

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİR MULTİPL SKLEROZ BİYOBELİRTECİ OLAN Anti-MİYELİN
TEMEL PROTEİN İÇİN POLİETİLEN GLİKOL FONKSİYONEL
KARBON NANOTÜP TEMELLİ İMMÜNOSENSÖRÜN GELİŞTİRİLMESİ**

Mustafa ÖZKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her Hakkı Saklıdır

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.

02/06/2016

Mustafa ÖZKAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİR MULTİPL SKLEROZ BİYOBELİRTECİ OLAN Anti-MİYELİN TEMEL PROTEİN İÇİN POLİETİLEN GLİKOL FONKSİYONEL KARBON NANOTÜP TEMELLİ İMMÜNOSENSÖRÜN GELİŞTİRİLMESİ

Mustafa ÖZKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu tez çalışmasında MS'e neden olan oto-antikorlardan Anti-Miyelin Temel Proteini'nin hızlı, ekonomik ve güvenilir olarak tayin edecek ve MS teşhisinde manyetik rezonans görüntülerine destek olacak klinik veriler sunabilecek karbon nanotüp temelli Miyelin Temel Proteini (MBP) immünosensörünün geliştirilmiştir. Bu amaçla tez kapsamında karbon nanotüpler polietilen glikol ile fonksiyonellenip, taşıyıcı materyal olarak jelatin ile kaplanmış karbon baskı devre elektrotlara immobilize edilmiş, bu platform üzerine MBP immobilizasyonu gerçekleştirilerek immünosensör sistemi tamamlanmıştır. İmmünosensörün optimizasyon ve karakterizasyonu elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), dönüşümlü voltametri (CV) ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile denetlenmiştir. Karbon nanotüp fonksiyonelleme işlemi Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve Taramalı Elektron Mikroskopisi ile karakterize edilmiştir. EIS, CV ve SEM ile yapılan karakterizasyon araştırmaları, biyoduyarlı molekülün (MBP) yüzeye etkin şekilde immobilize edildiğini ortaya koymuştur. Optimum şartların belirlenmesinin ardından kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kalibrasyon çalışmaları immünosensörün düşük tayin limitine ve geniş aralıklarda doğrusallığa sahip olduğunu göstermiştir. Geliştirilen immünosensöre ait kalibrasyon grafiklerinin çizilmesinden sonra gerçek örneklerle uygulanabilirliği araştırılmıştır. Çalışma tamamlandığında insan kanından bir MS biyobelirteci olan Anti-MBP'nin doğru ve hızlı tayini için bir immünosensör önerilmiştir.

Mayıs 2016, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: Jelatin, Karbon nanotüp, Multipl Skleroz, Miyelin Temel Proteini, İmpedans Spektroskopisi, İmmünosensör.

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT of POLYETHYLENE GLYCOL FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBE BASED IMMUNOSENSOR for Anti-MYELIN BASIC PROTEIN, a MULTIPLE SCLEROSIS BIOMARKER

Mustafa ÖZKAN

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

Advisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

In this thesis, a carbon nanotube based Myelin Basic Protein immunosensor which is able to determine Anti-Myelin Basic Protein, a auto-antibody causes Multiple Sclerosis, rapidly, cost effectively and reliably and provide clinical data in order to supports magnetic resonance imaging, was developed. For this purpose, carbon nanotubes were functionalized with polyethylene glycol and immobilized onto gelatin modified screen printed electrodes and immunosensor system were completed by immobilizing Myelin Basic Protein on this platform. Optimization and characterization of immunosensor were inspected with electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV) and scanning electron microscopy (SEM). Carbon nanotube functionalization process were characterized with Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy. Characterization investigations which were carried out with EIS, CV and SEM show that bioreceptor molecule (MBP) was successfully immobilized onto surface. Calibration curves were obtained following defining of optimum conditions. Calibration studies proved that immunosensor has a low limit of detection and wide ranges of linearity. Caibration curves were obtained and applicability of immunosensor to real samples were examined. By completion of studies, an immunosensor which is able to determine of a MS biomarker, Anti-MBP, rapidly and sensitive, was proposed.

