriksel çift tabaka bir yüzeyin yakınındaki elektriksel potansiyel değişimini açıklar ve çözelti ile temasta olan kolloidal tanecikler ve diğer taneciklerin davranışı hakkında birçok bilgi vermektedir (Kelly vd. 1982, Doğan 2001).

Gouy-Chapman-Stern modeli (Şekil 2.3), çözünmüş iyonların boyutlarını ve dahası her bir iyonun su molekülleri ile sarılı olduğunu göz önünde bulundurmaktadır. Bu nedenle iyonlar elektrot yüzeyine yaklaşamamakta ve elektrot yüzeyi ile DHP arasında *Gouy-Chapman* modelinde olduğu kadar belirgin bir potansiyel düşüşü meydana getirememektedirler.

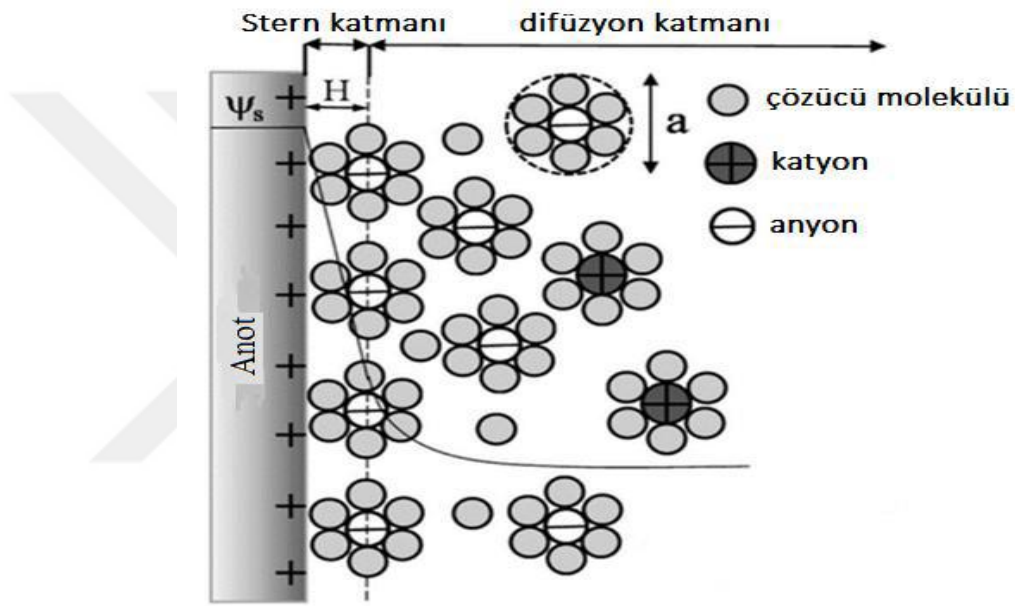


Şekil 2.2 Stern elektriksel çift tabaka modeli (Özbek 2014)

Grahame, çözünemeyen bir iyonun çözünebilen bir iyonla göre elektrot yüzeyine daha fazla yaklaşabileceğini göstererek Stern'in modelini geliştirmiştir (Şekil 2.2). Böylece elektrot ile direkt olarak temasta olan iyonlar spesifik olarak adsorplanır ve İç

Helmholtz Tabakasını oluşturur. Çözünen iyonlar ise non-spesifik olarak adsorplanır ve DHP bölgesini oluşturur.

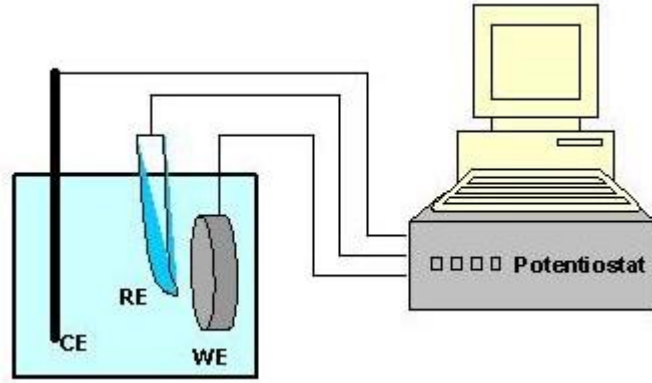
Bochris, Devanathan ve Muller 1963'te suyu çözücü model olarak bir görüş ileri sürmüşlerdir (BDM modeli). Bu su moleküllerinin dipolleri elektrot yüzeylerine yakınlıkları nedeniyle sabitlenmiş durumdadırlar. Bu model elektriksel çift tabakayı tanımlayan model olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.3 Gouy-Chapman-Stern modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti ara yüzeyinde potansiyel düşüşü (Bük 2014)

2.1.2 Dönüşümlü Voltametri (CV)

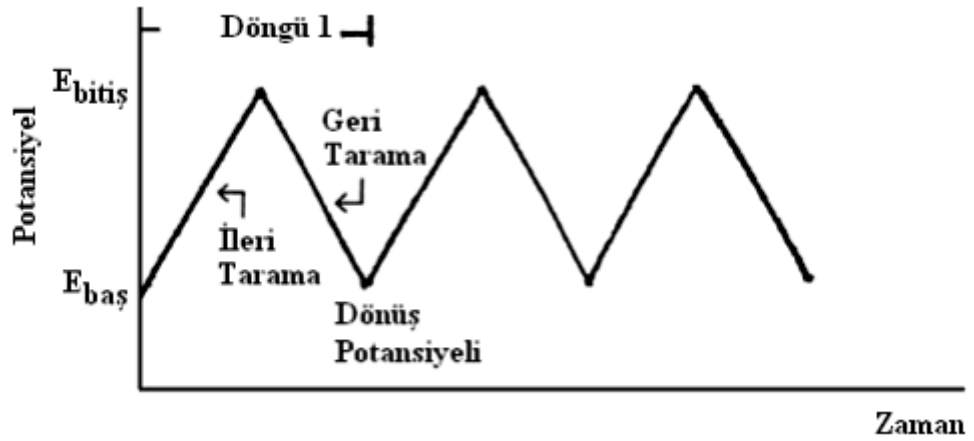
20. yüzyılın ilk çeyrek yılında elektrokimyacılar için elektroanaliz, potansiyometri ve kondüktometri genel olarak araştırma konusu olmuş ve temel ilkeleri saptanmıştır. Polografi ve özellikle voltametri son zamanlarda üzerinde çok çalışılan elektrokimyasal yöntemlerdir. Bu iki yöntemde de analiz koşullarına uyan akım şiddet-gerilim eğrilerinin çizilmesi temel koşuldur. Elde edilen eğrilerin değerlendirilmesi özellikle fizikokimya başta olmak üzere analitik, inorganik, organik ve biyokimyada kullanılmaktadır (Yazıcı 2004, Kardaş 2004).



Şekil 2.4 Dönüşümlü voltametri deney düzeneği (www.andersonmaterials.com, 2015)

Voltametri yönteminde deneyler üçlü elektrot sistemi ile gerçekleştirilmektedir. Bu üçlü elektrot sisteminde yer alan elektrotlardan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen çalışma elektrotudur. Platin, altın, karbon, civa gibi elektrotlar çalışma elektrodu olarak kullanılmaktadır. İkinci elektrot, deney boyunca potansiyeli sabit kalan referans elektrottur. Referans elektrot olarak gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) veya doymuş kalomel elektrotlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrottur. Platin (Pt) elektrotlar genellikle karşıt elektrot olarak kullanılır. Şekil 2.4’de deney düzeneği gösterilmiştir.

Dönüşümlü voltametri yönteminde potansiyel zamanla doğrusal olarak değişmektedir. Potansiyel tarama, başlangıç ve bitiş potansiyeli arasında yapılırsa doğrusal taramalı voltametri (LSV), aynı tarama hızıyla başlangıç potansiyeli yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa dönüşümlü voltametri (CV) adını alır. Dönüşümlü voltametrde (CV) potansiyel-zaman grafiğinde testere dişi şeklinde üçgen dalga şekli oluşur (Şekil 2.5) (Yazıcı 2004, Kardaş 2004).



Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramanın zamanla değişimi (Derkuş 2012)

Voltametri yönteminde akım, çalışma elektrodunda yer alan maddelerin yükseltgenmesi veya indirgenmesi sonucunda oluşur. Anodik akım yükseltgenme sonucunda oluşurken, katodik akım ise indirgenme sonucunda oluşmaktadır. Döngüsel voltametri yöntemi ile elde edilen pik; akım büyüklüğü, elektronegatif madde konsantrasyonu, transfer edilen elektron sayısı, elektrot yüzey alanı ve difüzyon katsayısı gibi etkenler ile değişmektedir. Bu yöntemde çalışma elektroduna potansiyel uygulanarak elektroaktif maddenin yükseltgenme potansiyeline ulaşılmasıyla yükseltgenme başlar. Potansiyeldeki artış ile maddenin yükseltgenme hızının artmasına bağlı olarak akımda hızlı bir artış gözlenir. Yükseltgenme hızı yeterince arttığında akım elektrot yüzeyine difüzyon ile gelen madde miktarından etkilenir. Sürekli olarak difüzyon katmanı kalınlaştığı için difüzyon hızı ve akım zamanla azalmaya başlar.

Dönüşümlü voltametri yönteminde farklı tarama hızlarının uygulanabilmesi bu tekniğin avantajları arasındadır. Böylece tepkime ile oluşan ara ürünlerin kararlılıkları ile ilgili saptamalar yapılabilmektedir. Adsorbsiyon, difüzyon ve elektron aktarım reaksiyonuna etki eden kimyasal reaksiyon olaylarını da belirlemek mümkün olmaktadır.

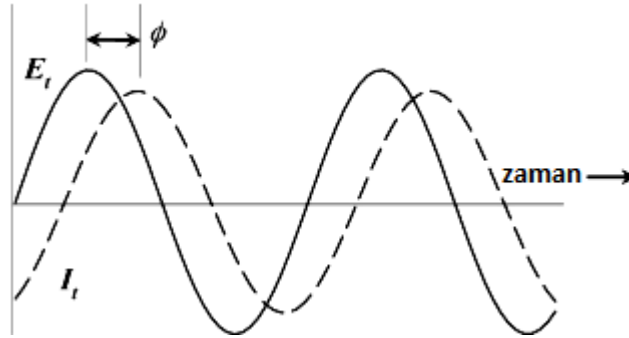
Dönüşümlü voltametri yönteminde farklı redoks problemlerinin elektrokimyasal özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bu redoks problemleri hızlı elektron transferi ile tersinir olarak indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları gerçekleştirir. Ferri/ferro sistemi,

metilen mavisi, dopamin, askorbik asit en çok kullanılan redoks problemleri arasında yer almaktadır.

2.1.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

İlk defa impedans terimi 1886 yılında Oliver Heaviside tarafından dile getirilmiştir (Josephs 1971). İmpedans ölçüm metodları korozyon, katı faz elektrokimyası ve biyoelektrokimya gibi pek çok elektrokimya dalında yaygın olarak kullanılmıştır. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi, frekans düzleminde elektriksel bilgiler sağlayarak karakterizasyon işlemine olanak sağlamaktadır (Bard ve Faulkner 1980, Macdonald 1987).

Elektrokimyasal hücrelerde çift tabakanın kalınlığı uygulanan potansiyel ile orantılı olarak değişmekte ve bu kapasitans değeri alternatif akım spektroskopisi ile ölçülebilmektedir. Bu teknikle elektrokimyasal hücreye sinüsoidal sinyal pertubasyonları uygulanmakta ve bu süreçte elde edilen farklı elektrokimyasal değişimlere karşı değişen akım değeri belirlenmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap (Derkuş 2012)

Elektrokimyasal hücreye AC potansiyeli uygulanması sonucunda hücreden geçen akımın ölçülmesi ile EI bulunur. Uygulanan sinüsoidal pertubasyon E_t :

$$E_t = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (2.3)$$

E_t , t anındaki potansiyel; E_0 , sinyal genliği ve $\omega=2\pi f$ açısal frekanstır. (f frekans, Hertz)
Bu potansiyele karşı oluşan cevap, potansiyel ile aynı frekansta fakat farklı genlik ve faz açısına sahip zaman bağımlı bir AC akım sinyalidir.

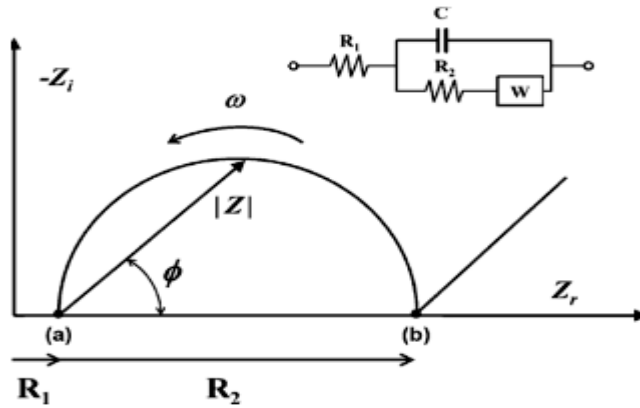
$$I_t = I_0 \cdot \sin(\omega t + \phi) \quad (2.4)$$

Ohm yasasına benzetmeye çalışıldığında sistemin impedansı:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (2.5)$$

Yukarıdaki eşitlikten impedansın genlik (Z_0) ve faz kaymasına (ϕ) bağlı olarak türetildiği görülebilir. Böylece, impedansın bir vektör gibi değerlendirilebilmesine olanak sağlanmış olur.

İmpedimetrik verilerin gösteriminde daha çok Nyquist grafiği kullanılmaktadır. Nyquist grafikteki her bir nokta farklı bir frekans değerini göstermektedir.



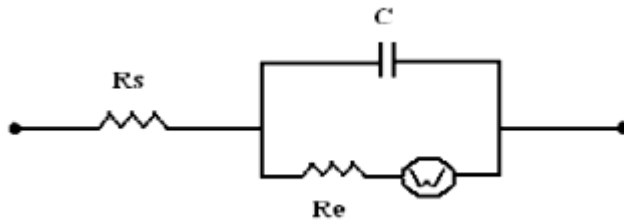
Şekil 2.7 Tipik bir Nyquist impedans spektrum grafiği (Derkuş 2012)

Şekil 2.7’de bir frekans taraması gerçekleştirilmiştir. Bu impedans spektrum profili R_1 direncine (a) ait değerle başlayan ve (b) değeriyle biten, toplamı $R_1 + R_2$ olan bir yarım daire şeklindedir. R_1 değeri çözelti direncini gösterirken R_2 direnci yük transfer direncini (R_{ct}) göstermektedir. İmpedimetrik ölçümlerin ilk anlarında yüksek frekans (düşük enerji) pertübrasyonları ile çözelti direnci ölçülür ve daha sonra tarama bölgesi elektrot yüzeyine doğru kayar. Bu kısımda direnç en fazla olduğu için Nyquist grafiklerde kapasitif direnç en üst değerlerde gözlenir. Frekans azaldıkça direncin artışı gözlenmiş ve bir noktadan sonra impedans eğrisi düz bir eğri halini almıştır. Bu düz eğri Warburg impedansını göstermektedir (Derkuş 2012, Uygun 2012).

$$Z_w = \sigma(\omega)^{-1/2}(1 - j) \quad (2.6)$$

Eşitlik (2.6)’daki ω açısal frekans, σ ise Warburg katsayısıdır.

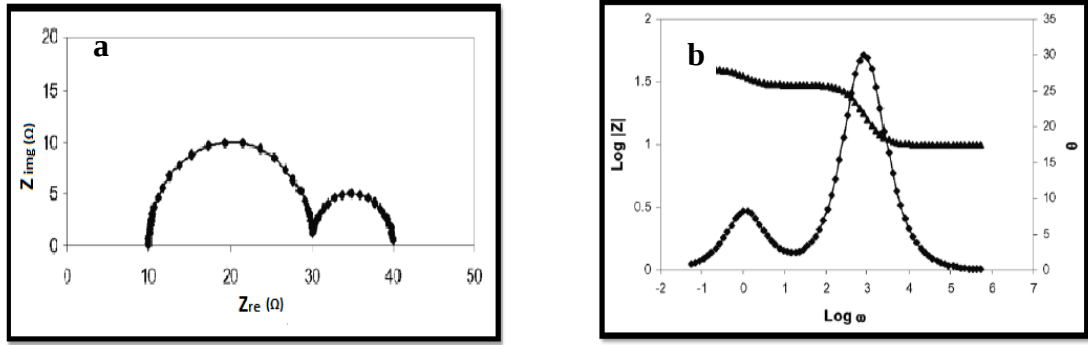
Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde arayüz özellikleri Randles hücresi olarak adlandırılan elektrokimyasal hücrenin devre üzerine oturtulmasıyla incelenmektedir. Şekil 2.8’de gösterilen Randles devresi; paralel bağlanmış kapasitör (C) ile elektrot yüzeyindeki çift tabakanın rezistörüne (R_e) seri olarak bağlanmış çözelti direncinden oluşmaktadır. Warburg impedansı (W) ise elektroda frekans bağımlı difüzyon transportu göstermektedir.



Şekil 2.8 Randles devresi (Derkuş 2012)

Impedans spektrumları genellikle Nyquist ve Bode diyagramları olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.9). Bu iki diyagramda da impedans frekansın bir fonksiyonu şeklindedir. Bu iki

diyagramda yüksek frekanstan düşük frekansa doğru bir tarama gerçekleştirir. Bu sayede başlangıç direncinin bulunmasına olanak sağlar. Hangi diyagramın kullanılacağı deneysel verilere göre belirlenir, veriler dağınık ise Bode, tam yarım daire şeklinde ise Nyquist Diyagramı tercih edilir.



Şekil 2.9 Nyquist ve Bode diyagramları (Uygun 2012)

a.Nyquist diyagramı b.Bode diyagramı

2.1.4 Amperometri

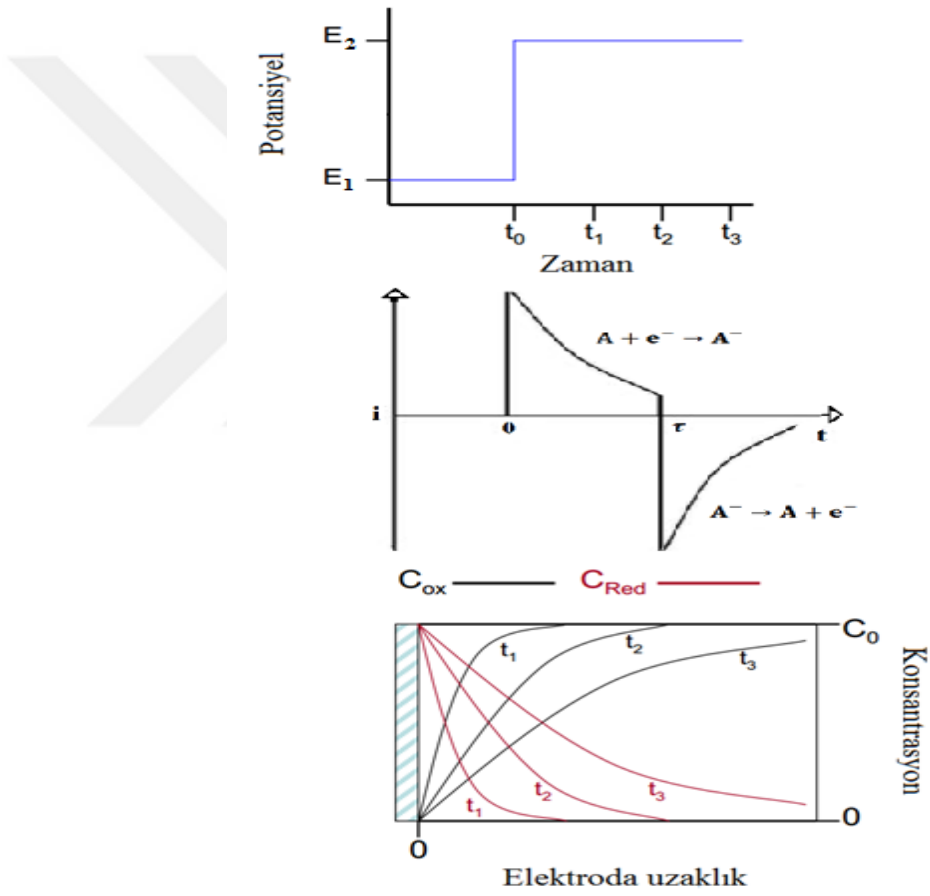
Amperometrik yöntemde analit ölçümü sabit potansiyeldeki akımın ölçülmesine dayanmaktadır. Çalışma elektroduna sabit bir potansiyel uygulandığında elektrotta gerçekleşen elektrokimyasal indirgenme ve yükseltgenme ile akımda artış gerçekleşir (Şekil 2.10). Bu akım değişimi de amperometrinin ölçüm esasını oluşturmaktadır (Labib vd. 2016).

Çalışma elektrodu ve karşıt elektrot arasında sabit bir potansiyel uygulandığında elektrokimyasal reaksiyon sonucunda zamanın karekökü ile azalan bir akım elde edilir. Bu yöntem konoamperometri olarak adlandırılır. Herhangi bir t zamanında elektroda uygulanan potansiyel başlangıç potansiyeline düşürüldüğünde, t süresi içinde elektrot tepkimesi sonucunda oluşan ürünün geri yükseltgenmesi ile anodik akım oluşmasına bağlı olarak kullanılan yöntem ise geri çevirmeli konoamperometri adı verilmektedir.

Bu yöntemin akım-zaman ilişkisi Cottrell eşitliği ile verilir,

$$i_{s,k} = nFAC_y \frac{D_y^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.7)$$

Eşitlikte; i faradik akımı, n elektron sayısını, F Faraday sabitini, D difüzyon katsayısını, C konsantrasyonu, t ise zamanı temsil etmektedir (Bard ve Faulkner 2001).



Şekil 2.10 Kronoamperometrik uyarı ve cevap (Bük 2014)

2.2 Serbest Radikaller

Serbest radikaller molekül veya moleküler parçalar olup atomik ya da moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurlar (Halliwell ve Gutteridge 1999). Bu eşleşmemiş elektron veya elektronlar bu serbest radikallerin yeniden aktifleşmelerini sağlarlar (Valko vd. 2007). Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} gibi geçiş metalleri ve lantanit iyon kompleksleri ortaklanmamış elektron içermelerine rağmen serbest radikaller olarak adlandırılmazlar, fakat serbest radikallerin oluşumlarında önemli rol oynarlar. Serbest radikaller katyon, anyon veya nötral olabilirler.

Serbest radikaller genelde reaktif olduklarından diğer moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girme eğiliminde olup dayanıksız ve yarı ömürleri kısadır. Radikaller yanma, atmosfer kimyası, polimerleşme kimyası, biyokimya gibi birçok kimyasal süreçte önemli rol oynamaktadırlar. Trifenilmetil radikali 1900 yılında Moses Gomberg tarafından tespit edilmiş ilk organik serbest radikal olmuştur.

Serbest radikaller moleküllerin yapısına bağlı olarak oksijen merkezli; süperoksit ($O_2^{\bullet}$), hidroksil ($OH^{\bullet}$), karbon merkezli; triklorometil ($CCl_3^{\bullet}$) ve kükürt merkezli; tiyol ($RS^{\bullet}$) olarak isimlendirilmektedirler (Halliwell ve Chirico 1993; Aust vd. 1993). Ayrıca nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$) ve azot dioksit radikali ($NO_2^{\bullet}$) tek sayıda elektron taşıdıklarından dolayı serbest radikal olarak tanımlanmaktadırlar (Darley-USmar 1996).

Vücut içinde pek çok tipte serbest radikal bulunmaktadır. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri serbest radikal sistemlerinin önemli bileşenleridir. Bu iki serbest radikal türü haricinde atomik hidrojen, birçok ağır geçiş metali (demir, bakır, çinko, manganez), klor ve çevresel atıklar (CO, asbest, ozon) serbest radikal kaynağı gibi davranmaktadırlar (Pala ve Tabakçioğlu 2007).

Serbest radikaller yaşam için gerekli bazı biyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar. Biyolojik sistemde en çok bulunan radikal serbest oksijen radikalleridir. Oksijen canlı sistemleri için hayati olsa da, normal metabolizma

sırasında oluşan bazı reaktif oksijen partikülleri vücut için oldukça zararlıdır (Diplock 1998). Serbest radikallerdeki eşleşmemiş elektronlar protein, lipid ve DNA gibi biyolojik materyallere zarar vermektedirler. Biyolojik sistemde, diğer moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren moleküllere “reaktif oksijen partikülü” denilmektedir (Halliwell 1991a). ROP’ların yararlı etkileri, zararlı durumlara karşı hücrel yanıtarda fizyolojik roller içermeleridir. Örneğin; bulaşıcı hastalıklara karşı savunmada ve hücrel sinyal sistemindeki fonksiyonları gibidir. Bir diğer yararlı etkisi de, düşük konsantrasyonlardaki ROP mitojenik yanıtı indüklemeleridir. Ayrıca in vivo homeostaziste de hayati bir rol üstlenmektedirler (Salvemini ve Cuzzocrea 2002, Victor vd. 2004, Zweier ve Talukder 2006, Sakaguchi ve Furusawa 2006). Yüksek konsantrasyonlarda ise ROP hücre yapısına, lipidlere ve membranlara, proteinler ve nükleik asitlere hasar veren önemli mediyatörler olabilirler (Poli vd 2004). Bunun sonucu olarak da yaşa bağımlı kanser, arteriyoskleroz, artrit, nörodejeneratif gibi hastalıklarda kilit rol oynadıkları öngörülmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Bazı serbest radikal oluşum kaynakları;

- UV radyasyon, X-ışınları, gama ışınları, mikrodalga ısıma
- Metal katalizli reaksiyonlar
- Hava kirletici olan atmosferdeki oksijensiz radikaller
- Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerini üreten makrofaj ve nötrofili başlatan inflamasyon
- Mitokondri katalizli elektron taşıma reaksiyonları, yan ürün olan oksijensiz radikaller
- Makrofaj, trombosit, arşidonik asit ve düz kas hücreleri metabolizmasıyla oluşan reaktif oksijen türleri
- Kimyasallarla etkileşimler, araba egzoz gazları, puro ve sigara dumanları
- Pişirme sürecindeki organik maddelerin yanması, orman yangınları, volkanik aktiviteler
- Endüstriyel atıklar, artık kimyasallar, alkol alımı, bazı ilaçlar, asbest, bazı pestisit ve herbisitler, bazı metal iyonları, fungal toksin ve ksenobiyotikler (Bano vd. 2012)

Reaktif oksijen türleri, vücutta lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, myeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi birçok enzim tarafından üretilmektedir (Meydani 2001). Reaktif oksijen türleri için çizelge 2.1'deki gibi bir sınıflandırma yapılmaktadır.

Çizelge 2.1 Reaktif oksijen türleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar	Singlet Oksijen
Süperoksit radikal ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Oksijenin biradikal doğasından dolayı radikal özelliği göstermektedir.
Hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$)	Lipid hidroperoksit ($ROOH$)	
Alkoksil radikal ($RO^{\bullet}$)	Hipoklorik asit ($HOCl$)	
Peroksil radikal ($ROO^{\bullet}$)		

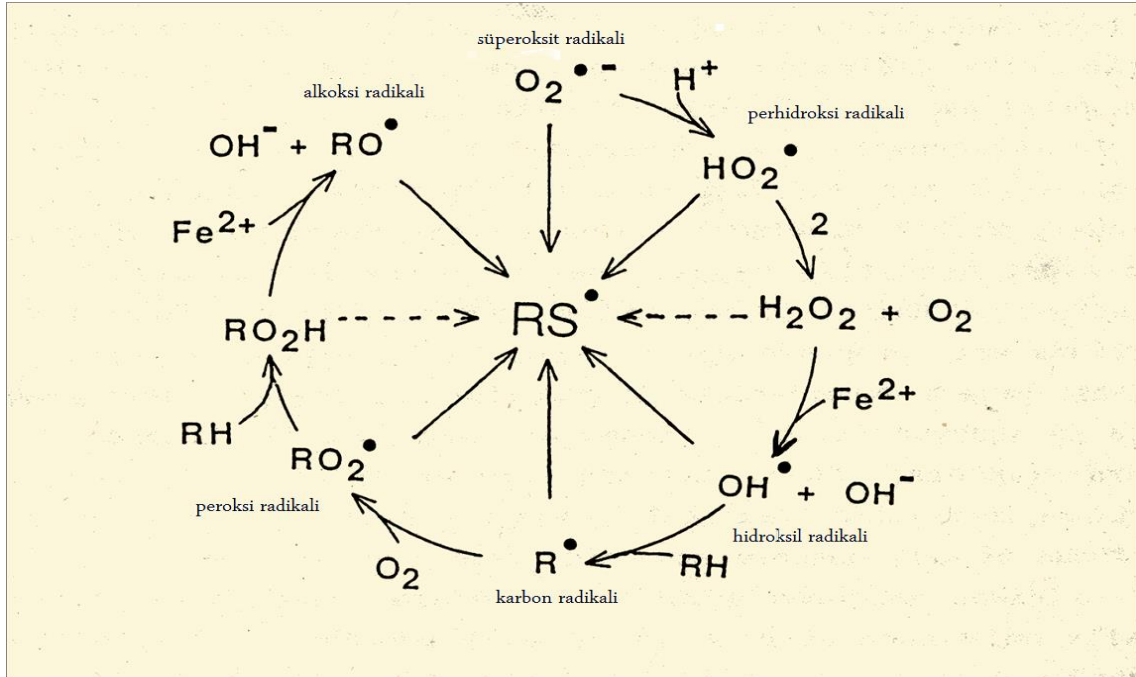
Moleküler oksijenin (O_2) suya indirgenmesi sırasında ortaya çıkan ROP'lar, hücrelerin sitokrom komplekslerinde meydana gelmektedir (Onar 1990). ROP'lar, çeşitli serbest radikallerin oluşturduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve

- karbon merkezli organik radikaller ($R^{\bullet}$),
- alkoksil radikalleri ($RO^{\bullet}$),
- peroksit radikalleri ($ROO^{\bullet}$),
- tiyil radikalleri ($RS^{\bullet}$),
- sülfenil radikalleri ($RSO^{\bullet}$),
- tiyil peroksit radikalleri ($RSO_2^{\bullet}$)

gibi serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Şekil 2.11).