May 2016, 85 pages

Key Words: Gelatin, Carbon Nanotube, Multiple Sclerosis, Myelin Basic Protein, Impedance Spectroscopy, Immunosensor

TEŞEKKÜR

Üniversite eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya A.B.D),

Aklıma takılan her soruya sabırla cevap veren, bilgisi ve pozitif enerjisiyle bana destek olan Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya A.B.D),

Tez çalışması kapsamında kullanılan karbon nanotüpleri sağlayan Sayın Doç. Dr. Mehmet Lütfi YOLA (Sinop Üniversitesi, Malzeme Mühendisliği Bölümü) ve biyolojik örneklerin temininde her türlü kolaylığı sağlayan Sayın Prof. Dr. Canan YÜCESAN'a (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji A.B.D.),

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, en zor anlarımda desteklerini hiç eksik etmeyen, sorunları çözme konusunda beni yalnız bırakmayan çalışma arkadaşlarım Burak DERKUŞ, Ecem BOZTUNA, Selin GEREKÇİ, Gizem ÖZBEK ve Utku KARAKAYA'ya,

Hayatımın her anında bana destek olan, hedeflerime ulaşmam için motive eden, kendi hayatımı tasarlamamı gönülden destekleyen babam, annem ve ablama ve elimi hiç bırakmayan yol arkadaşım Ebru KONYAR'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa ÖZKAN
Ankara, Mayıs 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Elektrokimya	4
2.1.1 Elektriksel çift tabaka	5
2.2 Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV)	8
2.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	12
2.4 Biyosensörler	15
2.4.1 Biyoduyarlı elemanlar	16
2.4.2 İleticiler	18
2.4.3 İmmünoensörler	20
2.5 Antikorlar	23
2.6 Biyoduyarlı Moleküllerin İmmobilizasyonu.....	26
2.6.1 Fizisorpsiyon (Fiziksel adsorpsiyon)	26
2.6.2 Biyoafinite etkileşimleri.....	27
2.6.3 Kovalent bağlanma	28
2.7 Karbon Nanotüpler.....	28
2.7.1 Karbon nanotüplerin fonksiyonellenmesi	32
2.8 Multipl Skleroz (MS)	34
2.8.1 Epidemiyoloji	35
2.8.2 Klinik özellikler ve prognoz.....	35
2.8.3 Hastalığın seyri.....	35
2.8.4 Patoloji ve patogeneze	37

2.8.5 Teşhis	37
2.9 Çalışmada Kullanılan Biyomolekül, Taşıyıcı, Nanopartikül ve Çapraz Bağlayıcılar	40
2.9.1 Miyelin temel protein (Myelin Basic Protein, MBP)	40
2.9.2 Jelatin.....	41
2.9.3 Karbon nanotüpler	42
2.9.4 Çapraz bağlayıcılar	43
2.10 Kaynak Araştırması.....	44
3. ÇALIŞMANIN AMACI.....	48
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	49
4.1 Materyaller	49
4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	49
4.1.2 Kullanılan cihazlar	49
4.1.3 Kullanılan elektrotlar	50
4.1.4 Kullanılan çözeltiler.....	50
4.2 Yöntem	52
4.2.1 Karbon nanotüp fonksiyonellendirilmesi	52
4.2.2 İmmünosensörün hazırlanması	52
4.2.3 SEM ve TEM mikrograflarının alınması	53
4.2.4 Optimizasyon çalışmaları.....	54
4.2.5 Spesifiklik	55
4.2.6 İmmünosensörün elektrokimyasal davranışı	55
4.2.7 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi.....	56
4.2.8 Geliştirilen immünosensörün BOS'tan geri kazanım denemeleri.....	56
4.2.9 Tekrar üretilebilirlik	56
4.2.10 İmmünosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliği	56
5. BULGULAR	58
5.1 FTIR Grafiklerinin Değerlendirilmesi.....	58
5.2 TEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi	59
5.3 SEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi	60
5.4 Optimizasyon Çalışmaları.....	61
5.4.1 Karbon nanotüp miktarının immünosensör cevabına etkisi.....	61

5.4.2 Epiklorohidrin miktarının immünosensör cevabına etkisi.....	62
5.4.3 Miyelin Temel Proteini miktarının immünosensör cevabına etkisi	64
5.4.4 Anti-MBP inkübasyon süresinin immünosensör cevabına etkisi.....	65
5.5 İmmünosensörün Tekrar Üretilebilirliği.....	66
5.6 Spesifiklik.....	67
5.7 Geliştirilen İmmünosensörün BOS'tan Geri Kazanım Denemeleri.....	68
5.8 İmmünosensörün Elektrokimyasal Davranışı.....	68
5.9 Kalibrasyon Grafikleri	71
5.10 Geliştirilen İmmünosensörün Gerçek Örneklerle Uygulanabilirliği	73
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER DİZİNİ