ROP'lar endojen ve ekzojen maddeler olarak üretilirler. Endojen kaynakları, mitokondri, sitokrom p450 metabolizması, peroksizom ve inflamasyona yol açan hücre aktivasyonudur (Inoue vd. 2003). Mitokondrilerin önemli miktarda H_2O_2 ürettikleri uzun süredir bilinmektedir. Süperoksitlerin mitokondri tarafından üretildikleri 40 yıl önce Loschen ve Flohe (1971) tarafından ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Mitokondride oluşan süperoksit radikallerinin saptanması zordur. Bunun ise büyük olasılıkla yüksek SOD aktivitesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Ubisemikinonlar mitokondriyel

membranlarda oksijenin ana indirgeyicisidirler. Mitokondri mg protein başına dakikada yaklaşık 2-3 nmol süperoksit üretmektedir, her yerde bulunmaları canlı organizmalarda bu radikallerin en önemli fizyolojik kaynakları olduğunu belirtir (Inoue vd. 2003). Serbest radikal üretimi için mitokondri önemli bölümdür. Ayrıca antioksidanca zengindirler, böylece membranlarının iki tarafında da organeldeki oksidatif stresin minimize edilmesini sağlarlar (Cadenas ve Davies 2000). Mitokondriyal iç zarın iki tarafındaki süperoksit radikalleri etkili biçimde detoksifikasyonu sağlayarak ilk önce hidrojen peroksit sonrada suya dönüşümü gerçekleştirir (Cu-Zn SOD zarlar arası boşlukta lokalizedir ve Mn SOD matrikste lokalize olmuştur). Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları; mitokondriyal elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyararla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır. Çizelge 2.2’de serbest oksijen partiküllerinin oluşum kaynakları gösterilmiştir. Normal metabolizmanın haricinde hiperoksi, inflamasyon ve radyasyon serbest radikal oluşumunu hızlandırmaktadır (Kalyanaraman vd. 1980). Ayrıca, reaktif oksijen türleri yüksek oksijen basıncı, ozon, azotdioksit, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların da etkisiyle artmaktadır.



Şekil 2.11 Reaktif oksijen partiküllerinin oluşumu (Kocabay 2011)

Çizelge 2.2 Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları

I. Normal biyolojik işlemler	II. Oksidatif stres yapıcı durumlar	III. Yaşlanma süreci
1. Oksijenli solunum 2. Katabolik ve anabolik işlemler	1. İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksikasyon 2. Ksenobiyotik maddelerin etkisi a) İn hale edilenler b) Alışkanlık yapan maddeler c) İlaçlar 3. Oksidan enzimler a) Ksantin oksidaz b) İndolin dioksijenaz c) Triptofan dioksijenaz d) Galaktoz oksidaz e) Siklooksijenaz f) Lipooksijenaz, g) Monoamino oksidaz 4. Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu 5. Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil, endotelyal hücreler) 6. Uzun süreli metabolik hastalıklar 7. Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara	1. Yaş ilerledikçe, vücudun ROP üretimi artar.

Reaktif oksijen partiküllerinin organizma için yararlı görevlerinin olmasının yanı sıra, normal metabolizma sırasında veya çeşitli dış etkenlerle oluşan serbest radikal türleri hücre fonksiyonlarına zarar vermelerinden dolayı bu oksijen türlerinin oluşumunun ve aktivitesinin kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu reaktif türlerin etkileri vücudun doğal savunma sistemi tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Ayrıca bu savunma mekanizmasının diyetle alınacak antioksidan besinlerle desteklenmesi gerekmektedir. Çizelge 2.3’de bazı ROP’ları nötralize eden antioksidanlar gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Bazı ROP’ları nötralize eden antioksidanlar (Bano vd. 2012)

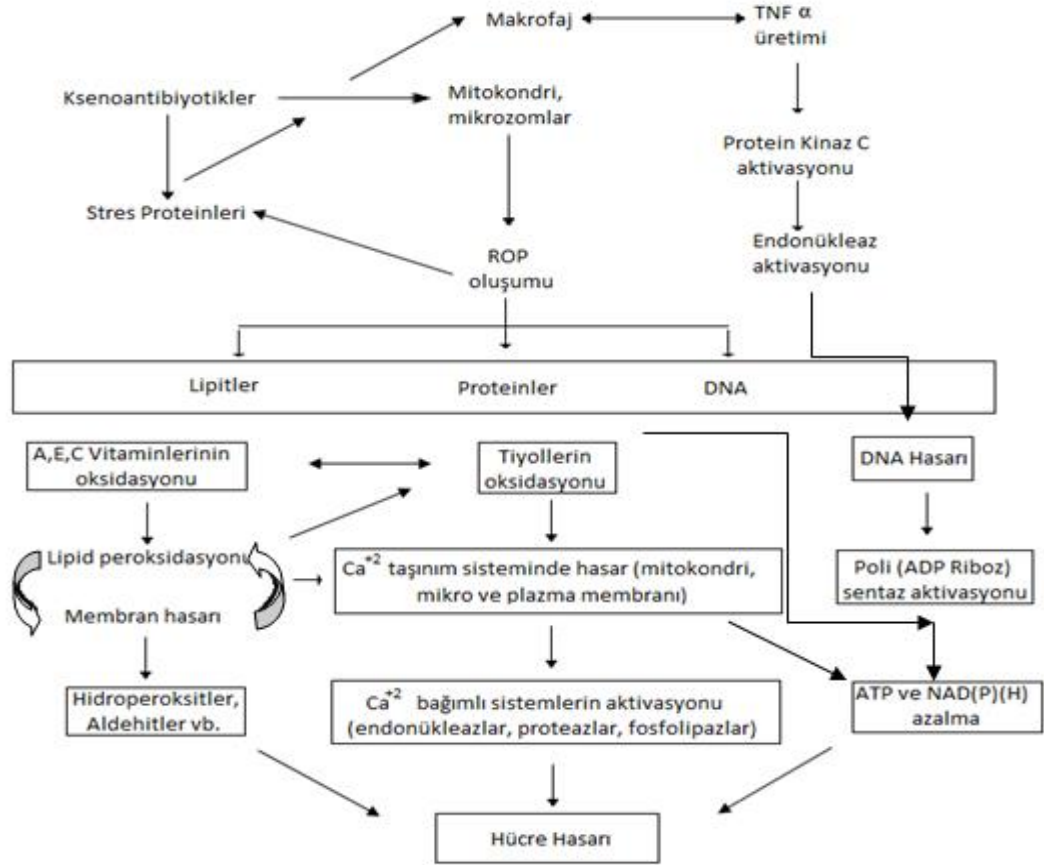
Reaktif Oksijen Partikülleri	Nötralize Edici Antioksidanlar
Lipit peroksidazlar	Beta-karoten, E vitamini, ubikinon
Süperoksit radikali	C vitamini, glutatyon
Hidrojen peroksit	C vitamini, E vitamini, glutatyon
Hidroksil radikali	Lipoik asit, C vitamini, glutatyon



Şekil 2.12 Antioksidanların serbest radikalleri nötrleştirme (http://healthandwealthsuccess.blogspot.com.tr, 2015)

Aerobik solunum sırasında oluşan ROP hasarlarına karşı organizmada antioksidan savunma sistemi ikiye ayrılır. Enzimatik sistemde; katalaz, SOD ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler rol oynarken; non-enzimatik sistemde ise A, E, C gibi vitaminler, metal bağlayan proteinler ile glutatyon gibi tiyol içeren bileşikler rol oynamaktadır.

Biyolojik sistemlerde ROP'ların oluşumu, savunma mekanizması için yararlı olduğu gibi, bazı biyokimyasal işlevlerin yerine getirilmesinde, enzimatik sistemlerin etki mekanizmaları ve denetiminde de yarar sağlarken; proteinler, nükleik asitler, DNA, karbohidratlar ve lipidler üzerine atak yapmaları nedeniyle birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadırlar (Şekil 2.13, Stohs ve Bagchi 1995).



Şekil 2.13 ROP ve doku hasarı arasındaki ilişki (Stohs ve Bagchi 1995)

Oksidanların, belirli bir düzeyin üzerinde oluşması ya da antioksidanların yetersiz kaldığı oksidatif stres durumunda ROP'lar organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapısını bozarak meydana getirdikleri zararlı etkiler aşağıdaki şekildedir:

- Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,

- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz gibi enzimleri aktive ederler,
- Hücrenin potasyum kaybını artırır,
- Trombosit agregasyonunu artırır,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırır,
- Hücre dışındaki kollojen doku bileşenlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (Halliwell 1991b).

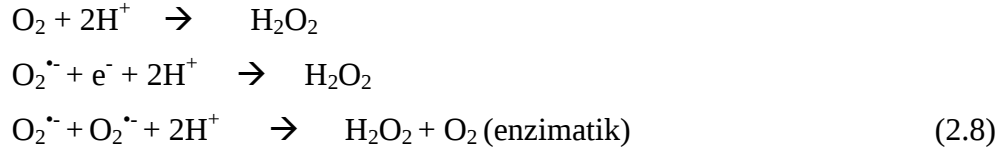
Lipitler serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerler. Bu süreç lipit peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettirebilen bir zincir reaksiyon biçimindedir ve oldukça zararlıdır. Lipit peroksidasyonu sonucunda da zarların geçirgenlikleri artmaktadır.

Proteinler ise lipitlere göre daha az hassastırlar. Etkilenme dereceleri ise aminoasit bileşenlerine bağlıdır. Serbest radikallerin etkileri sonucunda proteinlerin tersiyer yapıları bozular ve fonksiyonlarını kaybederler. Oksihemoglobin de süperoksit radikalleriyle reaksiyona girerek methemoglobini oluşturur.

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek mutasyona ve ölüme neden olurlar. Süperoksitlere maruz bırakılan DNA'lar ise antijenik özellik gösterirler.

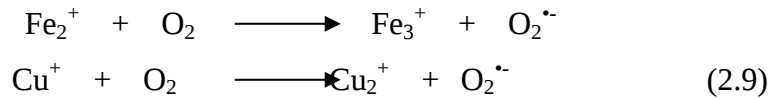
Çoğu enziminde katalitik döngü sırasında serbest radikaller oluşur. Ksantin, ksantin oksidaz ile oksijenli ortamda ürik asite dönüşür ve moleküler oksijenlerde hidrojen peroksit indirgenirler. Ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi hasarlara ayrıca hepatit ve beyin tümörü vakalarında serumdaki KsOD miktarlarının arttığı belirtilmiştir (Lavelli 2000). İskemi durumunda oksijen miktarı az olduğundan önemli bir hasar olmamaktadır. Ancak reperfüzyon sırasında oksijen miktarı normale dönünce yüksek miktarlarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşarak iskemi/reperfüzyon hasarı oluşur.

Metal iyonlarıyla $\text{OH}^\bullet$ oluşumuna neden olan H_2O_2 'de radikal olarak nitelendirilir (Feldman vd. 1993, Marletta 1993, 1994, Auroma 1994, Halliwell 1997). Hidrojen peroksit, iki elektron ile O_2 'nin indirgenmesi sonucunda oluşan, biyolojik sistemlerde sıklıkla $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin bulunduğu ortamlarda kendiliğinden ve yavaş bir şekilde ya da SOD etkisiyle hızlı bir şekilde oluşur.



D-amino asit oksidaz, glukoz oksidaz, ürat oksidaz gibi bir çok enzim de O_2 'e iki elektron vererek H_2O_2 oluşturabilir. Ortaklanmamış elektronu olmayan H_2O_2 hem zayıf bir yükseltgen hem de zayıf bir indirgendir. Ortamda geçiş metalleri yoksa diğer ROP'lardan farklı olarak membranlardan kolaylıkla geçebilir. Aerobik hücrelerde H_2O_2 ; katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer peroksidazlar gibi antioksidan enzimlerle parçalanmaktadır (Halliwell 1997).

Oksijenden üretilen bu radikaller canlı sistemdeki en önemli sınıfı oluştururlar. Moleküler oksijen özgün bir elektron dizilimine sahiptir. Moleküler oksijene bir elektron ilave edilmesiyle süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) formuna geçerler (Miller vd 1990). Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da serbest radikaller oluşabilmektedir.



Süperoksit radikallerinin bir başka serbest radikal olan nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$) ile reaksiyona girmeleri sonucunda peroksinitrit ($\text{OONO}^\bullet$) meydana gelir. Peroksinitritlerde, azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$), hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik maddelere dönüşebilirler.

SOD'lar süperoksit anyonlarını hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürerek zararlarını azaltmaktadırlar. Bu olayda enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn önemli bir rol üstlenmektedir. SOD'lar aktif merkezlerindeki metallere bağlı olarak farklı gruplara ayrılırlar (manganez (Mn), demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko (Zn)). Bitkilerde hepsi farklı alanlarda konumlanmaktadırlar. Örneğin; Cu/Zn SOD ökaryotik hücrelerde genelde sitozol veya kloroplastta bulunurken MnSOD mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda bulunur. Dimerik FeSOD kloroplastta bulunur. SOD'lar süperoksitlerle oluşan oksidatif stresin toksik etkilerinin detoksifikasyonu ile oksijen ve hidrojen peroksitide dönüştürülmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Salin ve Bridges 1980, Del Rio vd. 1983, Droillard ve Paulin 1990, Van Camp vd. 1994, Fridovich 1995). CuZnSOD histidince zengin ortamda aktif merkezlerinde iki farklı metal içeren tek sınıftır. Bakır iyonu proteinin aktivitesinden sorumludur ve çinko iyonu ise protein yapısının ve elektrostatik kararlılığın korunmasında rol oynamaktadır (Konecny vd. 1999). SOD enzimleri H₂O₂ temizleyen katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerle konjuge olarak çalışırlar (Michiels vd. 1994). Çeşitli serbest radikallerin üretimi redoks aktif metallerin katılımıyla yakından ilişkilidir (Valko vd. 2005).

Genel olarak, canlı organizmalardaki ROP'ların ölçümü önemli analitik zorluklar içermektedir. Çoğu ROP yüksek reaktivlikte ve kısa ömürlüdür ve bu yüzden biyolojik matris komplekslerinde saptanması zordur (White vd. 1994, Amatore vd. 2000, Finkel ve Holbrook 2000). Süperoksit anyonlarını direkt olarak saptamak için birkaç metot (elektron paramagnetik direnç) vardır ve çoğu teknik direkt olmayan metotlar ile (absorbans veya floresans ölçümleri) gerçekleştirilmektedir (Kalyanaraman vd. 2012).

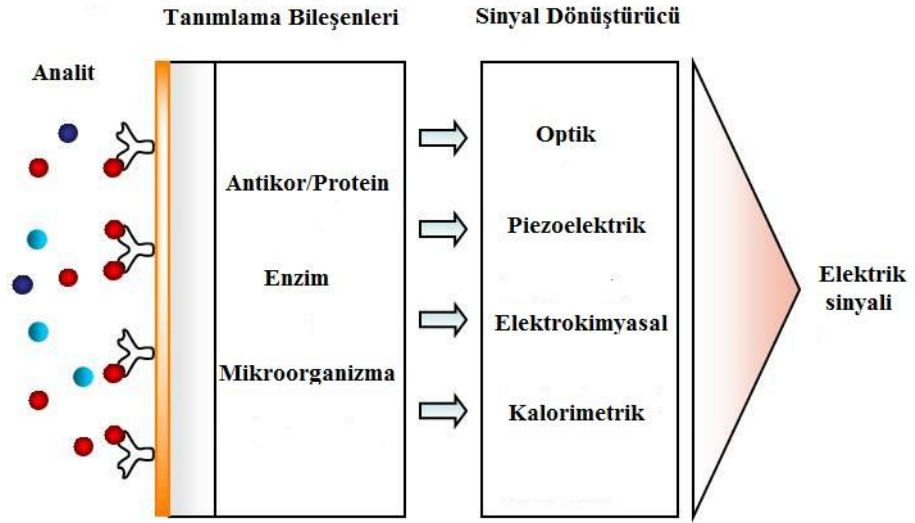
Bugüne kadar süperoksit tayini için kullanılan yöntemler; elektron spin rezonansı (ESR), spektrofotometri, florometri, kemilüminesans ve elektrokimyasal metotlardır (Ohayashi vd. 1999, Barbacanne vd. 2000, Tarpey ve Fridovich 2001, Tian vd. 2002a,b, Münzel vd. 2002, Tang vd. 2002, Yao vd. 2002, Di vd. 2004).

2.3 Biyosensörler

Biyosensörler 1960’larda Clark ve Lyons öncülüğünde ortaya çıkmıştır. Enzim bazlı, doku bazlı, immunosensör, DNA, termal ve piezoelektrik biyosensörler gibi çeşitli türleri kullanılmıştır. İlk enzim biyosensörü 1967’de Updike ve Hicks tarafından rapor edilmiştir (Venugopal 2002, Wang 2008, Akyılmaz vd. 2010). İlk biyosensörün geliştirilmesinden günümüze biyosensörler sağlık, gıda, su, kalite kontrol, çevresel incelemeler gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Biyosensörler biyolojik tanımlama elementleri (enzim, antikor, DNA, mikroorganizma) içeren fizikokimyasal sinyal ileticisine entegre edilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Son 20 yılda biyosensör alanındaki gelişmeler biyosensörlerin ucuz, hızlı, basit, hassas özelliklerinden dolayı örnek bileşenlerinin gerçek zamanlı kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilebilmesi sayesinde önemli ölçüde artış göstermiştir. Biyosensörlerin tarım, tıp, gıda, güvenlik, çevresel ve endüstriyel birçok alanda oldukça önemli analitik bir rol oynayacağı düşünülmektedir (Luong vd. 2008).

Biyosensörler, 3 ana bileşenden oluşmaktadır; biyoreseptör, dönüştürücü ve sinyal işleme sistemi (Şekil 2.14). Biyoreseptörler spesifik hedef analiti saptayabilen immobilize biyokomponenttir. Biyokomponent olarak genellikle enzim, antikor, nükleik asit ve hücreler kullanılmaktadır. Analit ile biyoreseptör arasındaki reaksiyon sonucunda ürün oluşumu, ısı açığa çıkması, elektronların akışı ve pH ya da kütle değişimi gibi kimyasal değişimler meydana gelmektedir. Bu biyokimyasal değişimlerden elde edilen sinyaller dönüştürücüler ile elektriksel sinyale dönüştürülür (Perumal ve Hashim 2014).



Şekil 2.14 Biyosensörün şematik gösterimi (Lowe 1985)

Hızla gelişmekte olan biyosensörler günümüzde sağlık alanı başta olmak üzere; çevre analizlerinde, askeri sahada, gıda, farmasötik ve kimya endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Biyosensörlerin yüksek spesifiklik ve geniş konsantrasyon aralığında tayine olanak sağlayan yapıları biyosensörlerin avantajları arasında yer almaktadır. Biyomoleküllerin pH, sıcaklık, gibi ortam koşullarından etkilenmesi sonucunda kullanım ömürlerinin azalması ise dezavantaj olarak görülmektedir (Telefoncu 1999).

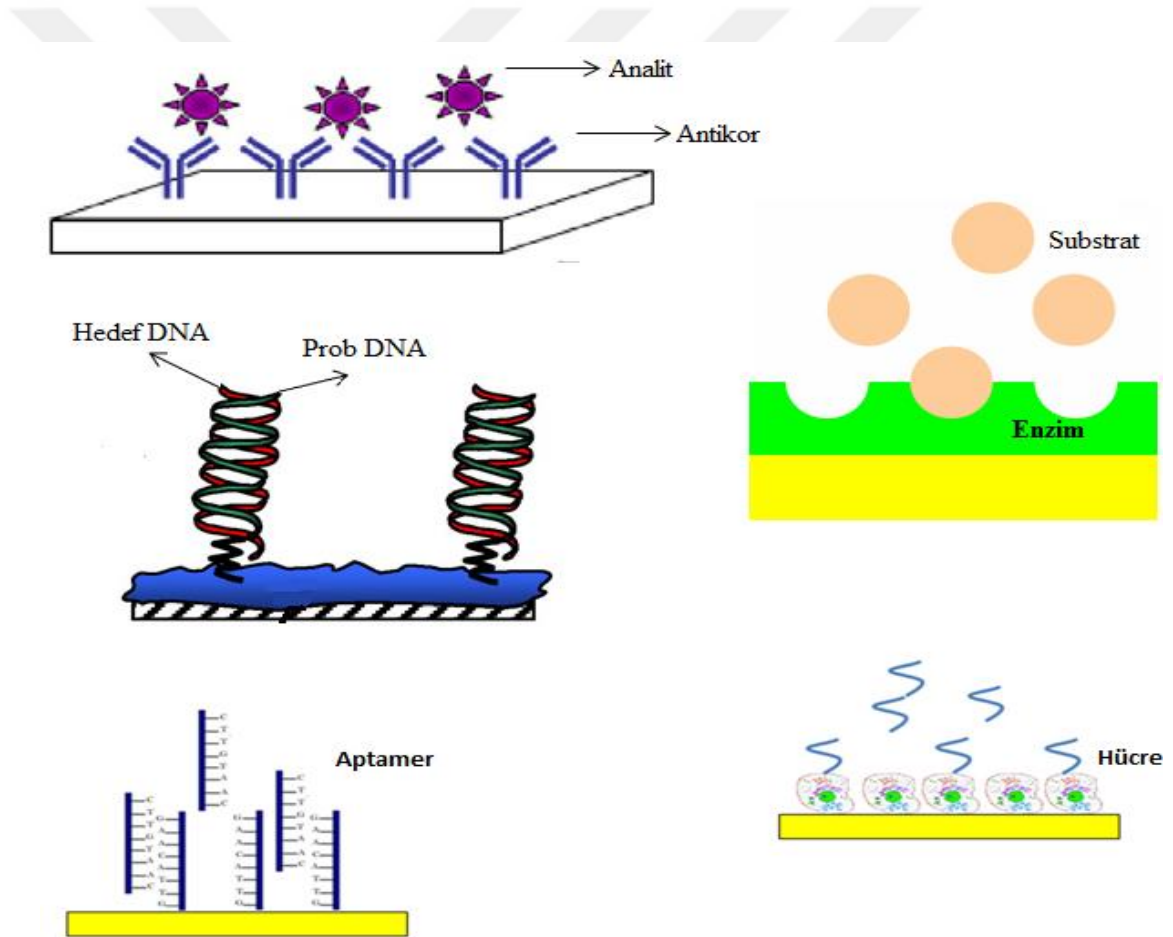
2.3.1 Biyoreseptörler

Biyoreseptörler biyosensörlerdeki spesifikliğin temelini oluşturmaktadır. Tespit edilecek analitin ilgili kısımlarının sensöre bağlanmasını sağlar. Biyoreseptörler; enzim, antikor/antijen, DNA/RNA, aptamer ve hücre olabilir. En yaygın kullanılan biyoreseptörler enzimler ve antikorlardır. Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör türüne göre, biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı olmak üzere iki şekilde gruplandırılabilir. Biyokatalitik reseptörlerde enzim yüzeyinde bulunan analitin makromoleküller tarafından katalizlenerek reaksiyona girmesi sağlanır. Substrat özelliği gösteren analitin bu yolla sürekli tüketimi sağlanmaktadır. En yaygın kullanılan biyokatalitik biyoreseptörlere enzimler, hücreler ve dokular örnek gösterilebilir. Biyoafinite temelli biyosensörlerde ise, biyosensörün biyolojik yapısında bulunan makromoleküller ile

analitin etkileşmesi temeline dayanır. (Thevenot vd. 1999). Biyoafinite esaslı biyosensörlerde en çok kullanılan biyoreseptörler antikorlar/antijenlerdir.

2.3.1.1 Biyosensörlerin biyoreseptörlere göre sınıflandırılması

Biyosensörlerin ayırt edici özelliğe sahip olmalarını sağlayan biyoreseptörlerdir. Biyoreseptörler tanımlama sistemi ile hedef analiti birleştirdiğinden dolayı hedef analite karşı hassas ve seçici olması gerekir. Biyosensörler kullandıkları biyolojik sinyalleme mekanizmalarına göre 5 ana kısma ayrılabilirler (Şekil 2.15, Perumal ve Hashim 2014).



Şekil 2.15 Çeşitli biyolojik sinyal mekanizmalarına göre biyosensör türleri

2.3.1.1.1 Enzim temelli biyosensörler

Enzimler substratlarını spesifik olarak tanıyan biyokatalizörlerdir. Bu özellikleri sayesinde enzimler analitik cihazların gelişmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Enzim temelli biyosensörlerinin çalışma prensibi spesifik tanımlamaya dayanmaktadır. Bağlanma sonucunda oluşan sinyaller analitin konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan sinyallerde ileticiler tarafından akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, elektrokimyasal ışık absorpsiyonu gibi farklı yanıtlara dönüştürülmektedir (Mulchandani 1998). Enzimatik biyosensörlerin avantajları yüksek seçicilik, hızlı yanıt, basit oluşumlu cihazlar ve düşük maliyetleridir (Hall 2002). Dezavantajları ise çevresel koşullara hassasiyet, sınırlı ömürleri ve örnek bileşimindeki maddelerle inhibisyonlarıdır. Enzimlerin spesifik katalitik reaksiyonları çok düşük algılama limitlerine olanak sağlamaktadır. Enzim – substrat etkileşimleri enzim temelli biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır. Enzimler substrat konsantrasyonu, sıcaklık, inhibitör ve pH gibi faktörden etkilenebilir. Enzim bazlı biyosensörlerin algılama limitinin detaylandırılmasında Michaelis–Menten denklemi kullanılmaktadır. Glukoz oksidaz (GOD) temelli biyosensörler literatürlerde en çok yer alan enzim bazlı biyosensörlerdir. Ayrıca kalp hastalıkları, parkinson, kanser gibi hastalıkların belirlenmesinde Superoksit Dismutaz (SOD) temelli biyosensörler kullanılmaktadır (Ohsaka vd. 1995, Tian vd. 2004, Di vd. 2004, Wang vd. 2012). Biyosensörlerde elektrokimyasal temelli metodlar, özellikle $O_2^{\cdot-}$ radikalinin tayini için kullanılmaktadır. Bu yöntem SOD ya da sitokrom c (sit-c)'ye dayanmaktadır. SOD yönteminde, H_2O_2 oluşturmak için SOD tarafından $O_2^{\cdot-}$ 'nin spesifik dismutasyonu ile elektrot yüzeyinde H_2O_2 'in elektrooksidasyonunun tespitine dayanmaktadır. Sitokrom-c yönteminde ise, altın elektrot üzerine immobilize edilmiş sit-c'nin $O_2^{\cdot-}$ tarafından kullanılması ve ardından elektrot yüzeyinde gerçekleşen proteinin reoksidasyonuna dayanmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ çözeltide genellikle KsOD/hipoksantin (HKs) sistemi kullanılarak üretilmektedir (Cortina-Puig vd. 2009).

Son çalışmalar enzim esaslı biyosensörlerin kolesterolün tayininde, gıda ve çevre denetiminde, ağır metallerin ve zirai ilaçların tayininde de kullanılabildiğini göstermiştir (Perumal ve Hashim 2014).

2.3.1.1.2 İmmünosensörler

İmmünosensörler, uygun antijen ile antikorun kompleks oluşumu esasına dayanmaktadır. Antikor-antijen reaksiyonları oldukça spesifiktir (Parkinson ve Pejicic 2005).

İlk antikor temelli biyosensörün geliştirilmesinden sonra tıbbi teşhis için antijen-antikor temeline dayanan biyosensörlerin geliştirilmesi için çabalar harcanmıştır (Orazio 2011). Bir antikor, iki ağır zincir (H) ve iki hafif zincirden (L) oluşan “Y” şeklinde bir immüoglobüldür (Ig). Her zincirde sabit ve değişken bir parçası bulunmaktadır. Değişken kısım antijene özgü olup uyumlu bir antijene bağlanarak spesifik ve seçici olmaktadır. İmmünosensörlerde kullanılan tanımlama metotlarında optik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Elektrokimyasal yöntemler ile hızlı, basit ve ekonomik algılama sağlanmaktadır. Bakteri ve patojenlerin algılaması için geliştirilen immünosensörlerde ise nokta analizleri (point-of-care) olarak adlandırılan ölçüm testlerinde uygulanabilir olması nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir (Perumal ve Hashim 2014). Hassasiyet ve seçicilik gibi özellikler tümör spesifik immünosensörlerin kanserin erken safhalarında tanı aracı olarak ümit verici bir hal almasını sağlamıştır (Ushaa vd. 2011).

2.3.1.1.3 Genosensörler

Çift sarmal DNA (dsDNA) zincirini oluşturan tek sarmal DNA (ssDNA) zincirleri arasında oluşan spesifik affinite reaksiyonu genosensörlerin temelini oluşturmaktadır. DNA biyosensörlerinin geliştirilmesi ile elektroforetik ayrımların eşleşmesi ve radyo izotropik gibi oldukça maliyetli ve zaman alan metodları geride bırakmıştır (Perumal ve Hashim 2014). DNA biyosensörlerin çalışma prensibi dsDNA oluşturmak için iki tek sarmal nükleik asit dizisi arasında kararlı bir hidrojen bağı oluşturan eşlenik ssDNA'nın tanımlanmasına dayalıdır. Bu nedenle hedef baz dizisinin eşleniği olan ssDNA immobilize formda prob olarak kullanılmaktadır. Hedefin proba maruz kalması ile dsDNA oluşturmak üzere komplementer ssDNA hibritlerşir ve bu da dönüştürücünün

sinyali elektriksel sinyale dönüştürmesine olanak sağlayan biyokimyasal reaksiyonun oluşmasını sağlar. Çalışmalarda ssDNA'nın algılama yüzeyine immobilizasyonunun yapılabilmesi için tiyol ve biotin gibi bağlayıcılara gereksinim duyulabileceği belirtilmiştir. (Cagnin vd. 2009, Lazerges vd. 2012).

DNA sensörleri kullanılan yöntemlerine göre iki farklı grupta incelenmektedir. Bunlar; etiketlenmiş hedef DNA esaslı ve etiketlenmeden yapılan yöntemlerdir (Bonanni ve del Valle 2010). Etiketleme yönteminde hibridizasyonun saptanması için floresent boyalar (Puinno vd. 1995, Fan vd. 2003), redoks aktif enzimler (Lermo vd. 2007, Diaz-Gonzalez vd. 2008), manyetik partiküller (Ferreira vd. 2006) veya farklı tür nanopartiküller (Wang vd. 2001, Wang vd. 2002) kullanılmaktadır. Etiketsiz yaklaşımda ise DNA bazlarının direkt oksidasyonu sonucu oluşan sinyalin ölçümü esasına dayanmaktadır (Thorp 1998, Wang ve Kawde 2002).

2.3.1.1.4 Hücre temelli biyosensörler

Hücre temelli biyosensörlerde biyospesifik algı elementi olarak canlı hücreler kullanılmaktadır. Stimulus ve hücre arasındaki etkileşime cevap üretmektedir. Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar, spesifik molekülleri ya da tüm çevresel durumları algılamak için kullanılabilir. Hücre temelli biyosensörlerin birçok avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır. Bu biyosensörün algılama limiti hücrenin canlılığını sürdürebildiği doğal çevre koşulları tarafından belirlenmektedir. Ancak en büyük kısıtlama sterilizasyon, yaşam süresi ve biyoyumrluluk gibi çok çeşitli koşullara bağlı olan hücre stabilitesidir. Hücre bazlı sensörün başarısını etkileyen diğer bir konu ise seçiciliktir. Bütün bir hücrenin multireseptör davranışı mikrobiyal sensörün zayıf seçiciliğe sahip olmasına neden olmaktadır. Hücre bazlı biyosensörler enzim bazlı biyosensörlere göre çözünen madde inhibisyonuna karşı daha az hassas, optimum pH ve sıcaklığın altında daha toleranslıdır. Enzim bazlı biyosensörlere göre daha uzun bir yaşam süresi sağlayabilmesi ve aktif hücrelerin izole edilmeye ihtiyacı olmadığı için daha ucuzdur (Perumal ve Hashim 2014). Yapılan çalışmalar hücre bazlı biyosensörlerin hastalık teşhisi, çevresel analizler, besin kalite kontrolü, kimyasal-

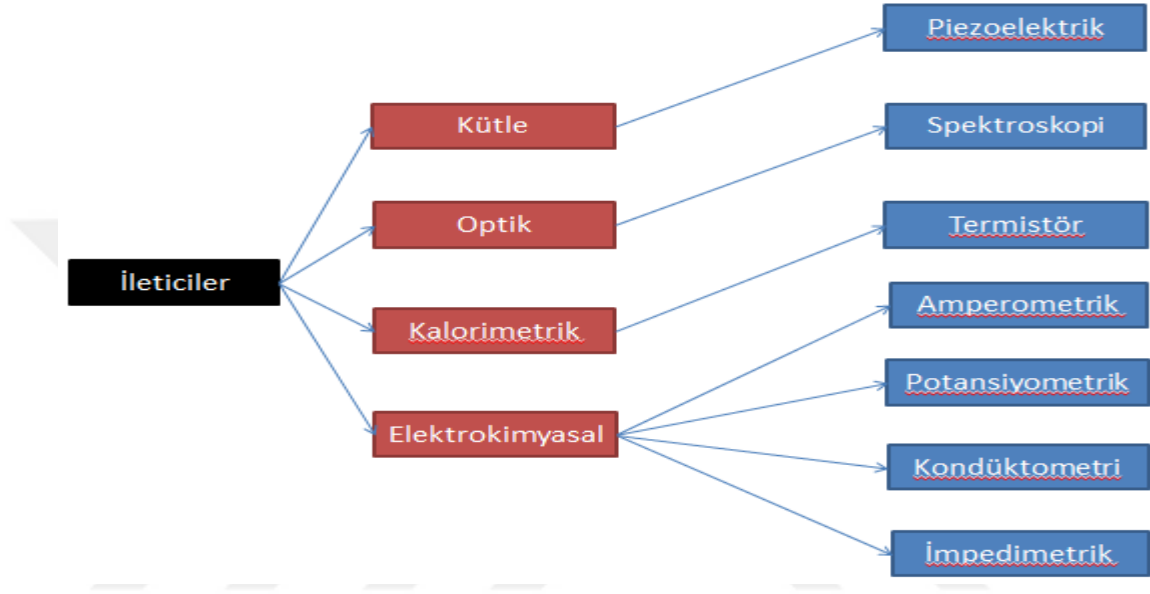
farmasotik endüstri ve ilaç algılama gibi alanlar için kullanılan bir yöntem olduğunu göstermektedir.

2.3.1.1.5 Biyomimetik sensörler (Aptasensörler)

Biyomimetik sensörler biyokomponent olarak aptamerleri kullanan aptasensörlerdir. Aptamerler; amino asitleri, oligosakkaritleri, peptitleri ve proteinleri tanımak için tasarlanan yapay nükleik asit zincirleridir. Aptamerler genel olarak rastgele sentezlenmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir. İlk önce oligonükleotid sentezleyicisine rastgele zincir dizim sekansı içeren çok sayıda farklı sentetik oligonükleotid ürettirilir. Farklı baz dizimi olan her molekül, farklı üç boyutlu yapıya sahiptir. Dolayısıyla bu farklı molekül, tanınması düşünülen analitle muamele edilir ve rastgele üretilen oligomerik molekülün hangi analite karşı yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğu SELEX adı verilen özel bir yöntemle tespit edilir. Sonra tespit edilen bu oligomerin sekansı belirlenerek sentezleyiciye ikinci kez bu molekülden üretimi sağlanır; ürünler ise biyosensör teknolojisinde biyoreseptör olarak kullanılır. Yüksek spesifiklik, küçük boyut, modifikasyon ve immobilizasyon çok yönlülüğü, rejenere olabilmesi ve hedef analitin bağlanmasıyla gerçekleşen konformasyonel değişim gibi aptamer özelliklerinden çok çeşitli biyosalgılama formatlarını optimize etme konusunda başarıyla faydalanılmıştır (Perumal ve Hashim 2014). Aptamer temelli biyosensörler son dönemlerde biyomimetik sensörlerde klinik uygulama için önemli bir hale gelmiştir. (Strehlitz vd. 2008, Torres ve Alocilja 2009, Wang vd. 2012, Weng vd. 2012). Monoklonal antikorlara rakip olan bu moleküller gün geçtikçe uygulamada kendini daha fazla göstermektedir. Hatta son 10 yıl içinde özel yöntemlerle üretilen aptamer proteinlerin bazılarının altın ve bakır gibi metallerle karşı bile özgün bağlanma gösterdikleri görülmüştür. Bu da, özellikle yer altı suları üzerinden maden aramaları yapmak için orijinal biyosensör imalatının yapılabileceğinin işaretini vermektedir (Chambers vd. 2009).

2.3.2 İleticiler (Transduserler)

İleticiler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu sinyale dönüştürmektedirler. Biyokimyasal reaksiyonların özelliklerine göre ileticiler kullanılmaktadır (Thevenot vd. 1999, Telefoncu 1999, Hou 2005). Şekil 2.16’da iletici türleri gösterilmiştir.



Şekil 2.16 İletici türleri

2.3.2.1 Biyosensörlerin ileticilere göre sınıflandırılması

İleticiler fiziksel, biyolojik ve kimyasal olayları yüksek hassasiyet ve düşük ölçüm değerleri ile elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlardır. Günümüzde geliştirilmiş birçok iletici metodu bulunmaktadır.

2.3.2.1.1 Elektrokimyasal biyosensörler

IUPAC, elektrokimyasal biyosensörleri bir elektrokimyasal dönüştürücü materyali ile bağlantılı olan bir biyoreseptör kullanarak kantitatif ya da yarı kantitatif analitik bilgi sağlayabilen bir cihaz olarak tanımlamıştır (Thevenot vd. 1999). Elektrokimyasal

biyosensörler indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları sonucu oluşan akımı ölçerler. Üretilen akım mevcut elektroaktif türlerin konsantrasyonu veya üretim/tüketim oranı ile ilişkilidir. Oluşan elektriksel sinyal hedef ve analit arasındaki tanımlama işlemi ile ilgili olup analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Wang 2006). Elektrokimyasal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik ve kondüktometrik olarak dört kategoriye ayrılırlar.

Amperometrik sensörler biyosensörlerin en popüler sınıflarından birisidir. Amperometrik ölçümde, elektroaktif molekülün elektrokimyasal yükseltgenmesi veya indirgenmesinin bir sonucu olarak bir akım oluşur ve oluşan bu akımın sabit potansiyelde ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Harris ve Turner 2013). Amperometrik yöntemlerde çalışma elektrotları altın (Au), platin (Pt) veya karbon gibi elektrotlardır. Referans elektrot olarak ise genellikle gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot kullanılmaktadır. Karşıt elektrot ise akım akışının ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır (Wang vd. 2008). Enzim temelli amperometrik elektrotlar en çok kullanılan amperometrik biyosensörlerdir. Bu yöntemde ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde akım yoğunluklarından yararlanılmaktadır.

İlk potansiyometrik sensör 1969 yılında üre tayinine yönelik olarak hazırlanmıştır (Perumal ve Hashim 2014). Potansiyometrik sensörler referans elektroda karşı çalışma elektrodundaki potansiyelin ölçümüne dayanmaktadır. Potansiyometrik transdüserin çalışma prensibi, elektrokimyasal hücrede elektrottan akımın geçmediği bir anda ölçülerek tanı prosesi süresince indikatör ve referans elektrot arasında biriken potansiyel farkına dayanmaktadır. Ölçülen potansiyel Nerst eşitliği ile ifade edilir.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli transdüksiyon yöntemi ile düşük algılama limitlerinde ölçümlerin yapılabilmesiyle son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Bu yöntem ile etiketsiz veya reaktifsiz algılama sağlayabildiğinden gerçek zamanlı tayinler için oldukça uygundur (Pejcic ve Marco 2006, Perumal ve Hashim 2014). EIS ölçümünde, elektroda kontrollü alternatif potansiyel uygulanarak numune üzerinden geçen akım belirlenir. Numuneden kaynaklanan elektriksel impedans voltajın

akıma oranı olarak hesaplanır. EIS üç elektrot sistemi, bir potentiostat ve bir frekans yanıt analizöründen oluşur. Bu elektrot sistemi; çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrottur (Perumal ve Hashim 2014). İmpedans spektroskopisi kanser/tümör hücrelerinin, virüslerin, bakterilerin ve patojenlerin algılanması gibi birçok çalışmada kullanılmıştır (Bayoudh vd. 2008, Diouani vd. 2008, Kukol vd. 2008, Hong vd. 2012, Ohno vd. 2012, Nquyen vd. 2012).

Kondüktometrik biyosensörlerde iyonik türlerin konsantrasyonundaki değişimi sonucunda değişen iletkenliğinin ölçümüne dayanmaktadır. Kondüktometrik cihaz birbirinden ayrılmış iki elektrottan oluşmaktadır. İletkenlik ölçümü için elektroda alternatif akım uygulanarak ohm metre ile ölçülebilen iletkenliği ortaya çıkmaktadır. (Grieshaber vd. 2008, Lee vd. 2012).

2.3.2.1.2 Optik temelli biyosensörler

Son yıllarda optik biyosensörler hızlı bir ilerleme yaşamaktadırlar ve gıda güvenliği, güvenlik, yaşam bilimi, çevresel görüntüleme ve tıp alanı gibi önemli alanlarda uygulamaları bulunmaktadır (Tsoka vd. 1998, Vadrine vd. 2003, Johansson vd. 2008, Bhatta vd. 2010, 2012, Md Müslim vd. 2012, Perumal ve Hashim 2014). Optik biyosensörler günümüzde en çok kullanılan biyosensör türlerinden birisi olmakla birlikte gıda, güvenlik, canlı bilimi, çevre izleme gibi çok sayıda önemli alanlarda kullanılmaktadır. Optik biyosensörler biyotanımlama prosesine bağlı olarak faz, polarizasyon veya frekans değişimleri temeline dayanmaktadır. Optik biyosensörler kolorimetrik, floresans, lüminesans ve yüzey plasmon rezonans gibi farklı kategorilerde sınıflandırılabilirler. Kolorimetrik ve floresans esaslı biyosensörlerde hedef veya biyolojik elementler floresan etiket veya boyalarla etiketlenirler (Fan vd. 2008). Yüzey plasmon rezonans (SPR) biyosensörü yüzey plasmon dalgalarını (elektromanyetik dalga) kullanarak hedef analit ile sensör üzerindeki biyotanımlama elementi ile olan etkileşimlerdeki değişimleri saptamaktadır (Mol ve Fischer 2010).

2.3.2.1.3 Piezoelektrik temelli biyosensörler

Piezoelektrik ilk kez Curie kardeşler tarafından 1880’de, merkezi olmayan kristal veya buna benzer yapılarda mekanik ve elektriksel sistemler arasındaki lineer etkileşimlerle açıklanmıştır (Katzir 2006, Tichy vd. 2010). Pizeoelektrik biyosensörlerin transdüserleri quartz gibi piezoelektrik malzemeden yapılmış ve biyoalgılayıcı malzemede pizeoelektrik malzeme ile kaplanmıştır. Frekans belirli bir değerde akım oluşturan harici elektrik sinyali ile kontrol edilir ve hedef analit algılayıcı malzeme ile bağlanma/reaksiyon gerçekleştiğinde analitin kütlesi ile ilişkili olarak frekans kaymasına sebep olmaktadır (Perumal ve Hashim 2014).

2.3.2.1.4 Kalorimetrik biyosensörler

Çoğu kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar ısı değişimi içermektedir. Bu nedenle bütün biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşan ısı oluşumu ve absorpsiyonu kalorimetrik temelli biyoalgılama cihazlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Kalorimetrik yöntemler önce enzim temelli biyosensörlerde ve sonradan da hücre ve immunosensörlere uygulanmıştır (Xie vd. 1999, Ahmad vd. 2010). Kalorimetrik prensip uygun analit ile biyotanımlama elementi arasındaki reaksiyonda oluşan sıcaklık değişimlerinin ölçülmesine dayanmaktadır. Sıcaklıktaki bu değişim harcanan reaktif veya ürün miktarı ile ilişkilidir (Xie vd. 1999). Kalorimetrik cihazlarda ısı değişimi termistör veya termofil ile ölçülmektedir. Yapılan çalışmalar biyomolekül etkileşimlerinin etiketsiz görüntüleme uygulamalarında kullanıldığını göstermiştir (Cooper 2003). Bu teknik ile DNA hibritleşmesinin hızlı bir şekilde saptanmasına olanak sağlamıştır (Watterson vd. 2002, Buurma ve Haq 2008, Paul vd. 2010, Xi vd. 2010).

2.3.3 Biyolojik materyallerin immobilizasyonu

İmmobilizasyon, hareketi sınırlandırmak demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin hareketleri sınırlandırılmıştır. “İmmobilize” terimi yerine “tutuklanmış”, “çözünmez hale getirilmiş”, “bağlanmış” gibi terimler kullanılmaktadır (Telefoncu 1997).

İmmobilizasyon işleminin uygun yöntemler ile yapılmasıyla biyosensörün kullanım süresi, yanıt süresi ve tekrarlanabilirlik gibi özellikleri etkilediğinden dolayı en kritik adımdır (Andreescu ve Sadik 2004).

İmmobilize edilmiş enzimlerin ilk kez endüstriyel kullanımı 1967 yılında Chibata ve çalışma arkadaşları tarafından yapılmış ve bu çalışmada sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmeleri için *aspergillus oryzae* aminoasilaz'ın immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Tosa vd. 1966). İmmobilize enzim sistemlerinin önemli bileşenleri enzim, matriks ve enzimin matrikse bağlanma şeklidir.

Matrikslerin özellikleri immobilize enzim sistemlerinin performanslarını belirlemede oldukça önemlidir. İdeal destek madde özellikleri; basınca karşı fiziksel direnç, hidrofilitiklik (hidrofilisite), enzime karşı inert, biyoyumluluk, mikrobiyal ataklara karşı direnç ve düşük maliyet şeklindedir (Trevan 1980, Brodelius ve Mosbach 1987, Buchholz ve Klein 1987). Destek maddeler kimyasal yapılarına göre organik veya anorganik olarak sınıflandırılabilirler. Organik destek maddelerde kendi arasında doğal ve sentetik polimerler olarak iki alt gruba ayrılırlar (Cabral ve Kenndy 1991).

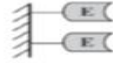
Matrikslerin fiziksel özellikleri (partikül çapları, şişme özellikleri, mekanik güç) immobilize sistemlerin performansları için büyük öneme sahiptir. Özellikle por parametreleri ve partikül boyutu total yüzey alanını belirler ve böylece enzimlerin bağlanma kapasitesini kritik derecede etkilemektedir. Porsuz destek maddeler diffüzyonel kısıtlamalar gösterir ama düşük yükleme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle porlu destek maddeler yüksek enzim yüklenmesine olanak sağlayan yüksek yüzey alanı ve immobilize enzimleri çevreden daha iyi bir koruma olanağı sağlamaktadırlar. İnorganik taşıyıcıların avantajlarına (fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal bozunmaya karşı direnç) rağmen çoğu endüstriyel uygulamalarda organik matriksler kullanılmaktadır. Hidrofilik karakter immobilize enzimin aktivite seviyesini belirlemede en önemli faktörlerden birisidir.

Enzimler, destek maddelere tersinir fiziksel absorpsiyon ve iyonik bağdan kararlı kovalent bağ etkileşimleriyle tutturulurlar. Enzim immobilize yöntemleri tersinir ve tersinmez olarak iki ana katagoriye ayrılırlar (Gupta ve Mattiasson 1992).

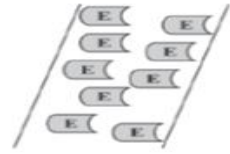
2.3.3.1 Geri dönüşümsüz immobilizasyon metotları

Geri dönüşümsüz immobilizasyon konseptinin anlamı enzim bir kere destek maddeye bağlandığı anda enzim veya destek maddenin biyolojik aktivitesinin yok edilmeden yapıdan çıkartılamaması söz konusudur. Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemi olarak kullanılan ortak prosedürler kovalent bağlama, tutuklama veya mikrokapsülleme ve çapraz bağlamadır.

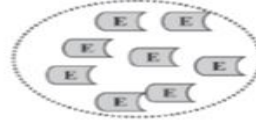
❖ Kovalent Bağlama



❖ Tutuklama



❖ Mikrokapsülleme



❖ Çapraz Bağlama



Şekil 2.17 Tersinmez immobilizasyon metotları (Brena ve Batista-Viera 2013)

2.3.3.1.1 Kovalent bağ düzenlenmesi

Proteinlerin immobilizasyonunda en çok kullanılan metotlar arasında kovalent bağ düzenlenmesi esaslı yapılmaktadır. Bu metodun avantajı enzim ve matriks arasındaki bağ yapılarının doğası gereği kararlı olması ile solüsyon içine enzim salınımı gerçekleşmemektedir.

Kovalent reaksiyonları amid, eter, tiyo-eter veya karbamat gibi bağlarla destek maddeye enzimlerin bağlanmasına olanak sağladıkları için kullanılmaktadır. Bu sayede de enzim matrikse kuvvetli bir şekilde bağlanmış olmakta ve aynı zamanda da kararlı bir yapı oluşturmaktadır. Ancak, kovalent bağın doğası gereği enzimatik aktivitesinin azalmasıyla enzim ile birlikte matriks de kullanılmaz hale gelmektedir (Brena ve Batista-Viera 2013).

2.3.3.1.2 Tutuklama

Tutuklama metodunun esası enzimin polimerik bir ağ içine yerleştirilerek substrat ve ürünün geçmesine izin verirken enzimin korumasını sağlamaktır (O'Driscoll 1996). Bu yöntemin diğer yöntemlerden farkı enzimin, membran veya matrikse bağlanmamasıdır. Tek adımlı süreç içermesi ve düşük maliyeti bu yöntemin avantajları arasında yer almaktadır. Jel (Bernfeld ve Wan 1963), fiber tutuklama (Dinelli vd. 1976), mikro-kapsülleme (Wadiack ve Carbonell 1975) gibi değişik tutuklama yöntemleri bulunmaktadır. Uzun yanıt süresi gözenek büyüklüğü kontrolünün zorluğu ve olası enzim salınımı ise bu yöntemin dezavantajlarıdır.

2.3.3.1.3 Çapraz bağlama

Bir veya daha fazla fonksiyonel grubun kullanılmasıyla taşıyıcı ile biyomolekül arasında kovalent bağlanma esasına dayanmaktadır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri glutaraldehit, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler vb. maddelerdir.

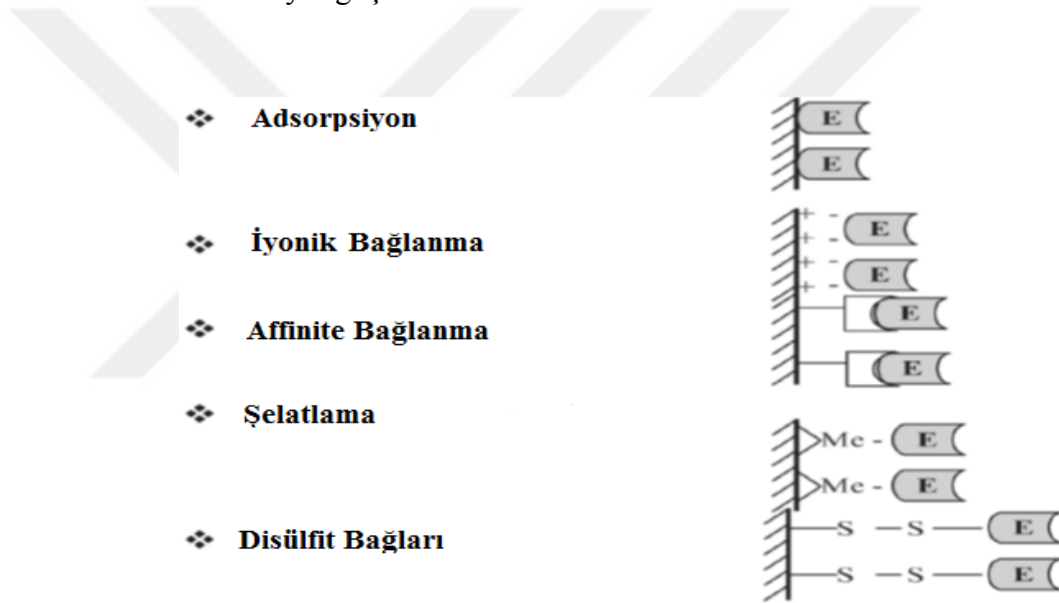
Çapraz bağlama yönteminde biyomolekül kuvvetli bir şekilde bağlandığından desorpsiyon çok düşüktür. Bu yöntem ile biyomolekül immobilizasyonu farklı şekillerde yapılabilir (Telefoncu 1999);

- Biyomolekülün bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Biyomolekülün ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,

- Biyomolekölün suda çözünen bir taşıyıcıda adsorbsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Biyomolekölün bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

2.3.3.2 Geri dönüşümlü immobilizasyon metotları

Tersinir immobilize enzimler destek maddeden basit koşullar altında ayrılmaktadırlar. Enzim immobilizasyonu için tersinir yöntemlerin kullanılması çoğu ekonomik nedenlerinden dolayı ilgi çekmektedir.



Şekil 2.18 Tersinir immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera 2013)

2.3.3.2.1 Nonspesifik adsorpsiyon

En basit immobilizasyon yöntemi olan nonspesifik adsorpsiyon, iyonik bağlanma veya fiziksel adsorpsiyon esasına dayanmaktadır (Messing 1976, Woodward 1985). Fiziksel adsorpsiyonda enzim matrikse hidrojen bağı, van der waals etkileşimleri veya hidrofobik etkileşimlerle bağlanır. Adsorpsiyon ile immobilizasyon hafif, kullanımı kolay ve enzimin katalitik aktivitesini korunmasını sağlamaktadır. Böyle metotlar

ekonomik olarak çekicidir ama etkileşimler nispeten zayıf olduğunda matriksten enzim sızması gibi problemler içerebilmektedir.

2.3.3.2.2 İyonik bağlama

Geri dönüşümlü enzim immobilizasyonundaki yaklaşım kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşimleri temelinde dayanmaktadır. Örneğin, geri dönüşümlü enzim immobilizasyonunun kromatografi prensipleri içeren uygulamalarından bir tanesi iyon değiştiricilerin kullanılması olmuştur (Tosa vd. 1966, Sharp vd. 1969). Bu metot basit ve geri dönüşümlüdür fakat enzimin hem kuvvetli bağlanması hemde aktivite halini tamamen koruması için gereken koşulların sağlanması oldukça zordur. Son zamanlarda polimerik iyon ligandlarının kullanılması protein-matriks etkileşimlerinin düzenlenmesine olanak sağlamıştır. Ancak, substrat veya ürünler yüklü olduklarında yüksek yüklü destek madde kullanılmasıyla dağılma ve difüzyon olgularının bir sonucu olarak kinetiğin bozulmasıyla problemler meydana gelebilmektedir. Bu nedenle optimum pH veya pH kararlılığı gibi enzim özellikleri değişebilmektedir (Goldman vd. 1968, Goldstein 1972). Bunun problem ortaya çıkarmasına rağmen uygulamalarına bağlı olarak belirli bir enzimin optimal şartlarının daha bazik veya asidik koşullara kayması yararlı olabilmektedir (Guisan vd. 1994).