μA	Mikroamper
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
$\Delta\phi$	Potansiyel düşüşü
Ω	Ohm
ω	Açısal frekans
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
Aq	Çözelti
C	Kapasitans
C_{dl}	Çift tabaka kapasitansı
cm^2	Santimetre kare
E	Potansiyel
F	Faraday sabiti
Fe	Demir
$\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$	Potasyum ferrosiyanid ve potasyum ferrisiyanid
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
I	Akım yoğunluğu
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
m	Metal
mmol	Milimol
mmol L^{-1}	Milimolar
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
pg	Pikogram
Pt	Platin
R	Direnç
R_{ct}	Yük transfer direnci
R_{s}	Çözelti direnci

s	Saniye
t	Süre
TiO ₂	Titanyum Dioksit
U	Ünite
q	Yük yoğunluğu
V	Volt
Z	İmpedans

Kısaltmalar

Anti-MBP	Anti-Miyelin Temel Proteini
BDM	<i>Bochris, Devanathan ve Muller</i> modeli
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
CNT	Karbon nanotüp
CV	Döngüsel Voltametri
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
ELISA	Enzim-bağılı immünosorbant assay
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
HRP	Yabanturbu peroksidaz
IgG	İmmünoglobülin G
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
İTO	İndiyum Kalay Oksit
MBP	Miyelin Temel Proteini
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NHS	N-hidroksisüksinimit
OHP	Dış Helmholtz Tabakası
PEG	Polietilen glikol
RIA	Radyo-immünoassay
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Elektrot/çözelti ara-yüzeyinde potansiyel değişimi	5
Şekil 2.2 Helmholtz çift tabaka modeli	6
Şekil 2.3 Gouy-Chapman-Stern elektriksel çift tabaka modelinin şematik gösterimi ve elektrot/çözelti ara-yüzeyinde potansiyel düşüşü	7
Şekil 2.4 BDM modelin şematik gösterimi ve elektrot/çözelti ara yüzeyi potansiyel düşüşü	8
Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametrde uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi grafığı	10
Şekil 2.6 $(K_3[Fe(CN)]_6)$ 'nın 200 mV tarama hızında yalı ITO ve diğer modifikasyon basamaklarını gösteren voltamogramı	12
Şekil 2.7 Sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap	13
Şekil 2.8 θ faz açısı ile ayrılmış, akım-potansiyel değişimini gösteren fazör	13
Şekil 2.9 Nyquist impedans spektrumu grafığı ve sistemi temsil eden Randles devre modeli	14
Şekil 2.10 Bode grafığı	15
Şekil 2.11 Bir biyosensörün şematik gösterimi	16
Şekil 2.12 Biyoduyarlı eleman tipine göre biyosensör sınıflandırması	17
Şekil 2.13 İletici tipine göre biyosensör sınıflandırması	19
Şekil 2.14 Antijen-antikor bağlanma karakteristiklerine göre immünosensör tipleri.	21
Şekil 2.15 Elektrokimyasal immünosensörlerin şematik gösterimi	22
Şekil 2.16 Bir immünoglobülin monomerinin yapısı	24
Şekil 2.17 Biyoduyarlı moleküllerin immobilizasyonunda en sık kullanılan yaklaşımlar.	27
Şekil 2.18 Karbon nanotüp yapısı.	29
Şekil 2.19 Karbon nanotüp fonksiyonellemesinin biyolojik uygulamaları	34
Şekil 2.20 Miyelin kılıfın şematik gösterimi.	40
Şekil 2.21 Jelatin monomerinin yapısı	42
Şekil 2.22 NHS/EDC çapraz bağlama çiftinin kimyasal etkileşim mekanizması	43
Şekil 4.1 Karbon baskı devre elektrot, bağlantılar ve elektrokimyasal hücre	50
Şekil 4.2 Karbon nanotüp fonksiyonelleme basamakları şeması	52

Şekil 4.3 Elektrot fabrikasyon basamakları şeması.....	53
Şekil 5.1 Karbon nanotüp fonksiyonelleme basamaklarının FTIR spektrumları.....	58
Şekil 5.2 Polietilen glikol ile fonksiyonellenen karbon nanotüplerin TEM görüntüleri.	59
Şekil 5.3 İmmünoşansör yüzeyinin SEM mikrografları.	60
Şekil 5.4 İmmünoşansör cevabına CNT miktarının etkisi	62
Şekil 5.5 İmmünoşansör cevabına epiklorohidrinin etkisi.....	63
Şekil 5.6 İmmünoşansör cevabına miyelin temel proteininin etkisi	64
Şekil 5.7 İnkübasyon süresinin immünoşansör cevabına etkisi	65
Şekil 5.8 İmmünoşansörün tekrar üretilebilirliği	66
Şekil 5.9 İmmünoşansörün spesifikliği	67
Şekil 5.10 İmmobilizasyon basamaklarının elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile incelenmesi.....	69
Şekil 5.11 İmmobilizasyon basamaklarının dönüşümlü voltametri ile incelenmesi.....	70
Şekil 5.12 Elektrokimyasal immünoşansörün devre modeli, Difüzyonlu Sabit Faz Elemanı (CPE with Diffusion)	71
Şekil 5.13 İmmünoşansörün yüksek konsantrasyon bölgesindeki kalibrasyon grafiği ..	72
Şekil 5.14 İmmünoşansörün düşük konsantrasyon bölgesindeki kalibrasyon grafiği	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin kıyaslanması	30
Çizelge 2.2 Karbon nanotüp sentezinde en sık kullanılan yöntemler	31
Çizelge 2.3 MS teşhisinde Poser kriterleri	39
Çizelge 2.4 MS teşhisinde McDonald kriterleri.....	39
Çizelge 5.1 Geliştirilen immünosensörün BOS'tan geri kazanımı.....	68



1. GİRİŞ

IUPAC bir biyosensörü, biyolojik bir tanıma elemanı kullanan ve seçici kantatif ya da yarı-kantatif analitik bilgi sağlayan bütünleşik bir reseptör-iletici cihazı olarak tanımlamaktadır. Buna karşın bir sistemin biyosensör olarak tanımlanmasında bazı sınırlamalar söz konusudur. Biyosensörlerin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi ek saflaştırma basamakları içeren ve ya ek donanımsal ve spesifik reaktif eklenmesine dayanan sistemlerden ayrı tutulması önerilmiştir (Thévenot vd. 1999). Uzun yıllardır gıda, su kalitesi kontrolü, sağlık, güvenlik ve çevresel izleme alanlarında tayin ve tanı yönelik gittikçe artan bir talep söz konusudur (Cosnier 2003). Biyosensörler bu alanlarda ihtiyaca cevap veren, hızlı, duyarlı, spesifik ve ekonomik sistemler olarak önemlerini korumakta ve gelişimini sürdürmektedir (Andreescu ve Sadik 2004).

İmmünosensörler, biyolojik tanıma elemanı olarak immünoaktif maddelerden yararlanan bir biyosensör çeşididir ve antijen-antikor kompleks oluşumu temeline dayanmaktadır. Antijen-antikor etkileşimi son derece seçici bir reaksiyondur ve bu yüksek spesifiklik, immünotest (immunoassay) yaklaşımından ortaya çıkmış olan immünosensörlere önemli ölçüde duyarlılık kazandırmaktadır (Ghindilis vd. 1998). İmmünosensörlere dair temel ilkeler 1959 yılında Yalow ve Berson tarafından ortaya koyulmuş ve insan kanından insülin bağlayıcı antikorların tayini için immünotest geliştirilmesine imkan vermiştir. Antijenin ya da antikorun sensör platformu üzerinde sabitlenmesi (immobilizasyonu) ile üretilen immünosensörler ölçüm prensibi temelinde, elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik, impedimetrik vb.), optik, akustik, piezoelektrik ve mikrogravimetrik gibi sınıflara ayrılarak incelenebilir. İmmünosensör teknolojisinde elektrokimyasal ve optik sensörler, kullanım sıklığı açısından ön plana çıkmaktadır. Elektrokimyasal immünosensörlerde biyolojik sinyal genel olarak elektroaktif bileşenlerden işaretlemeye yararlanılmasıyla ya da glikoz oksidaz ve yaban turbu peroksidaz gibi, reaksiyonu sonucu elektron açığa çıkan enzimlerle işaretleme yaparak elde edilmektedir. İmmünosensörleri sinyal kaynağı açısından doğrudan ya da dolaylı olarak sınıflandırmak da mümkündür (Bahadır ve Sezgintürk 2015).