2.3.3.2.3 Affinite bağlama

Yapılan çalışmaların temeli biyolojik materyallerle çalışıldığından her zaman 3-boyutlu yapının oryantasyonu/kontrolü temeline dayanmaktadır. Böylece aktivitenin korunması ve sürdürülmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda uygulanan farklı bir trend, aktif destek ve proteinin spesifik bir grubu arasında (biyo)afinite bağları oluşturmaktır. Eğer biyomolekülde doğal olarak bu tür spesifik gruplar bulunmuyorsa, biyomolekülün oldukça spesifik bir bölgesinde aktiviteyi etkilemeden bu gruplar tasarlanabilmektedir. Selüloz-selüloz bağlanma bölgesi taşıyan enzimler, histidin taşıyan enzimler için metal iyon immobilize edilmiş matriksler, spesifik enzimler için monoklonal/poliklonal antikorlar ve lektin-glikoenzim taşıyan oligosakkaritler bazı özel

afinite etkileşimlerine örnek olarak verilebilmektedir. Bu yöntem matriksin tekrar kullanımı ve enzim stabilitesi için oldukça uygundur. Biyomolekülün farklı desteklerde oryantasyonunun kontrolü rahatlıkla sağlanabilmektedir (Andreescu vd. 2006).

2.4 Çalışmada Kullanılan Biyomoleküller, Taşıyıcı Sistemler, Nanopartikül ve Çapraz Bağlayıcılar

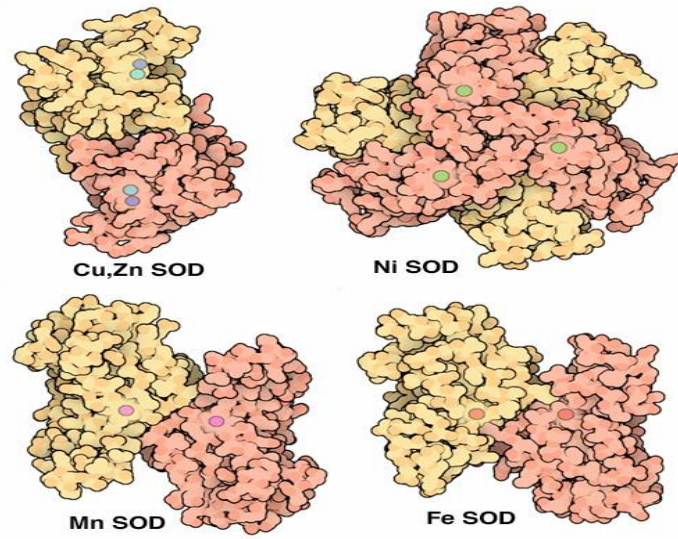
2.4.1 Enzim

Normal miktardaki ROP immün sistem için faydalı olup, aşırı üretimleri sonucunda ise yaşlanma, kalp hastalıkları, kanser ve nerodejeneratif hastalıklara sebep olmaktadır (Hall ve Braughler 1989, Floyd 1990, Ames vd. 1993, Vanella vd. 1993, Kovacic ve Jacintho 2001, Mak ve Newton 2001). SOD canlı organizmalar için oldukça önemli bir antioksidan enzimdir (Halliwell vd. 1984, Dean vd. 1997, Kehrer 2000). Süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dismutasyonunu spesifik ve etkili bir biçimde katalizledikleri ilk McCord ve Fridovich tarafından belirtilmiştir (McCord ve Fridovich 1969). Hidrojen peroksit; katalaz ve peroksidaz gibi diğer enzimler tarafından daha zararsız bir ürüne dönüştürülür.



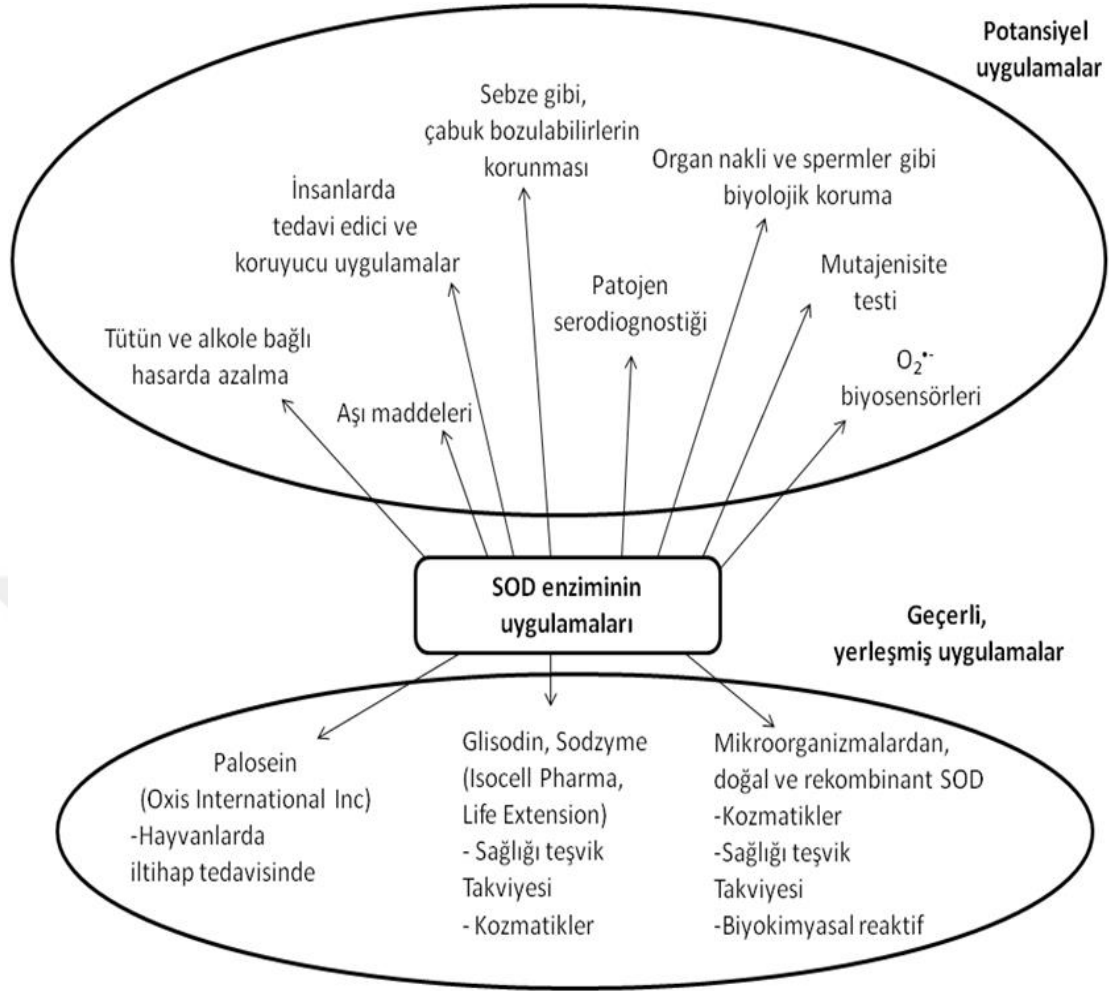
Süperoksit dismutazlar, süperoksit radikallerine ($O_2^{\cdot-}$) olağanüstü seçicilikleriyle tanınmaktadırlar (Bertini vd. 1998). SOD enzimi, elektrokimyasal biyosensörlerde süperoksit radikallerinin hassas miktarlarının ölçümüne olanak sağlamaktadır. SOD, oksijen radikallerine karşı biyolojik savunma sisteminin önemli bir parçası olup (McCord ve Fridovich 1969, Fridovich 1972) oksijenle bağlantılı bütün organizmalar için hayati nitelik taşımaktadır.

Süperoksit dismutaz yaşamın her alanında bulunur. Cu-ZnSOD, NiSOD, MnSOD ve FeSOD gibi farklı metal merkezli çeşitleri bulunmaktadır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Çeşitli metal merkezli SOD enzimleri (Kocabay 2011)

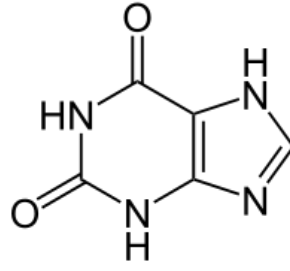
SOD'lar aktif merkezlerindeki metallere bağlı olarak farklı gruplara (manganez (Mn), demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko (Zn)) ayrılırlar. Bitkilerde hepsi farklı alanlarda konumlanmıştır. Cu/Zn SOD; ökaryotik hücrelerde genelde sitozol veya kloroplastta MnSOD; mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda bulunurken dimerik FeSOD'da kloroplastta bulunur. SOD'lar süperoksitlerle oluşan oksidatif stresin toksik etkilerinin detoksifikasyonu ile oksijen ve hidrojen perokside dönüştürülmesinde önemli rol üstlenmektedirler (Salin ve Bridges 1980, Del Rio vd. 1983, Droillard ve Paulin 1990, Van Camp vd. 1994, Fridovich 1995). Şekil 2.20'de Süperoksit dismutazın farklı kullanım alanları gösterilmiştir.



Şekil 2.20 SOD enziminin uygulamaları (Bafana vd. 2011)

2.4.2 Substrat

Ksantin, pürin nükleotidi olan guaninin deaminasyonu ile elde edilir. Hücre membranında bulunmaktadır ve hücre dışı sıvıda birikmektedir. Biyolojik örneklerde ksantin kantitatif tayini solunum yetmezliği sendromu, beyinsel iskemi gibi çeşitli tanılar için kullanılmaktadır (Jimenez vd. 2007). Bu analit, plazma ve idrar örneklerinde rutin olarak HPLC, kemiluminesans veya UV spektroskopisi gibi analitik tekniklerle kolayca ölçülür, örnek hazırlanmasının zahmetli olması ise dezavantajlarındandır. Ks, KsOD ile süperoksit radikali oluşturur. Oluşan radikal SOD ile H_2O_2 'ye dönüştürülür.

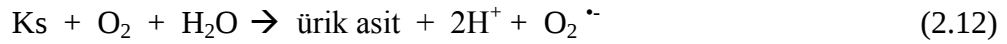


Şekil 2.21 Ksantin kimyasal yapısı (Campanella vd. 2000a)

DNA temelli biyosensörlerde radikal üretici olarak fenton reaksiyonunu kullanırlarken, SOD temelli biyosensörlerde KsOD kullanılmaktadır. Fenton reaksiyonlarında, Fe(II) ve Cu(II) gibi indirgenmiş geçiş metal iyonları, OH^- ve $\text{OH}^\bullet$ üreterek H_2O_2 ile reaksiyona girerler.



KsOD, O_2 'nin ksantin (Ks) veya hipoksantin (HKs) oksidasyonunu katalizleyerek $\text{O}_2^{\bullet-}$ oluşturur.



2.4.3 Taşıyıcı

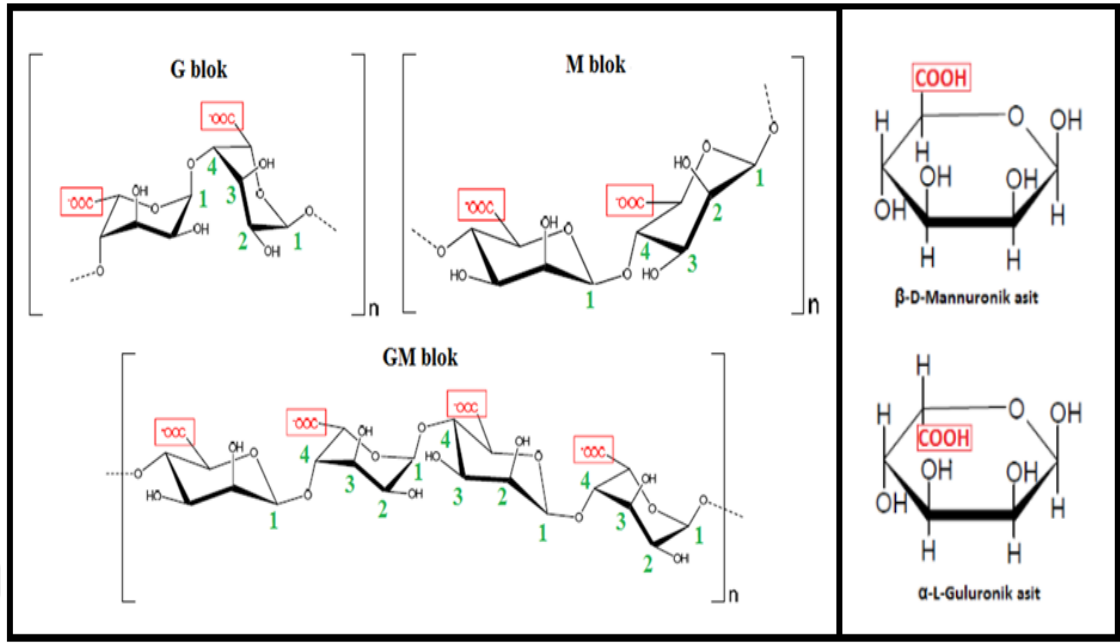
2.4.3.1 Jelatin

Jelatin kollajenin yapısında bulunan polipeptit bağların asit veya alkali çözeltiler ile hidrolizi sonucunda elde edilen denatüre proteindir (Zhou ve Regenstein 2004, 2005; Zhou vd. 2006). Jelatin üretiminin asıl amacı, suda çözünmeyen kollajenin hidrolizi ile suda çözünür hale getirmek ve jelleşme özelliğine sahip olan jelatini elde etmektir. Jelatin yapısında bulunan karboksil, hidroksil ve amin yan grupları sayesinde kolaylıkla çapraz bağlama gerçekleştirilebilmektedir.

Jelatin oldukça uzun bir süredir farmasötik, kozmetik ve gıda alanlarında kullanılmaktadır (Elzoghby vd. 2012). Klinikte jelatin, plazma genişletici veya jelatin sünger (jel köpüğü) olarak kullanılmaktadır, ayrıca aşı ve bazı protein formülasyonlarında da kullanılmaktadır. Jelatin, biyomedikal farmasötik uygulamalarda bazı avantajlar içermektedir. Birincisi ucuz ve rahat kullanıma sahip olmalarıdır. İkincisi denatüre bir ürün olan jelatin kollajenden daha az antijeniktir (Elzoghby vd. 2012). Üçüncü olarak jelatin zincirinin arjinin-glisin-aspartik sekansı gibi bol motif içermesi hücre adhezyonunun düzenlenmesine olanak sağlar (Wang vd. 2012). Dördüncü olarak da çeşitli fonksiyonel grupları ile kimyasal modifikasyonlara olanak tanımaktadır (Ayre vd. 2014). Son olarak jelatin çok yönlü fonksiyonları ile doku mühendisliği uygulamalarında matriks olarak kullanılmaktadır (Wang vd. 2012). Jelatinin ticari olarak ucuz, biyoyumlu, biyobozunur olması ve çeşitli formlarda bulunması jelatinle ilgili birçok araştırma yapılmasına olanak sağlamaktadır.

2.4.3.2 Aljinat

Aljinat deniz kahverengi alginden elde edilen doğal anyonik bir polisakkarit olup, (1→4) D-mannuronik asit ve (1→4) L-guluronik asit birimlerinden oluşmaktadır. Aljinat biyoyumluluk, film formu yapısı ve immobilize enzimlerin stabil kalmasına elverişli ortam oluşturmaları gibi birçok yararlı özellik göstermektedir (Liu vd. 2009). Ayrıca birçok gıda alanında uygulamaları görülen aljinatlar kıvam arttırıcı, emülsiyon stabilitesini sağlayıcı, jel oluşturucu olarak kullanılmaktadırlar.



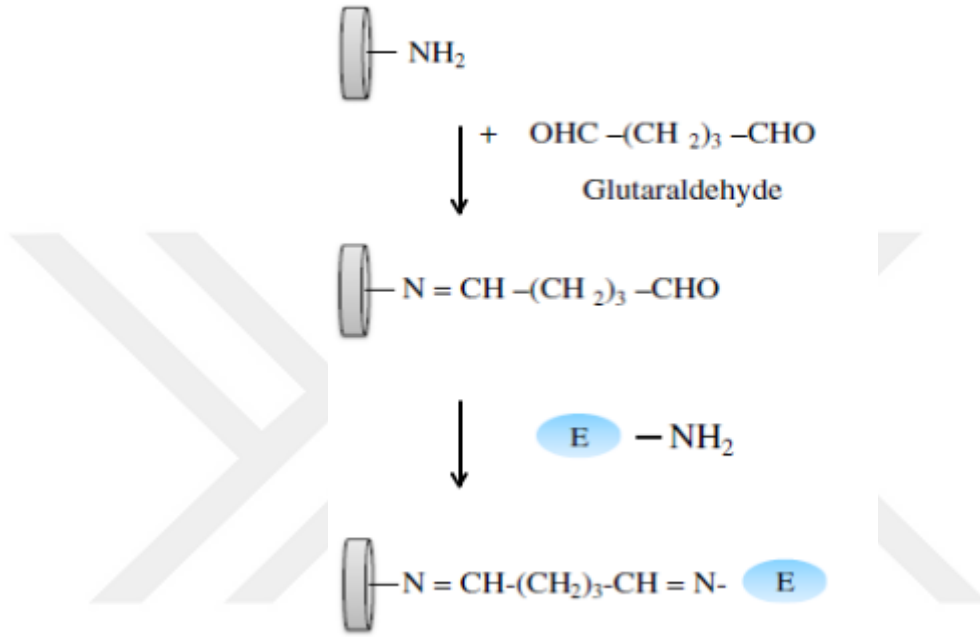
Şekil 2.22 Aljinatın monomerleri ve yapısı (Bük 2014)

Sodyum, potasyum ve amonyum tuzları suda iyi, kalsiyum tuzu ise az çözünür özelliktedir. Aljinat çözeltilerinin viskozitesi ortam sıcaklığına, iyon yoğunluğuna, molekül ağırlığına ve metal iyonlarının varlığı gibi farklı koşullara bağlıdır. Az miktarlardaki kalsiyum iyonları aljinat çözeltilerinin viskozitesini yükseltirken yüksek miktarlar jelleşmeye neden olur. Aljinatların yapısı jelleşmeyi, jellerin sertliğini ve jelleşme süresini etkilemektedir. Aljinat jelleri ısıya oldukça dayanıklıdır. Aljinatın en önemli özelliği suda çözünmeyen jel formunu alabilmesidir (Bierhalz vd. 2014). Uygun koşullar altında bağlanma bölgelerinin polimerin tekrarlı guluronik asit dizilerine katılmasıyla jelleşme gerçekleşmektedir (Khotimchenko vd. 2001).

2.4.4 Çapraz bağlayıcı

Bu tez çalışmasında (-NH₂) ve (-OH) fonksiyonel gruplarını içeren jelatin ve aljinat biyopolimerleri için glutaraldehit (GA) çapraz bağlayıcısı kullanılmıştır. Glutaraldehit'in suda çözünebilir yapısı ve ucuz olması nedeniyle diğer çapraz bağlayıcı reaktiflere oranla daha sık kullanılmaktadır.

Glutaraldehitin her iki ucu da reaktif olduğundan birçok biyomolekölü bir araya getirmek amacıyla kullanılabilir. GA protein moleküllerinin amino grupları ile reaksiyona girerek birçok protein molekülünün aralarında çapraz bağlanmalarına olanak sağlamaktadır (Jayakrishnan ve Jameela 1996), (Şekil 2.23).



Şekil 2.23 Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi (Sassolas vd. 2012)

Amin fonksiyonel destek madde ile glutaraldehit'in aldehit grupları arasında schiff bazı reaksiyonu oluşur. Sonrasında ise glutaraldehit'in ikinci aldehit grubu ile de enzimin amin grubu ile reaksiyona girmektedir (Sassolas vd. 2012).

2.4.5 TiO_2 nanopartiküller

Nanoskala düzeyindeki titanyum dioksitler (<100 nm) en çok üretilen nanopartiküllerden birisidir. Yanıcı olmayan, mat beyaz toz şeklinde olup boyalarda ve kağıda beyaz rengi veren, güneş pillerinde fotokatalizleyici, seramikte optik kaplamada,

kemik implantlarında korozyon önleyici kaplama olarak da kullanılmaktadır (Wang ve Fan 2014).

SiO₂, altın, gümüş, CeO₂, MnO₂ ve TiO₂ gibi nanopartiküller nano-biyosensörlerin yapısında bulunmaktadır (Rahman vd. 2010). Bunların arasından TiO₂ nanopartikülleri, geniş spesifik yüzey alanı, yüksek tekdüzelikleri, muhteşem biyouyumlulukları gibi özelliklerinden dolayı oldukça ilgi çekmektedirler (Li vd. 2009). Bao ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları araştırmada geniş yüzey alanlarından dolayı glukoz biyosensörlerinde enzimin immobilizasyonu için daha uygun bir ortam oluşturduklarını göstermişlerdir.



3. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE ÇALIŞMANIN AMACI

Biyosensörlerde elektrokimyasal temelli metodlar, özellikle $O_2^{\bullet-}$ 'nin eş zamanlı hassas tayini için oldukça uygundur. Bu yöntemler klasik olarak ya SOD ya da sitokrom c (sit-c)'ye dayanmaktadır. İlki, H_2O_2 oluşturmak için SOD tarafından $O_2^{\bullet-}$ 'nin spesifik dismutasyonuna dayanmaktadır. İkincisi, elektrot üzerine immobilize edilmiş olan sit-c'nin $O_2^{\bullet-}$ tarafından azaltılmasına ve ardından elektrot yüzeyinde proteinin reoksidasyonuna dayanmaktadır. Genellikle, $O_2^{\bullet-}$ çözeltide KsOD/HKs sistemi kullanılarak enzimatik olarak üretilir. Böylece, elde edilen oksidasyon eğimi $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır (Cortina-Puig vd. 2009).

Campanella vd. (2000a), kappa-karagenan membranına SOD'u immobilize ederek, SOD biyosensörü geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri biyosensör ile radikal kovucu moleküllerin antioksidan özellikleri ile sağlıklı ve hastalıklı insan böbrek dokularında antiradikal aktivitelerini tespit etmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün tayin limiti 0,001 mM olup, yanıt süresi yaklaşık 100 s'dir. Biyosensörün kullanım ömrü 7 gündür.

Campanella vd. (2003) çeşitli çayların SOD kullanılarak antioksidant etkilerini araştırmışlar. Ayrıca 2003 yılında ise meyvelerin antioksidant etkilerini araştırmışlardır.

Di vd. (2004) yaptığı çalışmada, $O_2^{\bullet-}$ tayini için altın elektrot yüzeyinde ince silika/polivinilalkol/sol-jel filmine SOD immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sensörün tayin limiti 0,1 μ M olup doğrusal aralığı ise 0,2 - 1,6 μ M'dır. Sensörün kullanım ömrü ise 20 gündür.

Emregül (2005), platin elektrot yüzeyine Jelatin içine SOD enzimi immobilize ederek bir SOD biyosensörü geliştirmiştir. Jelatin-SOD biyosensörünün cevabının $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu tespit etmiştir. tayin limiti 0,01 mM olarak tespit etmiştir. Biyosensör, duyarlılığını 4 hafta sonunda % 60 korumuştur.

Chen vd. (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada, kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SAM) üzerine sit-c immobilizasyonu gerçekleştirilerek $O_2^{\bullet-}$ biyosensörü geliştirilmiştir. Bu amaçla MUA:MU/Sit-c ,MPA/Sit-c, MPA:MP/Sit-c elektrotlarını geliştirmişlerdir (MUA: 11-merkaptoun-dekonoik asit, MU:11-merkaptoundekonol, MPA: 3-merkaptopropiyonik asit, MP: 3-merkaptetanol). Geliştirilen MUA:MU/Sit-c, MPA/Sit-c, MPA:MP/Sit-c elektrotlarının minimum tayin limitleri sırasıyla, 0,24; 0,68; 0,0065 μM olarak bulunmuştur.

Wang vd. (2009) $O_2^{\bullet-}$ tayini için, SOD'un doğrudan elektron transferine dayanan tek kullanımlık biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör indiyum kalay oksit (ITO) elektrot üzerine altın nanoparçacıklarının elektrobiriktirmesi sonrası elektrot yüzeyinde sistein varlığında, silika sol-jel (SJ) içine SOD'un immobilizasyonuna dayanmaktadır. Süperoksit radikal biyosensörünün 90 günlük bir süre içinde başlangıçtaki akım yanıtını % 85 koruduğu gözlenmiştir.

Kocabay vd. (2012) platin elektrot yüzeyini jelatin-karboksimetilselüloz destek sistemi ile modifiye edip SOD immobilize etmişlerdir. Tayin limitini 1.25×10^{-3} mM ($R^2=0,9994$) olarak bulmuşlardır. Geliştirdikleri bu biyosensör 80 gün sonunda hassasiyetinin % 89,8'ini korumuştur.

Emregül vd. (2012) yaptıkları bir diğer çalışmada, jelatin-karboksimetilselüloz (J-KMS) destek sistemine TiO_2 nanopartikülleri ile modifiye ederek SOD immobilize etmişlerdir. Geliştirdikleri bu biyosensörün lineer aralığı 1,5 nM – 2 mM arasında olup saptama limiti ise 1,5 nM olarak bulunmuştur. Biyosensörün yanıt süresi ise 1,8 saniye olarak belirtilmiştir.

Wang vd. (2012) altın elektrot üzerine sodyum aljinat sol-jel filmi ve SOD immobilize ederek canlı hücrelerden salınan süperoksit radikallerinin gerçek zamanlı olarak belirlenmesi için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile yüksek seçicilikte 0,44 – 229,88 μM lineer aralığında ve 0,23 μM tayin limitine ve K_m değeri 0,10 mM olan bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ayrıca bu sol-jel filmin, protein çevresinde biyoyumlu

mikroortamlar sağlanmasında ve enzim aktivitesinin stabil kalmasında etkili olduğunu kanıtlanmıştır.

Wang vd. (2013) altın nanopartikül-kitosan-iyonik sıvı (ANP-KT-IS) biyokompozit film üzerine Cu-Zn-SOD immobilizasyonu ile bir süperoksit anyon biyosensörü geliştirmişlerdir. Ultrasonik elektrobiriktirme ile ANP-KT-IS kompozit yapısı camsı karbon elektrot üzerine tek adımlık ultrasonik elektrobiriktirme yöntemiyle oluşturulmuş ve devamında SOD immobilizasyonu ile SOD esaslı biyosensör oluşturulmuştur. Yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu yöntemiyle karakterize edilmiştir. Biyosensörün elektrokimyasal performansı ise döngüsel voltametri ve kronoamperometri yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Biyosensörün yanıt süresi <5 s, lineer aralığı $5.6 - 2.7 \times 10^3$ nM arasında olup tayin limiti ise 1.7 nM'dır. Geliştirilen bu sensör ile biyolojik sistemlerde süperoksit anyonu değişikliklerinin kantitatif olarak hesaplanması için ümit verici bir metot oluşturulmuştur.

Zhu vd. (2015) süperoksit radikallerinin organizmalara verdiği hasarların önem kazanmasından dolayı süperoksit anyonlarının belirlenmesi için elektrokimyasal bir sensör geliştirmişlerdir. Bunun için Pt-Pd/MWCNT modifiye elektrot yüzeyine SOD immobilize ederek elektrokimyasal bir sensör geliştirmişlerdir. Biyosensörün karakterizasyonu TEM, XRD ve XPS ile gerçekleştirilmiştir. Lineer aralığı 40 - 1550 μ M ($R^2=0.9941$), tayin limiti 0.71 μ M olan ve 30 günlük süre sonunda hassasiyetinin sadece %3 ünü kaybeden bir biyosensör geliştirmişlerdir.

Zhu vd. (2016) yılında yaptıkları çalışmada, patolojik koşullardaki süperoksit anyonlarının kritik önemi göz önünde bulundurularak Pt-Pd ile donatılmış SOD sensörü ile $O_2^{\cdot-}$ 'nin gerçek zamanlı ölçümüne dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu biyosensör hızlı, seçici ve lineer amperometrik yanıt ($16-1536$ μ M $R^2=0.9941$) göstermiştir. Düşük Michaels-Menten sabiti 1.37 μ M ile de süperoksit radikallerine yüksek enzimatik aktivite ve affinite gösterdiği belirtilmiştir.

Çağımızın hastalıkları arasında sayılan kanser, diabetes mellitus, ateroskleroz, AIDS gibi pek çok metabolik hastalığın kaynağının organizmada oluşan serbest radikaller olduğu düşünülmektedir. Oksijenli solunum yapan canlılarda reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinin önlenmesinde antioksidan savunma sistemleri rol oynamaktadır. Biyolojik sistemlerde en çok oluşan radikallerden biri süperoksit radikalidir. Süperoksit radikallerinin artışıyla bağlantılı olarak hücre büyümesi, mutagenез, hücre ölümü gibi sonuçlar meydana gelmektedir. Bu yüzden, $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonunun kantitatif ve kalitatif tayini oldukça önem taşımaktadır. Süperoksit radikallerinin tayininde; ESR, kemilüminesans veya semikantitatif kolorimetrik testler kullanılmaktadır. Protein kimyasında, elektron aktarımına dayanan elektrokimyasal temelli biyolojik sistemler spesifik, duyarlı, hızlı, kolay ve eş zamanlı sonuç verdiği için tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasının en önemli amacı $O_2^{\bullet-}$ 'nin tayini için hassasiyeti yüksek, düşük tayin miktarı, maliyeti düşük enzimatik bir biyosensör geliştirmektir. Bu nedenle Jelatin-Aljinat matriks TiO_2 nanopartikülleri ile modifiye edilerek yüzey alanı artırılmış ve SOD immobilizasyonu için uygun koşullar sağlanmıştır. Biyosensörün optimizasyonu amperometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı ksantin konsantrasyonlarına karşı amperometrik olarak alınan ölçümlerden elde edilen akımlar grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan Ksantin (%99), SOD (E.C.1.15.1.1), KsOD (E.C.1.1.3.22), glutaraldehit (%25), jelatin, aljinat, titanyum dioksit (TiO₂), potasyum klorür (KCl), sülfürik asit (H₂SO₄), potasyum ferrosiyanür ve potasyum ferrisiyanür (Fe(CN)₆^{4-/3-}) Sigma'dan; NaOH, NaH₂PO₄.2H₂O ve Na₂HPO₄.12H₂O Merck'den temin edilmiştir.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

Yapılan çalışmalarda elektrokimyasal ölçümler “Gamry Instrument Impedance Analyzer- Framework Version 5.50 software” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan deiyonize su direnci $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ olan MilliPore Simplicity ünitesinden sağlanmıştır.

Çözeltilerin hazırlanmasında, hücre içine çözeltilerin ilave edilmesinde ve immobilizasyon prosesinde eppendorf marka mikro pipetler kullanılmıştır.

Çözeltilerin karıştırılmasında Wisestir MSH-20 marka manyetik karıştırıcı/ısıtıcı kullanılmıştır.

Deneyler esnasında yapılan karışırmalar Boeco V1 Plus marka Vortex kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan katı kimyasallar hassas terazide tartılmıştır.

Hazırlanan tamponların pH'ları Hanna HI 221 marka pH metre ile ayarlanmıştır.

4.1.3 Kullanılan elektrotlar

Elektrokimyasal hücre sisteminde üçlü elektrot sistemi olarak adlandırılan karşıt, çalışma ve referans elektrotları kullanılmıştır. Karşıt ve çalışma elektrotları olarak yüzey alanları 1 cm^2 olan platin levhalar kullanılmıştır. Kullanılan referans elektrot Ag/AgCl elektrotudur.

Elektrotlar her immobilizasyon öncesi $0.05 \text{ }\mu\text{m}$ alümina ile temizlenmiştir. Elektrokimyasal temizlikleri için ise H_2SO_4 (0.05 M) çözeltisinde 100 mVs^{-1} tarama hızında (-0,3 ile +1,2 V) aralığında dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Son olarak elektrotların pH'ı 7.4 olan fosfat tamponunda 100 mVs^{-1} tarama hızında -0,5 ile +0,5 V arası dönüşümlü voltametrileri alınarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

4.1.4 Kullanılan çözeltiler

Fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4), 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır.

Superoksit dismutaz enzimi (SOD) ana stok çözeltisi 75000 U / 200 μL olacak şekilde deiyonize suda hazırlanmıştır ve buzdolabında $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Aljinat %4'lik stok çözelti halinde hazırlanmış ve kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Substrat olarak, Ksantin stok çözeltisi (25 mM) kullanılmıştır. Ksantin çözeltisi hazırlanırken Ksantin'in fosfat tamponunda çözünmesi için ortamda 0,1 M olacak şekilde NaOH eklenmiştir.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit çözeltisi konsantrasyonu 0,125 M olarak fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

Elektrokimyasal ölçümlerde hücre ortamında kullanılmak üzere $K_4[Fe(CN)_6]$ (0.5 M), $K_3[Fe(CN)_6]$ (0.5 M) ve KCl (1 M) stok çözeltileri hazırlanmış ve deneylerde uygun miktarlarda kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 İmmobilizasyon jelinin hazırlanması

Jelatin eppendorf tüp içerisinde fosfat tamponu ile yarım saat bekletilerek şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra sıcaklığı 50 °C olan su banyosunda bekletilerek jelatinin çözünmesi sağlanmıştır. Ardından farklı miktarlarda aljinat ve titanyum dioksit ilave edilerek vorteks ile homojen hale getirilmiştir. Fosfat tamponunda çözülmüş halde bulunan SOD enzimi değişik ünitelerde ilave edilerek homojenizasyon için tekrar vortekslenmiştir. En son, çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ortama ilave edilerek immobilizasyon jeli hazır hale getirilmiştir.

4.2.2 J-AL-TiO₂-SOD elektrotlarının ve mikrotabanın hazırlanması

Hazırlanan immobilizasyon jeli, elektrotta toplam 50 µL jel olacak şekilde elektrodun her bir yüzeyine 25 µL immobilizasyon jeli ile immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İmmobilize elektrotlar hazırlandıktan sonra, 6 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır.

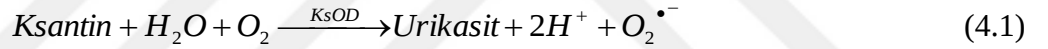
4.2.3 Bağlanmayan enzimin uzaklaştırılması

İmmobilizasyon işlemi bitirildikten sonra, Pt elektrot üzerindeki jel kısım, en az 6 saat kurumaya bırakılmış ve sonrasında da fosfat tamponu (pH 7.4) içinde 3 farklı tüpte 10'ar dakika bekletilerek bağlanmayan enzimin uzaklaşması sağlanmıştır.

4.2.4 Enzim aktivitesi tayini

4.2.4.1 Elektrokimyasal yöntem

Platin yüzeyindeki immobilize SOD'un performansı elektrokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla elektrokimyasal hücre içerisinde Ks, KsOD kullanılarak $O_2^{\bullet-}$ 'nin in vitro oluşturulması sağlanmıştır.



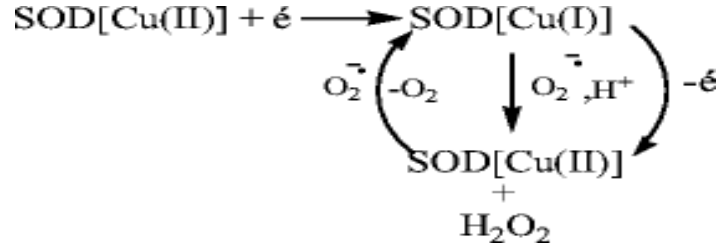
Süperoksit radikali ile SOD enzim reaksiyonu sonucunda oluşan H_2O_2 elektrot yüzeyinde Ag/AgCl'e karşı +650 mV potansiyel uygulanarak yükseltgenmiştir. $O_2^{\bullet-}$ 'nin SOD enzimi ile dismutasyon reaksiyonu aşağıdaki reaksiyon ile gerçekleşmektedir.



Elektrot yüzeyinde oluşan H_2O_2 aşağıdaki reaksiyonla tayin edilmektedir.



Çalışma elektrodu yüzeyinde oluşan H_2O_2 'nin, +650 mV'da yükseltgenmesiyle oluşan akım tayin edilmiştir. Oluşan akım çözeltideki $O_2^{\cdot-}$ konsantrasyonu ile orantılıdır. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Elektrot yüzeyindeki reaksiyon şeması (Emregül 2005)

4.2.5 Optimizasyon çalışmaları

4.2.5.1 Jelatin-Aljinat oranı optimizasyonu

İlk öncelikle immobilizasyon şartlarının optimize edilmesi için değişik J-AL oranları denenmiştir. Immobilizasyon jelinde TiO_2 , SOD enzimi ve glutaraldehit miktarları sabit tutularak, 0,25; 0,5; 1; 2 oranında J-AL içeren immobilizasyon jeli ile immobilize SOD elektrotu oluşturulmuştur.

4.2.5.2 Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonu

Enzimin Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemine immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı olarak 0,001; 0,002; 0,004; 0,01 ve 0,016 M konsantrasyonlarında glutaraldehit kullanarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiştir.

4.2.5.3 Enzim konsantrasyonu optimizasyonu

Elektrotlar 25 U, 50 U, 75 U, 100 U, 1000 U, 2000 U, 4000 U ve 5000 U gibi farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak, amperometrik yanıtları tespit edilmiştir.

4.2.5.4 TiO₂ nanopartikül optimizasyonu

TiO₂ nanopartikül optimizasyonu için Jelatin-Aljinat oranı 1 (w/w), SOD konsantrasyonu (100 U) ve glutaraldehit çapraz bağlayıcı konsantrasyonu (0.004 M) sabit tutularak 0.0001 – 0.0005 g aralığında TiO₂ nanopartikül miktarları denenmiştir.

4.2.5.5 Ksantin konsantrasyonu

Jelatin-Aljinat oranı 1 w/w, SOD konsantrasyonu 100 U, TiO₂ miktarı 0,0004 g ve glutaraldehit konsantrasyonu 0,004 M olarak hazırlanan elektrot ile farklı ksantin konsantrasyonlarında ölçümler alınmıştır. Ksantin konsantrasyonunun 0,0009-2 mM aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

4.2.5.6 pH optimizasyonu

pH optimizasyonu için 0.05 M pH 5.5, 6.5, 7.4, 9.0, 10.0 olan tamponlar hazırlanmıştır. pH 5.5 ile 6.5 olarak asetat tamponu, pH 7.4 değerinde fosfat tamponu ve pH 9.0 ve 10.0 olacak şekilde ise karbonat tamponları kullanılmıştır.

4.2.5.7 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörün tekrar üretilebilirliği

Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin araştırılması için 6 elektrot hazırlanarak her elektrotla 2 mM ksantine karşı +0.65 V'da amperometrik

ölçüm alınmıştır ve alınan cevapların % relatif standart sapması hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir. Relatif standart sapma aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$RSD = \frac{\text{standartsapma}}{\text{ortalama deger}} \times 100\% \quad (4.4)$$

4.2.5.8 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörün kullanım süresi

Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörün kullanım süresinin araştırılması için 3 elektrot hazırlanmış ve 10 gün boyunca her gün 2 mM ksantine karşı +0.65 V'da amperometrik ölçümler alınmıştır. Her kullanımdan sonra elektrotlar fosfat tamponu (0.05 mM pH 7.4) ile yıkanarak bir sonraki kullanıma kadar +4°C'de tampon içinde saklanmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları ile geliştirilen biyosensörün kullanım süresi belirlenmiştir.

4.2.5.9 Biyosensörün elektrokimyasal davranışı

Geliştirilen biyosensör ile döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) çalışmaları yapılmıştır. Her immobilizasyon aşaması için ayrı immobilize elektrotlar hazırlanarak impedans ve CV'leri alınarak elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Ayrıca Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD ve Jelatin-Aljinat-SOD biyosensörler ile 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 mVs⁻¹ tarama hızlarında çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen grafiklerden ks ve α değerleri hesaplanarak literatür ile kıyaslanmıştır.

4.2.5.10 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

Hazırlanan Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD ve Jelatin-Aljinat-SOD biyosensörleri ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksantin çözeltilerin +0.65 V'da ölçümleri alınmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları ksantin derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Oluşturulan grafiklerden algılama limitleri, lineer aralıkları ve duyarlılıkları belirlenmiştir. Bu

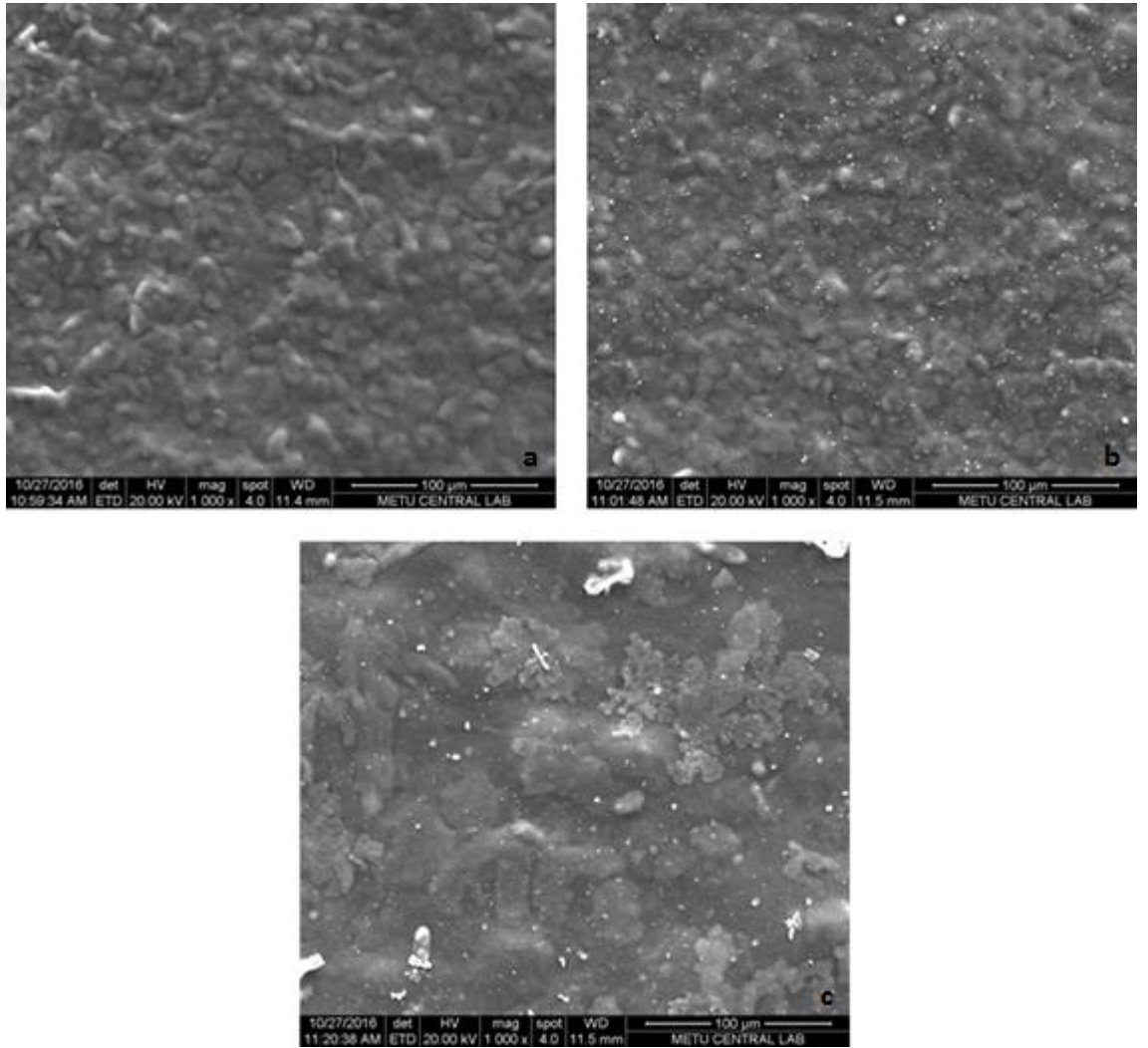
Çalışma esnasında elektrotlar kullanılmadıkları sürelerde pH 7.4 fosfat tamponunda buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmiştir.



5. BULGULAR

5.1 SEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi

Jelatin-Aljinat, Jelatin-Aljinat-TiO₂ ve Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD filmlerinin morfolojileri SEM ile görüntülenmiştir. Morfolojilerini incelemek için kullanılan SEM görüntülerinin çalışma potansiyerli 20 kV'dır.

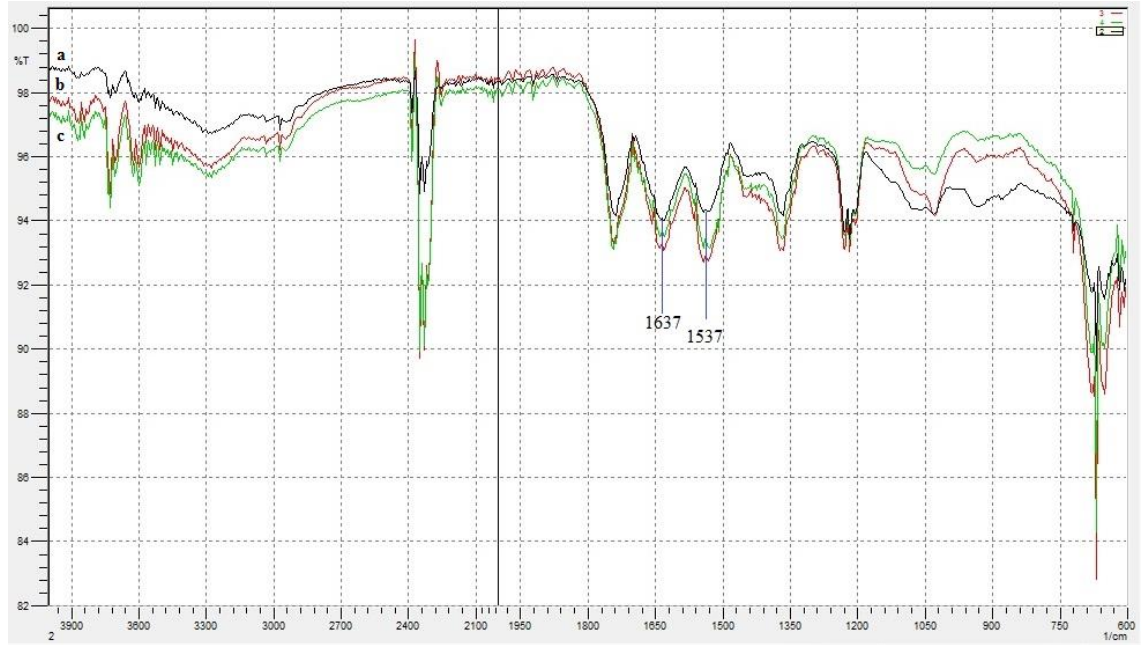


Şekil 5.1.a. Jelatin-Aljinat, b. Jelatin-Aljinat-TiO₂, c. Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD SEM mikrografları

Şekil 5.1.a'dan da görülebileceği üzere Jelatin-Aljinat düzgün bir yüzey filmi oluşturmuştur. Jelatin-Aljinat filmine TiO_2 ilave edilmesiyle oluşturulan filmin (Şekil 5.1.b) yüzey alanının nanopartiküllerin etkisiyle arttığı görülmektedir. Jelatin-Aljinat- TiO_2 filmine SOD immobilizasyonu ile (Şekil 5.1.c) enzimin immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

5.2 FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

SOD enziminin polimerik matrikse başarılı immobilizasyonunu kanıtlamak için Jelatin-Aljinat- TiO_2 , Jelatin-Aljinat-SOD ve Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD filmlerinin FT-IR spektrumları alınmıştır. Yaklaşık 1028 cm^{-1} 'de yer alan pik, aljinatın polisakkarit yapısından kaynaklanan C-O-C gerilmesini yansıtmaktadır. 1637 cm^{-1} 'deki band, amit I peptit bağlarındaki C-O gerilim titreşimleridir. 1537 cm^{-1} 'deki band, amit II polipeptit zincirlerinin N-H eğilmesine ve C-N gerilmesine aittir (Wang vd. 2013). Jelatin-Aljinat karışımına SOD enziminin immobilizasyonu ile amit I ve amit II pik şiddetindeki artış, enzimin polimer matrikse başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir.



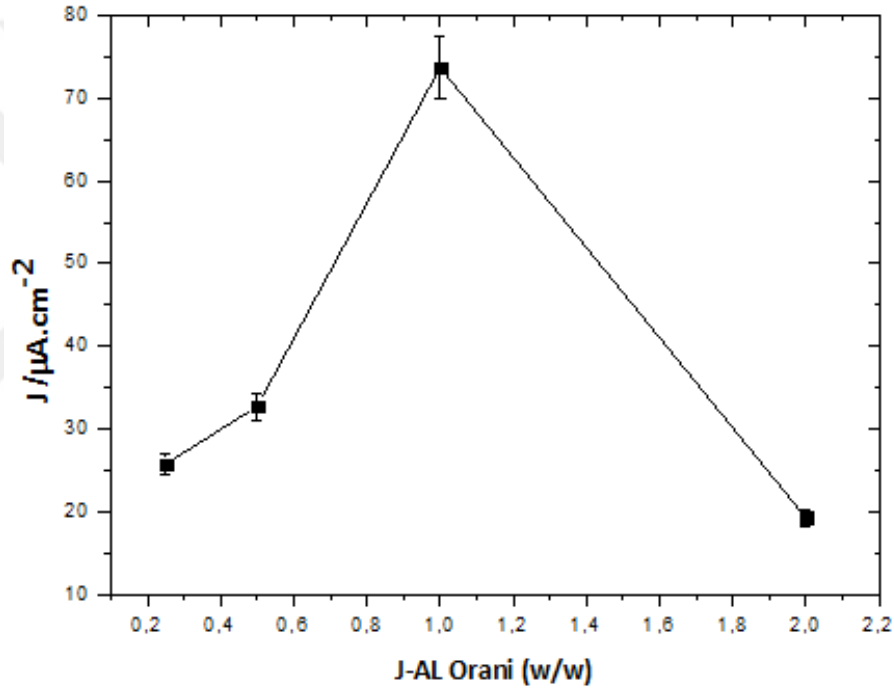
Şekil 5.2 FT-IR spektrumları

a. Jelatin-Aljinat- TiO_2 , b. Jelatin-Aljinat-SOD, c. Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD

5.3 Optimizasyon Çalışmaları

5.3.1 SOD aktivitesi üzerine J-AL oranlarının etkisi

Elektrot yüzeyine Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemi kullanılarak SOD immobilize edilmiştir. Değişik J-AL oranları (0,25 - 2 w/w) kullanılarak immobilizasyonda en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır. Değişik J-AL oranlarının optimizasyon grafikleri şekildeki gibi bulunmuştur (Şekil 5.3).

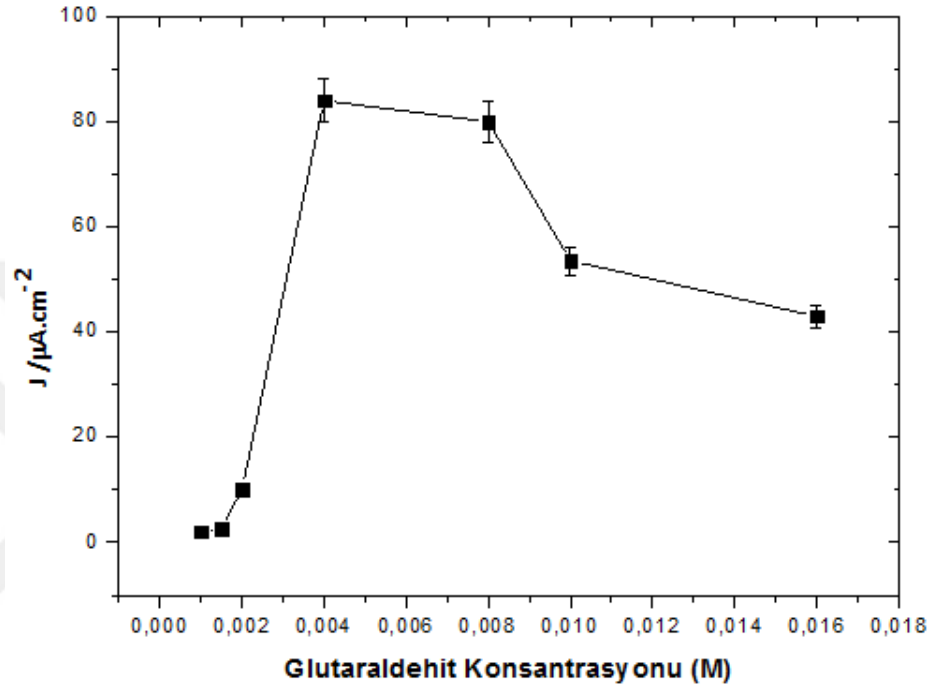


Şekil 5.3 Jelatin-Aljinat oranı miktarının biyosensör cevabına etkisi

Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi J-AL oranı 1 (w/w) olarak belirlenmiştir. Yüksek oranlarda, gözenek yapısındaki değişikliğe bağlı olarak elektron aktarımının azalmasına neden olarak duyarlılıkta düşüş gözlemlenmiştir. 0,25 ve 0.5 (w/w) oranlarında ise mekanik dayanıksızlık gözlemlenmiştir.

5.3.2 SOD aktivitesi üzerine glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi

Optimum çapraz bağlayıcı miktarının belirlenmesinde 0,001-0,016 M konsantrasyon aralığında glutaraldehit kullanılarak elektrotlar hazırlanmıştır (Şekil 5.4).

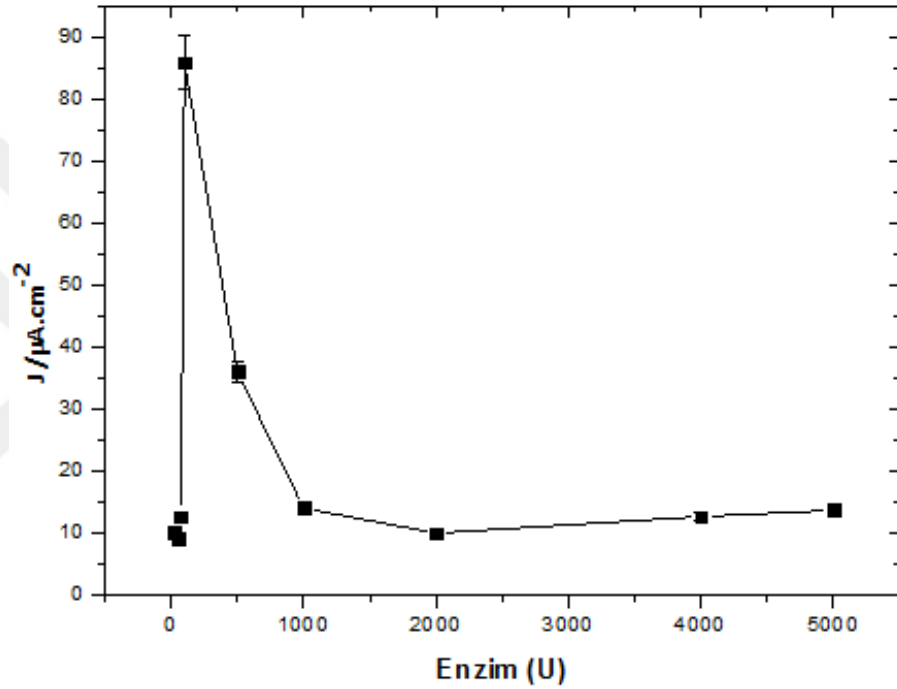


Şekil 5.4 GA molar oranının biyosensör cevabına etkisi

Optimum glutaraldehit konsantrasyonu 0,004 M olarak tespit edilmiştir. Glutaraldehit konsantrasyonlarındaki artış ile enzimin taşıyıcıya bağlanması artmış, bu da difüzyon sınırlamasına neden olmuştur. Yüksek glutaraldehit konsantrasyonu; enzim inaktivasyonuna, elektron aktarımının azalmasına ve buna bağlı olarak da duyarlılıkta düşüşe neden olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005). Düşük konsantrasyonlarda ise mekanik dayanıksızlık gözlenmiştir.

5.3.3 Enzim konsantrasyonu

Jelatin-Aljinat oranı, TiO_2 miktarı ve glutaraldehit konsantrasyonu sabit tutularak, farklı enzim konsantrasyonlarının akım yoğunluğuna etkisi araştırılmıştır. 25-5000 U aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında elektrotlar hazırlanarak amperometrik yanıtları incelenmiştir (Şekil 5.5).

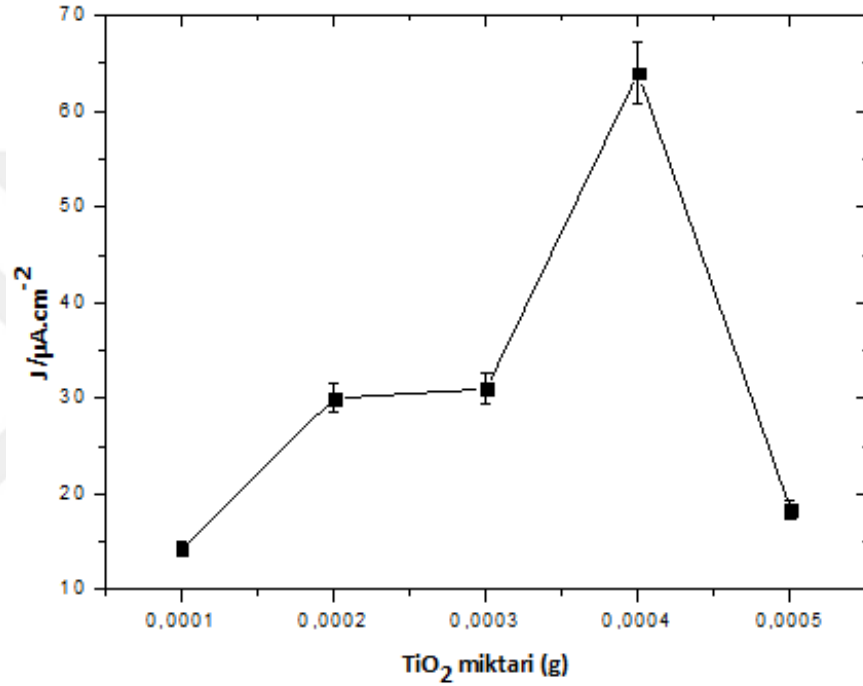


Şekil 5.5 J-AL-TiO₂-SOD elektrotlarında değişik enzim konsantrasyonlarının amperometrik cevaba etkisi

Enzim konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak, akım yoğunluğunda artış görülmüş ve maksimum akım yoğunluğu 100 U olarak bulunmuştur, yüksek konsantrasyonlarda ise düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş artan enzimlerin aralarındaki çapraz bağlanmasıyla açıklanabilir. Ayrıca artan enzim miktarı ile taşıyıcı gözeneklerinin aşırı doymuşlaşmasına sebep olarak ürün ve substratın difüzyonuna neden olmaktadır (Bayramoğlu vd. 1992, Emregül 2005).

5.3.4 TiO₂ nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi

Yüzey alanını artırarak SOD immobilizasyonunu geliştirmek ve elektron transfer hızını arttırıp tayin sınırı düşürmek amacıyla TiO₂ nanopartiküller kullanılmıştır. Bu amaç için TiO₂ nanopartikül miktarı optimize edilmiştir. Optimizasyon grafiği şekil 5.6'da gösterilmiştir.

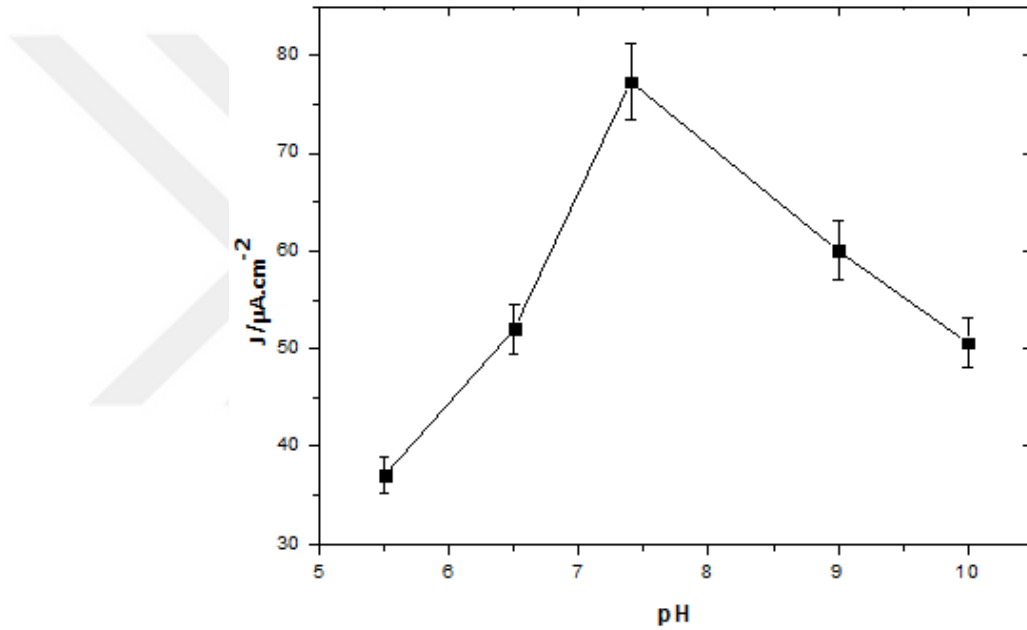


Şekil 5.6 TiO₂ nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi

Jelatin-Aljinat oranı miktarı (1 w/w) , SOD konsantrasyonu (100 U) ve GA çapraz bağlayıcı molar oranı (0.004 M) sabit tutularak 0.0001 - 0.0005 g aralığında TiO₂ eklenerek Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörleri elde edilmiştir. +0.65 V'da alınan ölçümlerden elde edilen akım yoğunlukları nanopartikül miktarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafikten optimum nanopartikül miktarı 0.0004 g olarak belirlenmiştir. Düşük nanopartikül miktarları yüzey alanını gerektiği kadar arttıramazken çok fazla nanopartikül miktarları ise polimer yüzeyini tamamen kaplayarak direnci arttırmakta ve elektron transferini inhibe etmektedir.

5.3.5 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi

Ortamın pH'sı elektrokimyasal ve enzimatik reaksiyonlarda enzimin aktivitesini sürdürebilmesi için oldukça önem arz etmektedir. Enzimler pH değişimlerinden etkilenmektedirler. Ortamın pH'sının belirlenmesi amacıyla 5.5, 6.5, 7.4, 9.0 ve 10.0 pH değerlerinde 0.05 M tampon çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiğinde ölçümler alınarak elde edilen akım yoğunlukları pH'a karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.7).

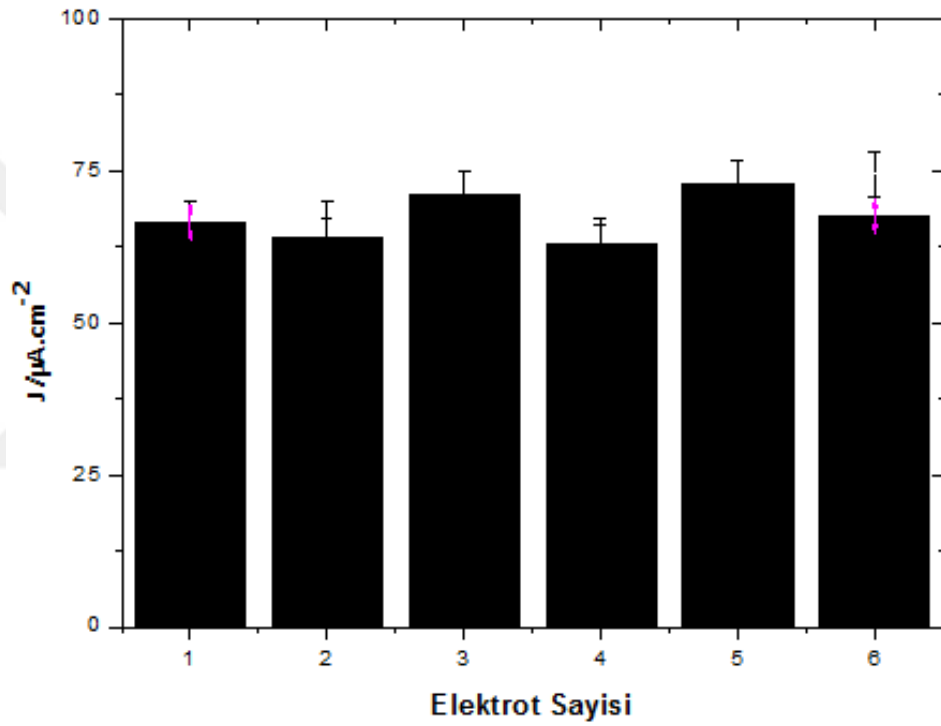


Şekil 5.7 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi

Düşük ve yüksek pH değerlerinde enzim aktivitesi hidrojen bağları, pi-pi istiflenmesi, disülfid köprüleri ve elektrostatik etkileşimlerin sebep olduğu aktif merkez yapısındaki değişimlerden olumsuz etkilenmektedir (Fatoni vd. 2013). Literatürde SOD enzimi için optimum pH 7.4 olarak çalışmalar yapılmıştır (Zhu vd. 2016). Geliştirilen SOD biyosensör için optimum pH'sı 7.4 olarak bulunmuştur.

5.4 Tekrar Üretilirlik

Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrodun optimum koşulları sağlandıktan sonra tekrar üretilirliğinin tespiti için 6 adet elektrot hazırlanmıştır. Elektrotlar +4°C’de bekletildikten sonra 2 mM ksantin ilavesi ile amperometrik ölçümler alınmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanarak elde edilen akım yoğunlukları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.8).



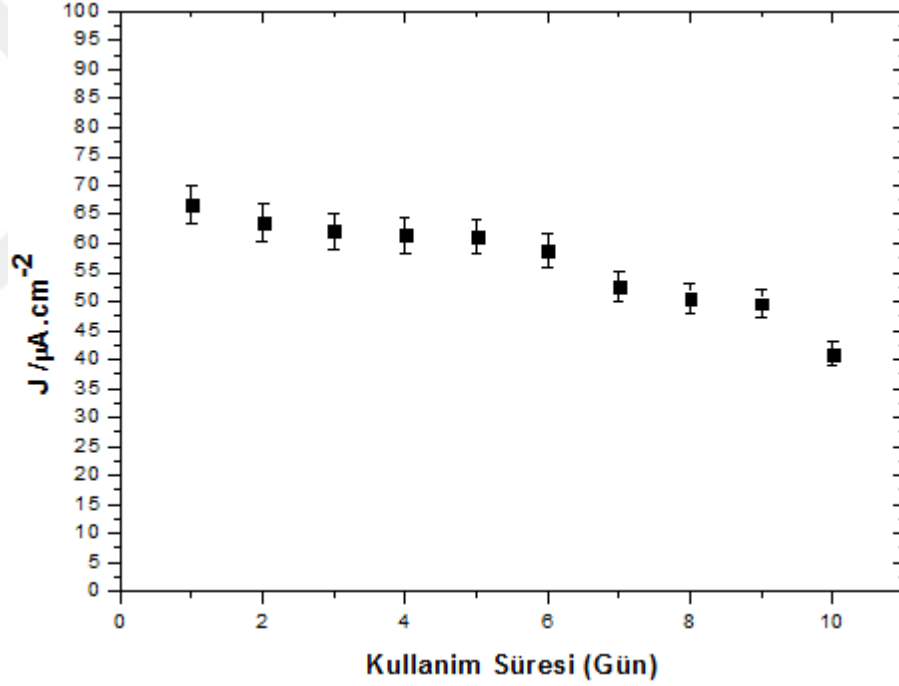
Şekil 5.8 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrodun tekrar üretilirlik grafiği

Grafiğe göre ortalama değer 67.53 ve relatif standart sapma ise % 5.82 olarak bulunmuştur. % relatif standart sapmaları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$RSD = \frac{\text{standartsapma}}{\text{ortalamadeğer}} \times 100\% \quad (5.1)$$

5.5 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD Biyosensörün Kullanım Süresi

İmmobilizasyon koşullarının optimize edilmesinden sonra Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrodun kullanım süresi tespit edilmiştir. Çalışmada 3 elektrot hazırlanarak 10 gün boyunca her gün 2 mM Ks ilave edilmesi suretiyle +0.65 V'da amperometrik ölçümler alınmıştır. Kullanım sonrası elektrotlar pH 7.4 fosfat tamponu ile yıkanarak buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Elde edilen akım yoğunlukları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.9). Geliştirilen biyosensörün yanıtı 10. gün sonunda % 61.56'ya düşmüştür. Jelatin-aljinat-TiO₂-SOD biyosensörünün sinyalindeki düşüşün nedeni TiO₂ nanopartiküllerinin polimer film yapısını belirli bir süre sonra bozmasıdır.



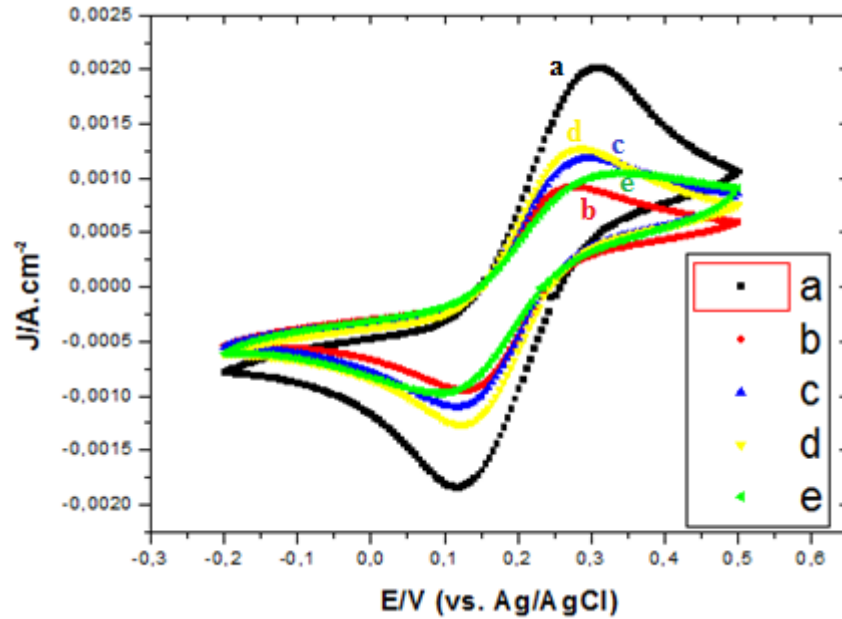
Şekil 5.9 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörün kullanım süresi

5.6 Geliştirilen Biyosensörün Elektrokimyasal Davranışı

5.6.1 Döngüsel voltametri (CV)

Döngüsel voltametri yöntemi ile biyosensörün her immobilizasyon basamağının elektrokimyasal davranışları gözlemlenmiştir. Ölçümler 0.05 M fosfat tamponu, 0.1 M KCl çözeltisi ve 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında alınmıştır. Tarama hızı 100 mVs^{-1} 'dir.

Şekil 5.10'da çıplak elektrodun (a), Jelatin-Aljinat-SOD film kaplı elektrodun (b), Jelatin-Aljinat modifiye elektrodun (c), Jelatin-Aljinat- TiO_2 film kaplı elektrodun (d) ve Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD film kaplı elektrodun (e) dönüşümlü voltamogramları verilmiştir.



Şekil 5.10 Jelatin-Aljinat enzim sensörün dönüşümlü voltamogramı

Çıplak elektrottan geçen akım yoğunluğu 0.0020 A.cm^{-2} iken elektrot yüzeyine jelatin ve aljinat ile modifiye edilmesiyle oluşan akım yoğunluğu 0.0011 A.cm^{-2} değerindedir. Akım yoğunluğundaki azalma jelatin ve aljinatın elektrot yüzeyine immobilize edildiğini göstermektedir. Jelatin-Aljinat film TiO_2 nanopartiküller ile modifiye edilerek

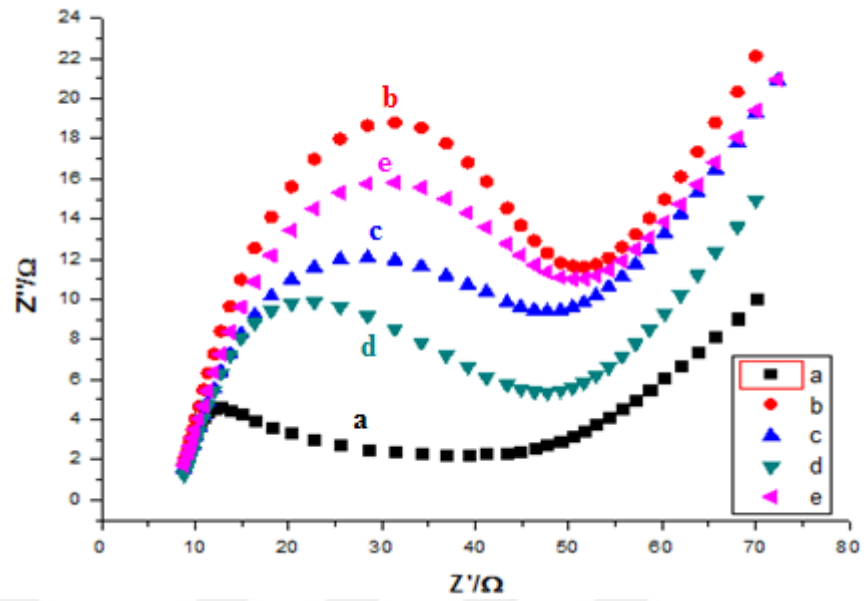
elektrottan geçen yük yoğunluğunda artışın meydana gelmesi nanopartiküllerin elektron aktarımını sağlamak sureti ile akımda artışa neden olduğunu göstermiştir. Jelatin-Aljinat filme SOD enzimi immobilize edilmesiyle akım yoğunluğu en düşük seviyeye ulaşmıştır. Bu düşüş enzimin Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemine başarılı bir şekilde immobilize edilerek ekstra bir direnç oluşturduğunu kanıtlamaktadır. SOD immobilize Jelatin-Aljinat film TiO_2 nanopartikülleri ile modifiye edilerek oluşan akım artışı nanopartiküllerin elektron aktarımına katkı sağladıklarını göstermektedir.

Formal potansiyeller ($E'_0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$) Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-SOD elektrotlar için sırasıyla 208 mV ve 201 mV olarak hesaplanmıştır. TiO_2 ilave edildiğinde Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun formal potansiyeli 216 mV olarak bulunmuştur. Pik ayrımları ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-SOD elektrotlar için sırasıyla 178 mV ve 152 mV'dur. TiO_2 ilavesiyle Jelatin-Aljinat-SOD film elektrodun pik ayrımı 246 mV olarak bulunmuştur. Azalan pik ayrımı nanobiyokompozit modifiye elektrotta hızlı elektron transferinin meydana geldiğinin bir göstergesidir (Zuo vd. 2008, Palanisamy vd. 2014).

5.6.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi modifiye elektrot yüzeylerinin karakteristiklerinin incelenmesine olanak sağlayan etkili elektrokimyasal bir yöntemdir. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarındaki yüzey karakteristiklerini gözlemlemek için 0.05 M Fosfat tamponu, 0.1 M KCl çözeltisi ve 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında EIS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5.11'de çıplak elektrodun (a), Jelatin-Aljinat-SOD nanokompozit kaplı elektrodun (b), Jelatin-Aljinat modifiye elektrodun (c), Jelatin-Aljinat- TiO_2 film kaplı elektrodun (d) ve Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD film kaplı elektrodun (e) impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği verilmiştir.



Şekil 5.11 Biyosensörün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği

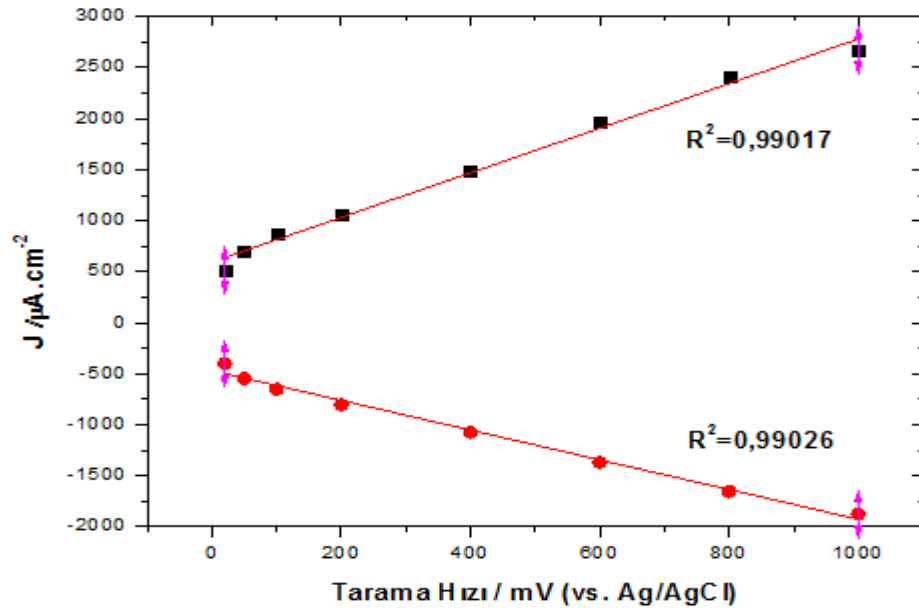
Çıplak elektrot yüzeyi Jelatin-Aljinat ile kaplanması ile meydana gelen yük transfer direncindeki Jelatin-Aljinat elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde kaplanarak yalıtkan bir etki sağlamıştır. Jelatin-Aljinat filmine TiO_2 nanopartikül modifiyesi ile yük transfer direncinde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş nanopartiküllerin yüzey alanını arttırarak elektron transferini desteklediğini kanıtlamaktadır. Jelatin-Aljinat-SOD filmin çıplak elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile yük transfer direnci Jelatin-Aljinat filminden de yüksek seviyeye çıkmıştır. Bu artış SOD'un elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize ile ekstra bariyer oluşturarak direncin artmasına neden olduğunu göstermektedir. Jelatin-Aljinat-SOD filmi TiO_2 nanopartiküller ile modifiyesi sonucunda ise nanopartiküllerin yüzey alanı arttırıcı ve elektron transferini destekleyici özellikleri sayesinde yük transfer direncinde Jelatin-Aljinat-SOD filmine oranla bir azalma görülmüştür.

5.6.3 Tarama hızı çalışması

Tarama hızı çalışmasında 2 farklı sistemle çalışılmıştır. CV'ler Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrotla 5 mM [Fe(CN)₆^{4-/3-}] varlığında; Jelatin-Aljinat-SOD elektrotla 5 mM [Fe(CN)₆^{4-/3-}] varlığında 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 mVs⁻¹ şeklinde farklı tarama hızlarında alınmıştır.

5.6.3.1 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrodun [Fe(CN)₆^{4-/3-}] varlığında tarama hızı çalışması

Şekil 5.12'den açıkça anlaşıldığı gibi redoks pik akımları artan tarama hızı ile doğrusal olarak artmaktadır. Anodik pik için; $I_{pa}/\mu A = (595.283 \pm 43.259) + (2.185 \pm 0.082)v/mV s^{-1}$, eğim; $(2.185 \pm 0.082) \mu A (V s^{-1})^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Katodik pik için; $I_{pc}/\mu A = -(469.215 \pm 28.679) - (1.455 \pm 0.054)v/mV s^{-1}$, eğim; $-(1.455 \pm 0.054) \mu A (V s^{-1})^{-1}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.12 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM [Fe(CN)₆^{4-/3-}] varlığında)

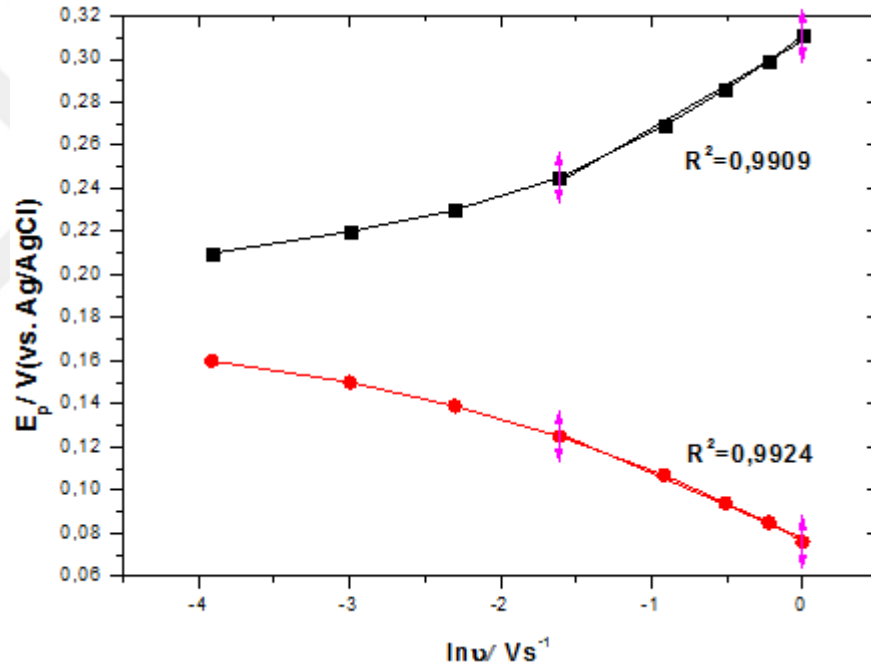
SOD'un elektron-transfer sabiti (k_s) ve elektron-transfer katsayısı (α_s) Laviron teorisine göre hesaplanmıştır (Laviron 1979):

$$E_{pc} = E^0 + \frac{RT}{\alpha s n F} - \frac{RT}{\alpha s n F} \ln v$$

$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1 - \alpha s) n F} - \frac{RT}{(1 - \alpha s) n F} \ln v$$

(5.2)

Denklemden; n elektron sayısı, R gaz sabiti ($R=8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T sıcaklık ($T= 298 \text{ K}$) ve F Faraday sabitidir ($F= 96493 \text{ }^\circ\text{C mol}^{-1}$).

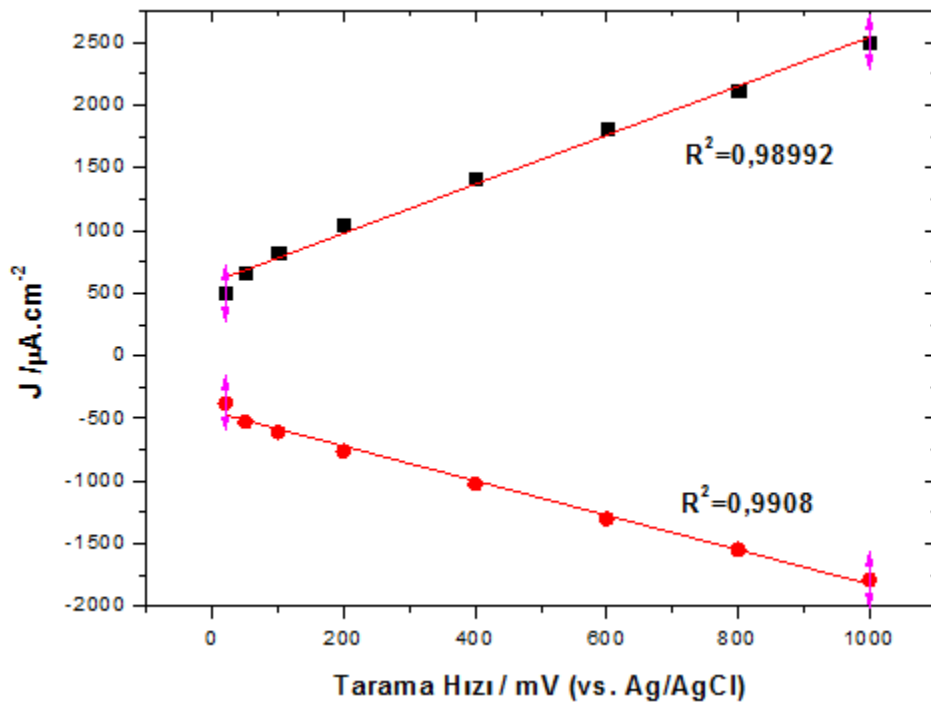


Şekil 5.13 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrodun tarama hızının doğal logaritmasına karşı pik potansiyelleri grafiği (5 mM [Fe(CN)₆^{4-/3-}] varlığında)

Şekil 5.13'de tarama hızı çalışmalarındaki veriler ile elde edilen E_{pa} ve E_{pc} değerleri tarama hızının doğal logaritmasına karşı grafiğe geçirilmiş ve grafiğin denklemi anodik pik için $E_{pa}/\text{V} = (0.308 \pm 0.001) + (0.04 \pm 0.001) \ln v/\text{Vs}^{-1}$, katodik pik için ise $E_{pc}/\text{V} = -(0.077 \pm 0.001) - (0.03 \pm 0.001) \ln v/\text{Vs}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrot için [Fe(CN)₆^{4-/3-}] varlığında yapılan tarama hızı çalışmaları ile k_s ve α değerleri hesaplanmıştır. $k_{sa}=2,461 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_a=0,632$ ve $k_{sc}=1,433 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_c=0,368$ olarak hesaplanmıştır.

5.6.3.2 Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında tarama hızı çalışması

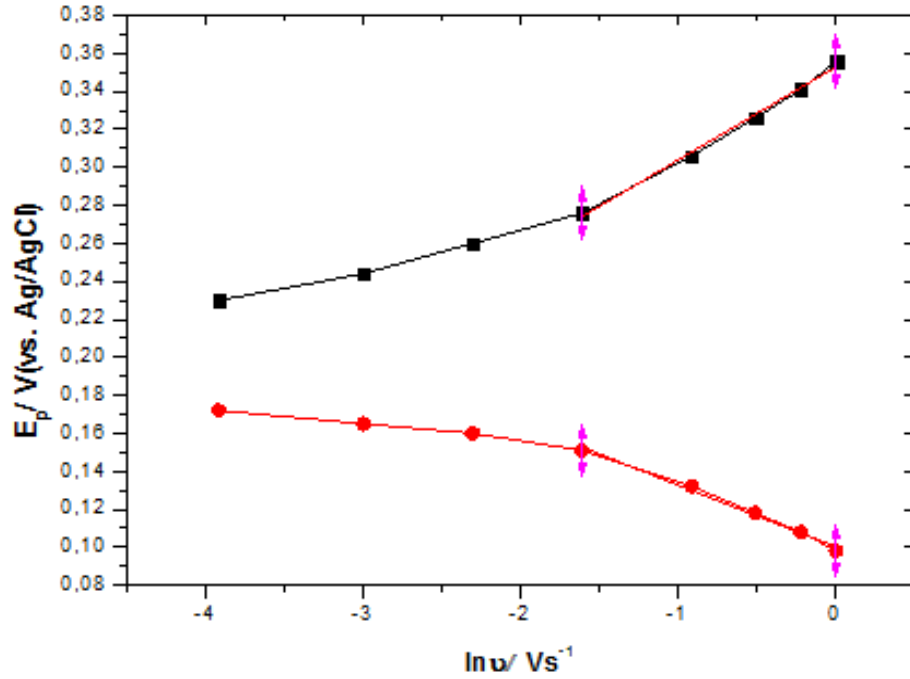
5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun tarama hızı çalışmasında anodik pik için elde edilen denklem $I_{pa}/\mu\text{A} = (586,77 \pm 39,204) + (1,955 \pm 0.074)v/\text{mVs}^{-1}$ olarak, katodik pik için ise; $I_{pc}/\mu\text{A} = -(445,98 \pm 26,38) - (1.377 \pm 0.050)v/\text{mVs}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.14 Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun değişen tarama hızlarındaki anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında)

Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında yapılan tarama hızı çalışmalarından elde edilen E_{pa} ve E_{pc} değerleri Şekil 5.15'e göre hesaplanmıştır. $E_{pa}/V = (0.352 \pm 0.001) + (0.049 \pm 0.002) \ln v/\text{Vs}^{-1}$, katodik pik için ise $E_{pc}/V = -(0.100 \pm 0.001) - (0.032 \pm 0.001) \ln v/\text{Vs}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Hesaplanan k_s ve α değerleri $k_{sa} = 2,040 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_a = 0,524$ ve $k_{sc} = 1,853 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_c = 0,476$ olarak bulunmuştur.

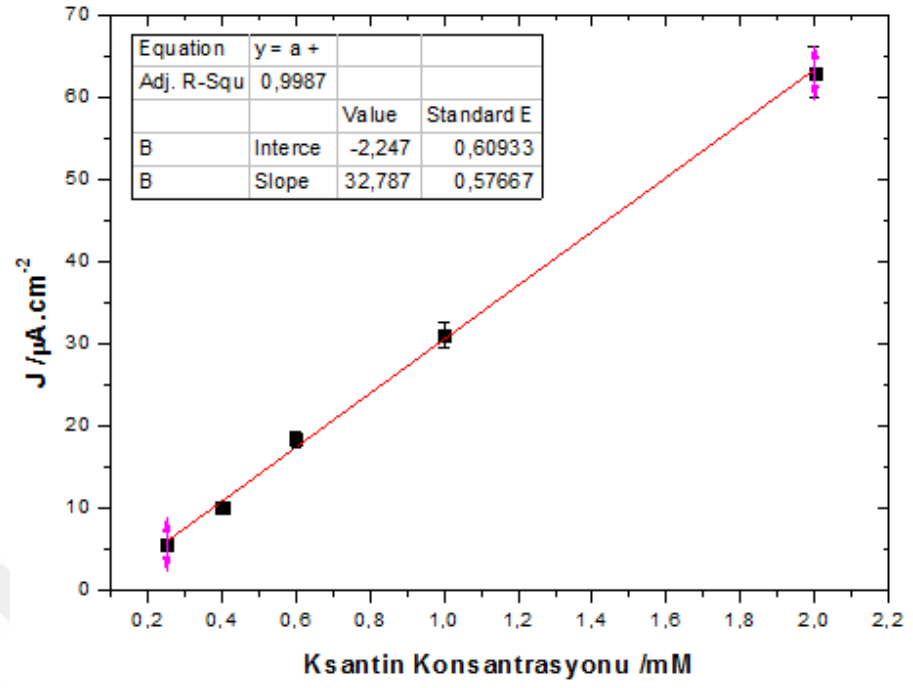
TiO₂ nanopartikülü içeren elektrot, nanopartiküllerin yüzey alanı arttırıcı ve elektron transferini destekleyici özelliği sayesinde daha yüksek k_s değerine ulaşmıştır.



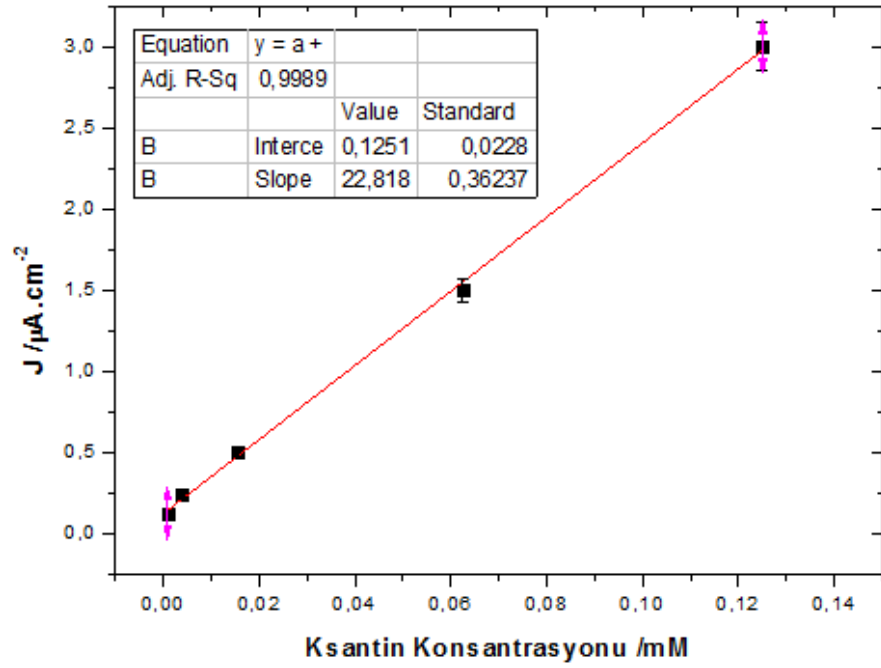
Şekil 5.15 Jelatin-Aljinat-SOD elektrodun tarama hızının doğal logaritmasına karşı pik potansiyelleri grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ varlığında)

5.7 Ksantin Konsantrasyonu

Jelatin-Aljinat oranı 1 w/w, enzim miktarı 100 U, nanopartikül miktarı 0,0004 gr ve glutaraldehit konsantrasyonu 0,004 M olan immobilize SOD elektrotu ile değişik K_s konsantrasyonları (0,0009-2 mM) denenmiş ve cevabı tespit edilmiştir (Şekil 5.16, Şekil 5.17).



Şekil 5.16 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörünün yüksek konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği

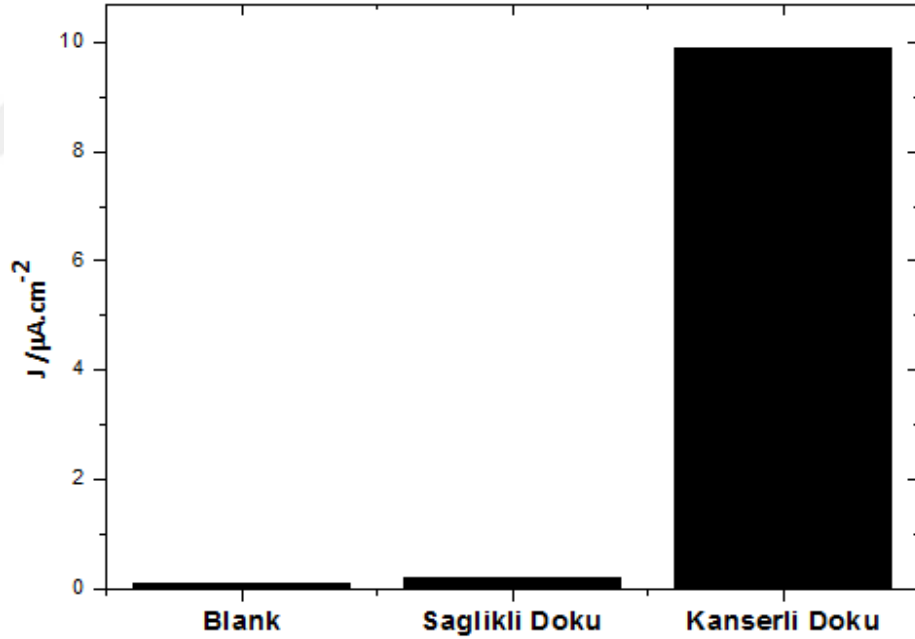


Şekil 5.17 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörünün düşük konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği

J-AL-TiO₂-SOD biyosensörünün cevabı O₂^{•-} konsantrasyonu ile orantılı olup R² değeri düşük konsantrasyon aralığı için 0,9989 ve yüksek konsantrasyon aralığı için ise 0,9987 olarak bulunmuştur. Tayin sınırı 0,9 µM olarak tespit edilmiştir.

5.8 Sağlıklı ve Kanserli Dokular Üzerine Testler

Sağlıklı ve kanserli meingioma (grade I, who 2,000, A.Ü. Beyin ve Sinir Cerrahisi, Doç. Dr Ayhan ATTAR'dan alınmıştır.) beyin dokusu üzerinde biyosensör yanıtı test edilmiştir. Fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,4) içeren hücrede J-AL-TiO₂-SOD biyosensörü kararlı hale getirildikten sonra homojenize sağlıklı ve kanserli doku içeren çözeltilerden ilave edilmiş ve sinyaldeki değişim tespit edilmiştir (Şekil 5.18). Sağlıklı dokuya göre, kanserli beyin dokusu büyük miktarda O₂^{•-} içerdiği belirlenmiştir.



Şekil 5.18 Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD biyosensörünün sağlıklı ve kanserli doku ilavesi ile değişimi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, süperoksit radikallerinin tayini için spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay sonuç verecek SOD biyosensörünün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç için J-AL taşıyıcı sisteminin TiO_2 nanopartikülleri ile enzim immobilizasyonu için uygun hale getirilerek glutaraldehit ile çapraz bağlanması sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasında $\text{O}_2^{\bullet-}$ tayini için J-AL- TiO_2 -SOD biyosensörü geliştirilmiştir. Biyosensörün geliştirilmesi için amperometrik ölçüm koşulları ile her parametrenin optimum koşulları belirlenmiştir. Polimer oranı miktarı, enzim konsantrasyonu, nanopartikül miktarı ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları optimize edilmiştir. Ayrıca optimum koşullarda pH, raf ömrü ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri de çalışılmıştır. Optimum koşullar sağlandıktan sonra yüzey morfolojileri SEM ile incelenmiştir. Enzimin immobilizasyonunun başarısı FT-IR spektrumları ile kanıtlanmıştır. Ayrıca EIS ve CV yöntemleri ile biyosensörün elektrokimyası çalışılmıştır.

İlk olarak taşıyıcı matriks için optimum miktarların belirlenmesi için (0,25–2 w/w) farklı polimer oranları ile elektrotlar hazırlanmıştır ve en uygun polimer oranı miktarı 1 w/w olarak bulunmuştur.

TiO_2 nanopartiküllerinin optimizasyonu için 0,0001 – 0,0005 g aralığındaki değerleri içeren elektrotlar hazırlanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Optimum nanopartikül miktarı 0,0004 g olarak bulunmuştur. Düşük nanopartikül miktarları elektrot yüzeyini yeteri kadar arttırmazken yüksek miktarda ise polimer yüzeyinin kaplanması elektron transferi engellemiştir.

SOD konsantrasyonunun optimizasyonu için (25-5000 U) farklı konsantrasyonlarda ölçüm yapılarak optimum değer olarak 100 U bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlardaki yanıtlardaki düşüş enzimin sık istiflenmesi sonucu konformasyonel bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Literatürde 4733 U (Kocabay vd. 2012), 15 U (Wang vd. 2013),

9 U (Zhu vd. 2015) şeklinde SOD konsantrasyonları kullanılmış çalışmaları bulunmaktadır.

Enzimin taşıyıcı matrikse çapraz bağlanması için kullanılan glutaraldehitin optimizasyonu için 0,001-0,016 M aralığında elektron hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0,004 M olarak bulunmuştur. Düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında mekanik verimlilik sağlanmadığından dolayı elde edilen yanıtlar düşük olmakta, yüksek konsantrasyonlarda ise enzim inaktivasyonuna neden olarak elektron aktarımının azalmasına neden olmuştur. Kocabay vd. (2012) yapmış oldukları çalışmada çapraz bağlayıcı konsantrasyonu olarak 0,005 M değerini bulmuşlardır.

Enzim aktivitesinin sürdürülebilmesi için farklı pH (5.5-10 pH) değerlerinde hazırlanan tampon çözeltilerde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Optimum çalışma değeri olarak pH 7.4 belirlenmiştir. Wang vd. (2013) yapmış olduğu çalışmada, optimum değer olarak pH 7.0 bulmuşlardır. Wang vd. (2013) çalışmasında pH 7.4 olarak çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Zhu vd. (2015) yapmış olduğu çalışmada ise optimum pH olarak 7.4 değerini bulmuşlardır.

Tekrar üretilebilirlik çalışması için hazırlanan elektrotlar ile ölçümler alınarak % relatif standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen % 5.82 değeri biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir. Wang vd. (2013) yaptıkları çalışmada, % relatif standart sapma değeri olarak % 4.4 bulmuşlardır. Wang vd. (2013) çalışmasında, % relatif standart sapma değerini % 4.1 olarak bulmuşlardır. Zhu vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada, % relatif standart sapma değerini % 2.8 olarak bulmuşlardır.

Biyosensörün kullanım süresi çalışmasında ise hazırlanan elektrotlar ile 10 gün boyunca ölçümler alınmıştır. Geliştirilen biyosensör yanıtının 10. gün sonunda aktivitesi % 61.56 ya düşmüştür. Kocabay vd. (2012) yaptığı çalışmada, kullanım süresi olarak 80 gün bulunmuştur. Kullanılan nanopartiküller kararlılık özelliğinin daha kolay bozulmasına neden olmuştur. Wang vd. (2013) yaptıkları çalışmada, 44 gün sonunda ilk günkü

aktivitesinin %87'sini koruduğunu tespit etmişlerdir. Zhu vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada, 30 gün sonunda aktivitesinin % 97'sini koruduğunu tespit etmişlerdir.

Biyosensörün immobilizasyon basamakları için elektrotlar hazırlanarak CV ve EIS çalışmaları ile elektrokimyasal karakteristikleri incelenmiştir. Çıplak elektrottan geçen akım yoğunluğu 0.0020 A.cm^{-2} iken elektrot yüzeyine jelatin ve aljinat ile modifiye edilmesiyle oluşan akım yoğunluğu 0.0011 A.cm^{-2} değerine düşmüştür. SOD enzim ile modifiye sonrasında bu değer daha da azalmıştır. TiO_2 nanopartikül modifiyesi ile akım yoğunluğunda artış gözlenmiştir. Bu artış nanopartiküllerin yüzey alan arttırıcı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Yapılan CV çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile formal potansiyel ve pik ayrımları hesaplanmıştır. Jelatin-Aljinat, Jelatin-Aljinat-SOD ve Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD elektrotlar için hesaplanan formal yük sırası ile 208 mV, 201 mV ve 216 mV olarak bulunmuştur. Pik ayrımları ise sırasıyla 178 mV, 152 mV ve 246 mV olarak hesaplanmıştır.

Tarama hızı çalışmalarında iki farklı sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında ve 0,1 M KCl içerisinde 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 mVs^{-1} tarama hızlarında ölçümler yapılmıştır. Elde edilen katodik ve anodik pikler tarama hızına karşı grafiğe geçirilmiştir. Tarama hızının artması ile pik akımlarının da doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler: Anodik pik için, $I_{pa}/\mu\text{A} = (595.283 \pm 43.259) + (2.185 \pm 0.082)v/\text{mV s}^{-1}$; katodik pik için, $I_{pc}/\mu\text{A} = -(469.215 \pm 28.679) - (1.455 \pm 0.054)v/\text{mV s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Jelatin-Aljinat-SOD elektrotla 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varlığında yapılan ölçümler sonucunda elde edilen değerler ise: anodik pik için, $I_{pa}/\mu\text{A} = (586,77 \pm 39,204) + (1,955 \pm 0.074)v/\text{mVs}^{-1}$ olarak, katodik pik için, $I_{pc}/\mu\text{A} = -(445,98 \pm 26,38) - (1.377 \pm 0.050)v/\text{mVs}^{-1}$ olarak bulunmuştur. k_s ve α değerlerinin hesaplanması için E_{pa} ve E_{pc} değerleri tarama hızlarının doğal logaritmalarına karşı grafiğe geçirilerek yapılmıştır. Jelatin-Aljinat- TiO_2 -SOD elektrot için $k_{sa}=2,461 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_a=0,632$ ve $k_{sc}=1,433 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_c=0,368$ olarak hesaplanmıştır. Jelatin-Aljinat-SOD elektrot için $k_{sa}=2,040 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_a=0,524$ ve $k_{sc}=1,853 \text{ s}^{-1}$, $\alpha_c=0,476$ olarak bulunmuştur. TiO_2 nanopartikülü içeren elektrot, nanopartiküllerin yüzey alanı arttırıcı ve elektron transferini destekleyici özelliği sayesinde daha yüksek k_s değerine

ulaşmıştır. Wang vd. (2013) alışmasında, α ve k_s değerlerini sırsıyla 0.44 ve 4.7 s^{-1} olarak bulmuşlardır. Wang vd. (2013) alışmada, α ve k_s değerlerini $24 \pm 1.1 \text{ s}^{-1}$ ve 0.4 ± 0.04 olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon alışmalarında Jelatin-Aljinat-TiO₂-SOD elektrot + 0,65 V'da farklı ksantin konsantrasyonları ilave edilerek ölümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmadan iki lineer aralık belirlenmiştir. Düşük konsantrasyon lineer aralığı için 0,0009-0,125 mM ve algılama limiti olarak da 0,9 μM olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyon lineer aralığı ise 0,25-2 mM olarak belirlenmiştir. Literatürde 21 nM (Wang vd. 2013), 1,7 nM (Wang vd. 2013) ve 0,71 μM (Zhu vd. 2015) gibi çalışmalar bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D. and Collin, P. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74; 324–329.
- Ahmad, L.M., Towe, B., Wolf, A., Mertens, F. and Lerchner, J. 2010. Binding event measurement using a chip calorimeter coupled to magnetic beads. *Sens. Actuators B: Chem.*, 145(1); 239–245.
- Akyilmaz, E., Yorganci, E. and Asav, E. 2010. Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor and model for the solution. *Bioelectrochemistry*, 78(2); 155–160.
- Amatore, C., Arbault, S., Bruce, D., de Oliveira, P., Erard, M. and Vuillaume, M. 2000. Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst. *Faraday Discuss*, 116; 319–333.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, J.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90; 7915–7922.
- Ander, S. 1967. Studie on UV and x-irradiated water. *Strahlentherapie*, 132; 135–142.
- Andreescu, S., Bucur, B. and Marty, J.L. 2006. Affinity immobilization of tagged enzymes. *Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Biotechnology*, 22; 97–106.
- Andrew, L. 1969. Infrared spectra and bonding in the sodium superoxide and sodium peroxide molecules. *J. Phys. Chem.*, 73(11); 3922–3928.
- Anonymous. 2015. http://healthandwealthsuccess.blogspot.com.tr/p/the-cause-of-jan-10-posted-by_1.html, Erişim Tarihi: 15.09.2015
- Anonymous. 2015. www.andersonmaterials.com/electro.html, Erişim Tarihi: 15.09.2015
- Aruoma, O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicology*, 32(7); 671–683.
- Auchere, F. and Rusnak, F. 2002. What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo? *J Biol Inorg Chem.*, 7; 664–667
- Aust, S.D., Chignell, C.F., Bray, T.M., Kalyanaraman, B. and Mason, R.P. 1993. Free radicals in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 120(2); 168–78.
- Bafana A., Dutt S., Kumar S., and Ahuja P. S. 2011. Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1); 65–76.

- Balachandaran, K., Venckatesh, R. and Sivaraj, R. 2010. Synthesis of nano TiO₂-SiO₂ Composite Using Sol-Gel Method: Effect on Size, Surface Morphology and Thermal Stability. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(8); 3695-3700.
- Bano, T., Kumar, N. and Dudhe, R. 2012. Free radical scavenging properties of pyrimidine Derivatives. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2; 34-40.
- Bao, S.J., Li, C.M., Zang, J.F., Cui, X.Q., Qiao, Y. and Guo, J. 2008. New Nanostructured TiO₂ for Direct Electrochemistry and Glucose Sensor Applications. *Advanced Functional Materials*, 18(4); 591–599.
- Barbacanne, M., Souchard, J., Darblade, B., Iliou, J., Nepveu, F., Pipy, B., Bayard, F. and Arnal, J. 2000. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic. Biol. Med.*, 29(5); 388–396.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 1980. *Electrochemical Methods*, Wiley, New York.
- Bard A.J. and Faulkner L.R. 2001. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd edn. Wiley, New York.
- Barroso, M.F., de-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.B.P.P. and Tunon-Blanco, P. 2011. Electrocatalytic evaluation of DNA damage by superoxide radical for antioxidant capacity assessment. *J. Electroanal. Chem.*, 659(1); 43–49.
- Bayhan, Z. 2012. <https://zaferbayhan.files.wordpress.com/2012/04/elektroanalitik-kimya.pdf>, Erişim Tarihi: 15.09.2015
- Bayoudh, S., Othmane, A., Ponsonnet, L. and Ben, H. 2008. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber. *Colloids Surf., A*, 318(1-3); 291–300.
- Bayramoglu, Z., Akbulut, U. and Sungur, S. 1992. Immobilization of alpha-Amylase into Gelatin Films with Various Cross Linkers. *Biomaterials*, 13(10),704-708.
- Bernfeld, P. and Wan, J. 1963. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. *Science*, 142(3593); 678–679.
- Bertini, I., Mangani, S. and Viezzoli, M. S. 1998. Structure and Properties of Copper-zinc Superoxide Dismutase. *Adv. Inorg. Chem.*, 45; 127-250.
- Bhatta,D., Stadden, E., Hashem, E., Sparrow, I.J.G. and Emmerson, G.D. 2010. Multi-purpose optical biosensors for real-time detection of bacteria, viruses and toxins. *Sens. Actuators B: Chem.*, 149(1); 233 –238.

- Bierhalz, A.C.K., da Silva, M.A., Braga, M.E.M., Sousa, H.J.C. and Kieckbusch, T.G. 2014. Effect of calcium and/or barium crosslinking on the physical and antimicrobial properties of natamycin-loaded alginate films. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2); 494-501.
- Bonanni, A. and del Valle, M. 2010. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 678(1); 7–17.
- Bray, R.C., Pick, F.M. and Samuel, D. 1970. Oxygen-17 hyperfine splitting in the electron paramagnetic resonance spectrum of enzymically generated superoxide. *Eur. J. Biochem.*, 15(2); 352–355.
- Brena, B. and Batista-Viera, F. 2013. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Molecular Biology*, 1051; 15–31.
- Brodelius, P. and Mosbach, K. 1987. Immobilization Techniques for Cells/Organelles. In: *Methods in Enzymology*, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, 135; 173–454.
- Buchholz, K. and Klein, J. 1987. Characterization of Immobilized Biocatalysts. In: *Methods in Enzymology* (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, 135; 3–30.
- Buurma, N.J. and Haq, I. 2008. Calorimetric and spectroscopic studies of Hoechst 33258: self-association and binding to non-cognate DNA. *J. Mol. Biol.*, 381(3); 607–621.
- Bük, V. 2014. Aljinat-CuO-GOD Temelli Amperometrik Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Cabral, J.M.S. and Kennedy, J.F. 1991. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications* (Taylor, R.F. ed.), Marcel Dekker, New York, NY, 73–138.
- Cadenas, E. and Sies, H. 1998. The lag phase. *Free. Radic. Res.*, 28(6); 601–609.
- Cadenas, E. and Davies, K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 29(3-4); 222–230.
- Cagnin, S., Caraballo, M., Guiducci, C., Martini, P., Ross, M., Santaana, M., Danley, D., West, T. and Lanfranchi, G. 2009. Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life. *Sensors*, 9(4); 3122–3148.

- Campanella, L., Favero, G. and Tomassetti, M. 1997. A modified amperometric electrode for the determination of free radicals. *Sens. Actuators B: Chem.*, 44(1-3) 559–565.
- Campanella, L., Favero, G., Persi, L. and Tomassetti, M. 2000a. New biosensor for superoxide radical used to evidence molecules of biomedical and pharmaceutical interest having radical scavenging properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23(1); 69–76.
- Campanella, L., Persi, L. and Tomassetti, M. 2000b. A new tool for superoxide and nitric oxide radicals determination using suitable enzymatic sensors. *Sens. Actuators B: Chem.*, 68(1-3); 351–359.
- Campanella, L., De Luca, S., Favero, G., Persi, L. and Tomassetti, M. 2001. Superoxide dismutase biosensors working in non-aqueous solvent. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369(7-8); 594–600.
- Campanella, L., Bonanni, A., Favero, G. and Tomassetti M. 2003. Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(4-5); 725-736.
- Cepinskas, G., Rui, T. and Kvietys, P.R. 2002. Interaction between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance. *Free Radic Biol Med.*, 33; 433–440.
- Chambers, J. Bernard, P.A., Leann, L.M., Alex W. and James J.V. 2009. Biosensor Recognition Elements. *Current Issues of Molecular Biology*, 10; 1-10.
- Chen, C.X., West, A.C., Cropek, D.M. and Banta, S. 2008. Detection of the Superoxide Radical Anion Using Various Alkanethiol Monolayers and Immobilized Cytochrome c. *Anal. Chem.*, 80(24); 9622–9629.
- Cooper, M.A. 2003. Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377(5); 834–842.
- Cortina-Puig, M., Munoz-Berbel, X., Calas-Blanchard, C. and Marty, J.L. 2009. Electrochemical characterization of a superoxide biosensor based on the co-immobilization of cytochrome c and XOD on SAM-modified gold electrodes and application to garlic samples. *Talanta*, 79(2); 289-294.
- Curulli, A., Dragulescu, S., Cremisini, C. and Palleschi, G. 2001. Bioenzyme amperometric probes for choline and choline esters assembled with nonconducting electrosynthesized polymers. *Electroanalysis*, 13(3); 236-241.
- Daiber, A., Frein, D., Namgaladze, D. and Ullrich, V. 2002. Oxidation and nitrosation in the nitrogen monoxide/superoxide system. *J. Biol.Chem.*, 277(14); 11882–11888.

- Daiber, A. and Bachschmid, M. 2007. Enzyme inhibition by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration and thiol oxidation. *Curr. Enzyme Inhibit.*, 3(2); 103–117.
- Darley-Usmar, V. and Halliwell, B. 1996. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceut. Res.*, 13 (5); 649-662.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. and Davies, M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 324(1); 1–18.
- Del Río, L.A., Lyon, D.S., Olah, I., Glick, B. and Salin, M.L. 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta*, 158(3); 216–224.
- Derkuş, B. 2012. Anti-Miyelin Temelli Protein Tayini İçin İmpedimetrik İmmünoşansör Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Descroix, S. and Bedioui, F. 2001. Evaluation of the selectivity of overoxidized polypyrrole/superoxide dismutase based microsensor for the electrochemical measurement of superoxide anion in solution. *Electroanalysis*, 13(7); 524–528.
- Di, J., Bi, S. and Zhang, M. 2004. Third-generation superoxide anion sensor based on superoxide dismutase directly immobilized by sol–gel thin film on gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(11); 1479–1486.
- Díaz-González, M., de la Escosura-Muniz, A., González-García, M.B. and Costa-García, A. 2008. DNA hybridization biosensors using polylysine modified SPCEs. *Biosens. Bioelectron*, 23(9); 1340–1346.
- Dickinson, B.C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D.V. and Chang, C.J. 2011. Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nat. Chem.Biol.*, 7(2); 106–112.
- Dinelli, D., Marconi, W. and Morisi, F. 1976. Fiber-entrapped enzymes. *Methods in Enzymology* 44; 227–243.
- Diouani, M.F., Helali, S., Hafaid, I., Hassen, W.M., Snoussi, M.A. and Ghram, A. 2008. Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection. *Mater. Sci. Eng., C*, 28(5-6); 580–583.
- Diplock, A. 1998. Defense against reactive oxygen species. *Free Radic Res.*, 29(6); 463-467.
- Dogan, M. 2001. Sulu ortamda Perlit'in yüzey yükünün ve adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

- Droillard, M.J. and Paulin, A. 1990. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol.*, 94(3); 1187–1192.
- Ellis, J., Castillo, E.D., Bayon, M., Grimm, R., Clark, J.F., Pyne-Geithman, G., Wilbur, S. and Caruso, J.A. 2008. A preliminary study of metalloproteins in CSF by CapLC-ICPMS and NanoLC-CHIP/ITMS. *J. Proteome Res.*, 7(9); 3747–3754.
- Elzoghby, A.O., Samy, W.M. and Elgindy, N.A. 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J Control Rel.*, 161(1); 38–49.
- Emregül, E. 2005. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383(6); 947-954.
- Emregül, E. Kocabay, O., Derkuş, B., Yumak, T., Emregül K. C., Sınağ, A. and Polat, K. 2012. A novel carboxymethylcellulose–gelatin–titanium dioxide–superoxide dismutase biosensor; electrochemical properties of carboxymethylcellulose–gelatin–titanium dioxide–superoxide dismutase. *Bioelectrochemistry*, 90; 8–17.
- Endo, K., Miyasaka, T., Mochizuki, S., Aoyagi, S., Himi, N., Asahara, H., Tsujioka, K. and Sakai, K. 2002. Development of a superoxide sensor by immobilization of superoxide dismutase. *Sens. Actuators B: Chem.*, 83(1-3); 30–34.
- Fan, C.H., Plaxco, K.W. and Heeger, A.J. 2003. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(16); 9134–9137.
- Fan, X., White, I.M., Shopova, S.I., Zhu, H., Suter, J.D. and Sun, Y. 2008. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta*, 620; 8–26.
- Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W., Thammakhet, C. and Thavarungkul, P. 2013. A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185; 725– 734.
- Feldman, P.L., Griffith, O.W. and Stuerhr, D.J. 1993. The surprising life of nitric oxide. *C&EN*, 71(51); 26-38.
- Ferreira, H.A., Cardoso, F.A., Ferreira, R., Cardoso, S. and Freitas, P.P. 2006. Magnetoresistive DNA chips based on ac field focusing of magnetic labels. *J. Appl. Phys.*, 99(8); 1–3.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809); 239-247.
- Floyd, R.A. 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4(9); 2587–2597.

- Foner, S.N. and Hudson, R.L. 1962. Mass spectrometry of inorganic free radicals. *Adv. Chem. Ser.*, 36; 34–49.
- Forstermann, U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch. Eur.J.Physiol.*, 459(6); 923–939.
- Fridovich, I. 1972. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Acc. Chem. Res.*, 5(10); 321–326.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radicals and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.*, 64; 97–112.
- Gao, X. and Wachs, E. 1999. Titania-Silica as Catalysts: Molecular Structural Characteristics and Physico-Chemical Properties. *Catal. Today*, 51(2); 233–254.
- Ge, B. and Lisdat, F. 2002. Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method. *Anal. Chim. Acta*, 454(1); 53–64.
- Globus, M.Y., Alonso, O., Dietrich, W.A., Busto, R. and Ginsberg, M.D. 1995. Glutamate Release and Free Radical Production Following Brain Injury: Effects of Posttraumatic Hypothermia. *J. Neurochem.*, 65(4); 1704–1711.
- Gobi, K.V. and Mizutani, F. 2000. Efficient mediatorless superoxide sensors using cytochrome c-modified electrodes: surface nano-organization for selectivity and controlled peroxidase activity. *J. Electroanal. Chem.*, 484(2); 172–181.
- Gobi, K.V., Sato, Y. and Mizutani, F. 2001. Mediatorless superoxide dismutase sensors using cytochrome c-modified electrodes: xanthine oxidase incorporated polyion complex membrane for enhanced activity and in vivo analysis. *Electroanalysis*, 13(5); 397–403.
- Goldman, R., Kedem, O., Silman, I., Caplan, S. and Katchalski-Katzir, E. 1968. Papain-collodion membranes. I. Preparation and properties. *Biochemistry*, 7(2); 486–500.
- Goldstein, L. 1972. Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry*, 11(22); 4072–4084.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J. and Reimhult, E. 2008. Electrochemical biosensors – sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3); 1400–1458.
- Guisan, J.M., Alvaro, G., Rosell, C.M. and Fernandez-Lafuente, R. 1994. Industrial design of enzymic processes catalysed by very active immobilized derivatives: utilization of diffusional limitations (gradients of pH) as a profitable tool in enzyme engineering. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 20(3); 357–369.

- Hall, E.D. and Braugher, J.M. 1989. Central nervous system trauma and stroke: II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 6(3); 303–313.
- Hall, R.H. 2002. Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. *Microbes Infect*, 4(4); 425–432.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.*, 219; 1–14.
- Halliwell, B. 1991a. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.*, 91(3); 14-21.
- Halliwell, B. 1991b. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4); 569-605.
- Halliwell, B. and Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance *Am J Clin Nutr.*, 57(5); 715-725.
- Halliwell, B. 1997. Antioxidant and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.*, 55(1); 44-52.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.
- Hiemenz, P.C. and Rajagopalan, R. 1997. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, USA., New York, 527-528.
- Hou, M.Y. 2005. *Elaboration et Caracterisation de Biofilms Pour Micro-ET Nanobiocapteurs Olfactifs*. Ecole Centrale Lyon. PhD Thesis.
- Hunter, R.S. 1981. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. Academic Press, London.
- Ignatov, S., Shishniashvili, D., Ge, B., Scheller, F.W. and Lisdat, F. 2002. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. *Biosens. Bioelectron.*, 17(3); 191–199.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I. and Utsumi, K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.*, 10(23); 2495–2505.
- Jang, H. D., Kim, S. K., Chang, H., Roh, K.M., Choi, J.W. and Huang, J. 2012. A glucose biosensor based on TiO₂–Graphene composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1); 184–188.
- Jayakrishnan, A. and Jameela, S.R. 1996. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, 17(5); 471–84.

- Ji, H., Li, H., Martasek, P., Roman, L.J., Poulos, T.L. and Silverman, R.B. 2009. Discovery of highly potent and selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase by fragment hopping. *J. Med. Chem.*, 52(3); 779–797.
- Jimenez, J.R., Mata-Granados, J.M. and Luque de Castro, M.D. 2007. On-line automatic SPE-CE coupling for the determination of biological markers in urine. *Electrophoresis*, 28(5); 789–798.
- Johansson, A., Kromer, K., Sroka, R. and Stepp, H. 2008. Clinical optical diagnostics – status and perspectives. *Med. Laser Appl.*, 23(4); 155 – 174.
- Josephs, H.J. 1971. The Heaviside Papers found at Paignton in 1957. *Electromagnetic Theory by Oliver Heaviside*, Chelsea Publishing Co, New York.
- Kalyanaraman, B., Perez-Reyes, E. and Mason, R.P. 1980. Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of guinone anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Acta*, 630(1); 119-130.
- Kalyanaraman, B., Darley Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J. and Ischiropoulos, H. 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic.Biol.Med.*, 52(1); 1–6.
- Katzir, S. 2006. *The Beginnings of Piezoelectricity: A Study in Mundane Physics*. Springer, Dordrecht.
- Kehrer, J.P. 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1); 43–50.
- Kelly, E.G. and Spottiswood, D.J. 1982. *Introduction to Mineral Processing*. Wiley, New York, 95.
- Khotimchenko, Y.S., Kovalev, V.V., Savchenko, O.V. and Ziganshina, O.A. 2001. Physical–Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*, 27(1); 53–64.
- Kocabay, Ö. 2011. Jelatin – Karboksimetilselüloz - Süperoksit Dismutaz Biyosensörünün Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Kocabay, Ö., Emregül, E., Aras, S. and Emregül, K.C. 2012. Carboxymethylcellulose–gelatin–superoxidase dismutase electrode for amperometric superoxide radical sensing. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 35(6): 923–930.
- Komatsu, S., Yamamoto, R., Nanjo, Y., Mikami, Y., Yunokawa, H. and Sakata, K. 2009. A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *J. Proteome Res.*, 8(10); 4766–4778.

- Konecny, R., Li, J., Fisher, C.L., Dillet, V., Bashford, D. and Noodleman, L. 1999. CuZn superoxide dismutase geometry optimization, energetics and redox potential calculations by density functional and electrostatic methods. *Inorg Chem.*, 38(5); 940-950.
- Kontos, H.A. and Wei, E.P. 1986. Superoxide production in experimental brain injury. *J. Neurosurg.*, 64(5); 803-807.
- Kroh, J., Green, B.C. and Spinks, J.W.J. 1961. Electron Paramagnetic Resonance Studies on The Production of Free Radicals in Hydrogen Peroxide at Liquid Nitrogen Temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, 83(9); 2202-2210.
- Kukol, A., Li, P., Estrela, P., Ko-ferrigno, P. and Migliorato, P. 2008. Label-free electrical detection of DNA hybridization for the example of influenza virus gene sequences. *Anal. Biochem.*, 374(1); 143-153.
- Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S. Zhai, P.Y., Schneider, M.D. and Sadoshima, J. 2010. NADPH oxidase4(Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(35); 15565-15570.
- Labib, M., Sargent, E.H. and Kelly, S.O. 2016. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. *Chem. Rev.*, 116(16); 9001 – 9090.
- Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A. 2000. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 48(5); 1442-1448.
- Laviron, E. 1979. General expression of the linear potential sweep voltammograms in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.*, 101(1); 19-28.
- Lazerges, M., Perrot, H., Rabehagaso, N. and Compère, C. 2012. Thiol- and biotin-labeled probes for oligonucleotide quartz crystal microbalance biosensors of microalga alexandrium minutum. *Biosensors*, 2(3); 245-254.
- Lee, I., Luo, X., Huang, J., Cui, X.T. and Yun, M. 2012. Detection of cardiac biomarkers using single polyaniline nanowire-based conductometric biosensors. *Biosensors*, 2(2); 205-220.
- Lermo, A., Campoy, S., Barbe, J., Hernandez, S., Alegret, S. and Pividori, M. 2007. In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. *Biosens. Bioelectron.*, 22(9-10); 2010-2017.
- Li, Y., Liu, X., Yuan, H. and Xiao, D. 2009. Glucose biosensor based on the room-temperature phosphorescence of TiO₂/SiO₂ nanocomposite. *Biosensors and bioelectronics*, 24(12); 3706-3710.

- Lisdat, F., Ge, B., Ehrentreich-Förster, E., Reszka, R. and Scheller, F.W. 1999. Superoxide dismutase activity measurement using cytochrome c-modified electrode. *Anal. Chem.*, 71(7); 1359–1365.
- Liu, C. H., Guo, X. L., Cui, H. T. and Yuan, R. 2009. An amperometric biosensor fabricated from electro-co-deposition of sodium alginate and horseradish peroxidase. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* 60(3-4); 151-156.
- Loschen, G. and Flohe, B. 1971. Chance respiratory chain linked H_2O_2 production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.*, 18(2); 261–263.
- Lowe, C.R. 1985. An introduction to the concepts and technology of biosensors. *Biosensors*, 1(1); 3-16.
- Luong, J.H.T., Male, K.B. and Glennon, J.D. 2008. Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnol. Adv.*, 26(5); 492–500.
- Macdonald, J.R. 1987. *Impedance Spectroscopy*, Wiley, New York.
- Mak, S. and Newton, G.E. 2001. The Oxidative Stress Hypothesis of Congestive Heart Failure. *Chest*, 120(6); 2035–2046.
- Malitesta, C., Palmisano, F., Torsi, L. and Zambonin, P.G. 1990. Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerised poly(o-phenylenediamine) film. *Anal. Chem.*, 62(24); 2735-2740.
- Marletta, M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 268(17); 12231-12234.
- Marletta, M.A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78(6); 927-930.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 243(21); 5753-60.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244; 6049–6055.
- Md Muslim, N.Z., Ahmad, M., Heng, L.Y. and Saad, B. 2012. Optical biosensor test strip for the screening and direct determination of L-glutamate in food samples. *Sens. Actuators B: Chem.*, 161(1); 493-497.
- Mesároš, Š., Vaňková, Ž., Grunfeld, S., Mesárošová, A. and Malinski, T. 1998a. Preparation and optimization of superoxide microbiosensor. *Anal. Chim. Acta*, 358(1); 27–33.

- Mesároš, Š., Vaňková, Ž., Mesárošová, A., Tomèik, P. and Grunfeld, S. 1998b. Electrochemical determination of superoxide and nitric oxide generated from biological samples. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 46(1); 33–37.
- Messing, R. A. 1976. Adsorption and inorganic bridge formations. *Method in Enzymology*, 44; 148–169.
- Meydani, M. 2001. Antioxidants and cognitive function. *ILSI. Nutrition Reviews*, 59(8); 75-82.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 17(3); 235–248.
- Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D. 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 8(1); 95–108.
- Mol, N.J.D. and Fischer, M.J.E. 2010. Surface plasmon resonance: a general introduction. In: Mol, N.J.D. and Fischer, M.J.E. (Eds.), *Surface Plasmon Resonance Methods and Protocols*. Springer, New York, 627, 1 – 14.
- Mossine, V.V., Linetsky, M., Glinsky, G.V., Ortwerth, B.J. and Feather, M.S. 1999. Superoxide free radical generation by Amadori compounds: the role of acyclic forms and metal ions. *Chem. Res. Toxicol.*, 12(3); 230–236.
- Mulchandani, A. 1998. Principles of enzyme biosensors. *Enzyme and Microbial Biosensors Methods in Biotechnology*, 6; 3-14.
- Münzel, T., Afanasev, I.B., Kleschyov, A.L. and Harrison, D.G. 2002. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22(11); 1761–1768.
- Nilsson, R., Pick, F.M., Bray, R.C. and Fielden, M. 1969. ESR Evidence for O_2^- as a Long-Lived Transient in Irradiated Oxygenated Alkaline Aqueous Solutions. *Acta Chem. Scand.*, 23; 2554–2556.
- Nguyen, B.T., Peh, A.E., Chee, C.Y., Fink, K., Chow, V.T., Ng, M.M. and Toh, C.S. 2012. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry*, 88; 15–21.
- O’Driscoll, K.F. 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels. *Methods in Enzymology*, 44; 169–183.
- Ohno, R., Ohnuki, H., Wang, H., Yokoyama, T., Endo, H., Tsuya, D. and Izumi, M. 2012. Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. *Biosens. Bioelectronics*, 40(1); 422–426.

- Ohsaka, T., Shintani, Y., Matsumoto, F., Okajima, T. and Tokuda K. 1995. Mediated electron transfer of polyethylene oxide-modified superoxide dismutase by methyl viologen. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 37(1); 73–76.
- Ohyashiki, T., Nunomura, M. and Katoh, T. 1999. Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1421(1); 131–139.
- Onar, M. K. 1990. *Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Dergisi*, 7(3); 285–293.
- Orazio, P.D. 2011. Biosensors in clinical chemistry – 2011 update. *Clin. Chim. Acta*, 412(19–20); 1749–1761.
- Özbek, G. 2014. Jelatin ve Kitosan Biyopolimerlerinin Kullanılmasıyla İmmünoglobulin G Tayini için Protein A İmmünoSENSÖRÜ Geliştirilmesi ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Pala, F.S. and Tabakçioğlu, K. 2007. Free Radicals: Our Enemies or Friends? *Advances in Molecular Biology*, 1; 63 – 69.
- Palanisamy, S., Cheemalapati, S. and Chen, S.M. 2014. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase dispersed in multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid biocomposite. *Materials Science and Engineering C*, 34; 207–213.
- Parkinson, G. and Pejčic, B. 2005. Using Biosensors Detect Emerging Infectious Diseases. Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology Perth, Western Australia, Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, Final Report.
- Paul, P., Hossain, M., Yadav, R.C. and Kumar, G.S. 2010. Biophysical studies on the base specificity and energetics of the DNA interaction of photoactive dye thionine: spectroscopic and calorimetric approach. *Biophys. Chem.*, 148(1–3); 93–103.
- Pejčic, B. and Marco, R.D. 2006. Impedance spectroscopy: over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim. Acta*, 51(28); 6217–6229.
- Perumal, V. and Hashim, U. 2014. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of applied biomedicine*, 12(1); 1–15.
- Piunno, P.A.E., Krull, U.J., Hudson, R.H.E., Damha, M.J. and Cohen, H. 1995. Fiber-optic DNA sensor for fluorometric nucleic acid determination. *Anal. Chem*, 67(15); 2635–2643.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. and Chiarotto, E. 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.*, 11(9); 1163–1182.

- Rahman, A., Khan, M.A. and Tareq, S.M. 2010. Preparation and characterization of polyethylene oxide(PEO)/gelatin blen for biomedical application: Effect of gamma radiation. *Journal of Applied Polymer Science*, 117(4); 2075-2082.
- Rahman, M.M., Ahammad, A.J.S., Jin, J.H., Ahn, S.J. and Lee, J.J. 2010. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Sensors*, 10(5); 4855–4886.
- Robinson, B.H. 1998. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 21(5); 598–603.
- Sadek, H.A., Szweda, P.A. and Szweda, L.I. 2004. Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible Ca^{2+} and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition. *Biochemistry*, 43, 8494–8502.
- Sakaguchi, S. and Furusawa, S. 2006. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 47(2); 167–177.
- Salin, M.L. and Bridges, S.M. 1980. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch Biochem Biophys.*, 201(2); 369–374.
- Salvemini, D. and Cuzzocrea, S. 2002. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic. Biol. Med.*, 33(9); 1173–1185.
- Sassolas, A., Blum, L.J. and Leca-Bouvier, B.D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3); 489–511.
- Scheller, W., Jin, W., Ehrentreich-Förster, E., Ge, B., Lisdat, F., Büttemeier, R., Wollenberger, U. and Scheller, F.W. 1999. Cytochrome c based superoxide sensor for in vivo application. *Electroanalysis*, 11(10-11); 703– 706.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I. and Milner, J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.*, 18; 567–579.
- Sharp, A.K., Kay, G. and Lilly, M. D. 1969. The kinetics of β -galactosidase attached to porous cellulose sheets. *Biotechnol. Bioeng.*, 11(3); 363–380.
- Stohs, S.J. and Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18(2); 321-336.
- Strehlitz, B., Nikolaus, N. and Stoltenburg, R. 2008. Protein detection with aptamer biosensors. *Sensors*, 8(7); 4296–4307.

- Sungur, S., Emregül, E., Günendi, G. and Numanoğlu, Y. 2004. New glucose biosensor based on glucose oxidase-immobilized gelatin film coated electrodes. *J Biomater. Appl.*, 18(4); 265-277.
- Tammeveski, K., Tenno, T.T., Mashirin, A.A., Hillhouse, E.W., Manning, P. and McNeil, C.J. 1998. Superoxide electrode based on covalently immobilized cytochrome c: modeling studies. *Free Radic. Biol. Med.*, 25(8); 973–978.
- Tang, B., Wang, Y. and Chen, Z. 2002. Catalytic spectrofluorimetric determination of superoxide anion radical and superoxide dismutase activity using N,N-dimethylaniline as the substrate for horseradish peroxidase (HRP). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 58(12); 2557–2562.
- Tarpey, M.M. and Fridovich, I. 2001. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ. Res.*, 89(3); 224–236.
- Telefoncu, A. 1997. Biyosensörler. Biyokimya lisansüstü yaz okulu 20-26 Haziran 1999 Kusadası, Türkiye. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, 1-9.
- Telefoncu, A. 1999. Enzimoloji, Ege Üniversitesi, İzmir, Bölüm 9, İmmobilize enzimler, 193-243.
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, S. 1999. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 71(12); 2333-2348.
- Thomas, C.E., Bernardelli, P., Bowen, S.M., Chaney, S.F., Friedrich, D., Janowick, D. A., Jones, B.K., Keeley, F.J., Kehne, J.H., Ketteler, B., Ohlweiler, D.F., Paquette, L.A., Robke, D.J. and Fevig, T.L. 1996. Cyclic nitron free radical traps: isolation, identification, and synthesis of 3,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinolin-4-ol N-oxide, a metabolite with reduced side effects. *J. Med. Chem.*, 39(25); 4997–5004.
- Thorp, H.H. 1998. Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation. *Trends Biotechnology*, 16(3); 117–121.
- Tian, Y., Mao, L., Okajima, T. and Ohsaka, T. 2002a. Superoxide dismutase-based third generation biosensor for superoxide anion. *Anal. Chem.*, 74(10); 2428–2434.
- Tian, Y., Shioda, M., Kasahara, S., Okajima, T., Mao, L., Hisabori, T. and Ohsaka, T. 2002b. A facilitated electron transfer of copper–zinc superoxide dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1569(1-3); 151–158.
- Tian, Y., Mao, L., Okajima, T. and Ohsaka, T. 2004. Electrochemistry and electrocatalytic activities of superoxide dismutase at gold electrodes modified with a self-assembled monolayer. *Anal. Chem.*, 76(14); 4162–4168.

- Torres-Chavolla, E. and Alocilja, E.C. 2009. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosens. Bioelectron.*, 24(11); 3175–3182.
- Tosa, T., Mori, T. Fuse, N. and Chibata, I. 1966. Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia*. 31(4); 214–224.
- Trevan, M. 1980. Techniques of Immobilization. In: *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology* (Trevan, M. ed.), Wiley, Chichester-New York, 1–9.
- Tsoka, S., Gill, A., Brookman, J.L. and Hoare, M. 1998. Rapid monitoring of virus-like particles using an optical biosensor: a feasibility study. *J. Biotechnology*, 63(2); 147 –153.
- Ushaa, S.M., Nagar, N.I. and Rao, G.M. 2011. Design and analysis of nanowire sensor array for prostate cancer detection. *Int. J. Nano Biomater.*, 3(3); 239–255.
- Uygun, Z.O. 2012. Development of electrochemical impedance-based sensor for the detection of pesticides type organophosphate. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T.D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12(10); 1161–1208.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1); 44–84.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., Langebartels, C. and Sandermann, H. 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio Technol.*, 12; 165–168.
- Vanella, A., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Russo, A., Castorina, C., Campisi, A., Renis, M. and Perez-Polo, J.R. 1993. Free radical scavenger depletion in post-ischemic reperfusion brain damage. *Neurochem. Res.*, 18(12); 1337–1340.
- Védrine, C., Leclerc, J.C., Durrieu, C. and Tran-Minh, C. 2003. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosens. Bioelectron.*, 18(4); 457 – 463.
- Venugopal, V. 2002. Biosensors in fish production and quality control. *Biosens. Bioelectron.*, 17(3); 147–157.
- Victor, V.M., Rocha, M. and De La Fuede, M. 2004. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int. Immunopharmacol*, 4(3); 327–347.

- Wadiack, D.T. and Carbonell, R.G. 1975. Kinetic behavior of microencapsulated β -galactosidase. *Biotechnol. Bioeng.*, 17(8); 1157–1181.
- Wang, H., Boerman, O.C., Sariibrahimoglu, K., Li, Y., Jansen, J.A. and Leeuwenburgh, S.C.G. 2012. Comparison of micro- vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. *Biomaterials*, 33(33); 8695–8703.
- Wang, J., Xu, D.K., Kawde, A.N. and Polsky, R. 2001. Metal Nanoparticle-Based Electrochemical Stripping Potentiometric Detection of DNA Hybridization. *Anal. Chem.*, 73(22); 5576–5581.
- Wang, J., Liu, G., Polsky, R. and Merkok, A. 2002. Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags. *Electrochem. Commun.*, 4(9); 722–726.
- Wang, J. and Kawde, A.B. 2002. Amplified label-free electrical detection of DNA hybridization. *Analyst*, 127(3); 383–386.
- Wang, J. 2006. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens. Bioelectron.*, 21(10); 1887–1892.
- Wang, J. 2008. Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev.*, 108(2); 814–825.
- Wang, J. and Fan, Y. 2014. Lung Injury Induced by TiO₂ Nanoparticles Depends on Their Structural Features: Size, Shape, Crystal Phases, and Surface Coating. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(12); 22258–22278.
- Wang, L., Wen, W., Xiong, H., Zhang, X., Gu, H. and Wang, S. 2013. A novel amperometric biosensor for superoxide anion based on superoxide dismutase immobilized on gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid biocomposite film. *Analytica Chimica Acta*, 758(3); 66–71.
- Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., Yin, J., Wang, W., Mattson, M., Kao, J., Lakatta, E., Sheu, S., Ouyang, K., Chen, J., Dirksen, R. and Cheng, H. 2008. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, 134(2); 279–290.
- Wang, X., Han, M., Bao, J., Tu, W. and Dai, Z. 2012. A superoxide anion biosensor based on direct electron transfer of superoxide dismutase on sodium alginate sol–gel film and its application to monitoring of living cells. *Analytica Chimica Acta*, 717; 61–66.
- Wang, Y., Xu, H., Zhang, J. and Li, G. 2008. Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 8, 2043–2081.

- Wang, Y., Wu, Y., Wang, J. and Di, J. 2009. Disposable superoxide anion biosensor based on superoxide dismutase entrapped in silica sol-gel matrix at gold nanoparticles modified ITO electrode. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 32(4); 531-536.
- Wang, Y.X., Ye, Z.Z., Si, C.Y. and Ying, Y.B. 2012. Application of aptamer based biosensors for detection of pathogenic microorganisms. *Chin. J. Anal. Chem.*, 40(4); 634-642.
- Wang, Z., Di Liu, D., Gu H., Zhu, A., Tian, Y. and Shi, G. 2013. NTA-modified carbon electrode as a general relaying substrate to facilitate electron transfer of SOD: Application to in vivo monitoring of $O_2^{\bullet-}$ in a rat brain. *Biosensors and Bioelectronics*, 43; 101-107.
- Watterson, J., Piunno, P.A.E. and Krull, U.J. 2002. Practical physical aspects of interfacial nucleic acid oligomer hybridisation for biosensor design. *Anal. Chim. Acta*, 469(1); 115-127.
- Weng, C.H., Huang, C.J. and Lee, G.B. 2012. Screening of aptamers on microfluidic systems for clinical applications. *Sensors*, 12, 9514-9529.
- White, C.R., Brock, T.A., Chang, L.Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W.A., Gianturco, S.H., Gore, J., Freeman, B.A. and Tarpey, M.M. 1994. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(3); 1044-1048.
- Woodward, J. 1985. Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling. *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*, 3-17.
- Wrona, M.Z. and Dryhurst, G. 1998. Oxidation of serotonin by superoxide radical: implications to neurodegenerative brain disorders. *Chem. Res. Toxicol.*, 11(6); 639-650.
- Xi, H., Kumar, S., Dosen-Micovic, L. and Arya, D.P. 2010. Calorimetric and spectroscopic studies of aminoglycoside binding to AT-rich DNA triple helices. *Biochimie*, 92(5); 514-529.
- Xie, B., Ramanathan, K. and Danielsson, B. 1999. Principles of enzyme thermistor systems: applications to biomedical and other measurements. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 64; 1-33.
- Yao, D., Vlessidis, A.G., Evmiridis, N.P., Zhou, Y., Xu, S. and Zhou, H. 2002. Novel chemiluminescence method for detection of superoxide anion and its application to dry-cured meat. *Anal. Chim. Acta* 467(1-2); 145-153.
- Yazıcı, B. 2004. Su Kimyası. Kimyasal Denge. Asitler ve Bazlar. Ders Notu. ÇÜ, Balcalı-Adana.

- Zhou, P. and Regenstein, J.M. 2004. Optimization of extraction conditions for pollock skin gelatin. *J. Food Sci.*, 69(5); 393–398.
- Zhou, P. and Regenstein, J.M. 2005. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *J. Food Sci.*, 70(6); 392–396.
- Zhou, P., Mulvaney, S.J. and Regenstein, J.M. 2006. Properties of Alaska pollock skin gelatin: a comparison with tilapia and pork skin gelatins. *J. Food Sci.*, 71(6); 313–321.
- Zhu, X., Niu, X., Zhao, H., Tang, J. and Lan, M. 2015. Immobilization of superoxide dismutase on Pt–Pd/MWCNTs hybrid modified electrode surface for superoxide anion detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 67; 79–85.
- Zhu, X., Liu, T., Zhao, H., Shi, L., Li, X. and Lan, M. 2016. Ultrasensitive detection of superoxide anion released from living cells using a porous Pt–Pd decorated enzymatic sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 79; 449–456.
- Zuo, S., Teng, Y., Yuan, H. and Lan, M. 2008. Direct electrochemistry of glucose oxidase on screen-printed electrodes through one-step enzyme immobilization process with silica sol–gel/polyvinyl alcohol hybrid film. *Sensors and Actuators B*, 133; 555–560.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Utku KARAKAYA

Doğum Yeri : Malkara

Doğum Tarihi : 08.09.1987

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara 50. Yıl Lisesi (2004)

Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya
Bölümü (2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2011-Haziran 2017)