İmmünosensörlerin antijen antikor etkileşimi temeline dayanan yüksek afinite ve seçiciliği ve bu özelliklerden kaynaklanan yüksek duyarlılığı, günümüzde prostat spesifik antijen tayininden mikroorganizma izolasyonunda, lipoprotein seviyelerinin belirlenmesinden kardiyak belirteç troponin-I tayinine kadar bir çok alanda çalışmalar yapılmasına olanak sağlamıştır (Ma vd 2016, Tang vd 2016, Kaur vd 2016, Liu vd 2016). İmmünosensörlerin mikroakışkan teknolojileri gibi yeni ve umut vaat eden alanlarla birlikte kullanım kazanması gelecekte bu alanda gerçekleştirilecek çalışmalarda daha duyarlı ve kesin tayinlere imkan verebilecektir (Choi 2016).

Son yıllarda, nanoteknolojinin biyosensör uygulamalarına uyarlanmasıyla ortaya çıkan, oldukça yeni ve popüler bir konu olan nanobiyosensörler üzerine son derece yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Nanopartiküllerin önemli özelliklerinden olan yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve elektron aktarımını artırma kapasiteleri sayesinde immobilizasyon verimliliği gözle görülür oranda artmış ve daha duyarlı sensörlerin geliştirilmesinin önü açılmıştır (Bagheryan 2016). Nanobiyosensör alanında en sık kullanılan nanopartiküller metal ya da karbon nanotüpler, nanokristaller, nanoelmaslar, metal oksit ve sülfürler ve kuantum noktacıklardır.

Multipl Skleroz (Multiple Sclerosis, MS) dünyada ve Türkiye’de sıklıkla rastlanan otoimmün bir hastalıktır. Dünya genelinde 3 milyon, Türkiye’de ise 40 bin kadar MS hastası olduğu düşünülmektedir. Hastalığın seyri her geçen gün kötüleşme eğilimindedir ve hastaların çoğu için ölümle sonlanmaktadır. MS için herhangi bir tedavi önerilememiş olmakla beraber hastalığın semptomların giderilmesi ve hastanın hayat kalitesinin yüksek tutulmasına yönelik terapiler gerçekleştirilmektedir. Hastalık tanısının yüksek doğrulukla yapılamıyor oluşu bu terapilere başlanmasını geciktirmektedir. Bu sebepten ötürü yüksek duyarlılık ve kesinlikte MS teşhisinin erken dönemde koyulabilmesi hasta açısından yüksek önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında MS biyobelirteçlerinden Anti Miyelin Temel Proteini (Anti Myelin Basic Protein, Anti-MBP)’nin tayinine yönelik karbon nanotüp (Carbon nanotube, CNT) temelli impedimetrik bir immünosensör geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Destek

materyal olarak jelatin seçilmiştir. Bu malzeme üzerine, polietilen glikol ile fonksiyonellendirilmiş karbon nanotüplerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Bu malzemeler ile hazırlanan baskı devre karbon elektrotlar (Screen printed carbon electrodes, SPCE) üzerine miyelin kılıf yapısında da bulunan Miyelin Temel Proteini (Myelin Basic Protein, MBP) gönderilerek sistemin biyo-duyarlı elemanı immobilize edilmiştir. Karbon nanotüp miktarı, çapraz bağlayıcı konsantrasyonları, MBP miktarı ve inkübasyon süreleri Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) ve Dönüşümlü Voltametri (CV) kullanılarak optimize edilmiştir. Karbon nanotüp fonksiyonelleme başarısı Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ve Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile denetlenmiştir. Jelatin, karbon nanotüp ve MBP immobilizasyon başarısı ve yüzey karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. Tasarlanan sistemin en iyi cevap verdiği değerler tespit edilmiş, bu değerler için kalibrasyon grafikleri elde edilerek BOS ve serum çalışmaları gerçekleştirilmiş, böylelikle üretilen immünosensörün gerçek örneklerle uyarlabilirliği denetlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Elektrokimya

Elektrokimya, madde-elektrik etkileşimini ve bu etkileşim ile ortaya çıkan kimyasal ve fiziksel değişimleri inceleyen bilim dalıdır. Reaksiyon hızının tespiti, mekanizmasının aydınlatılması ve elektrot ile analizi gerçekleştirilen madde arasındaki elektron aktarımının incelenmesine imkan vermektedir (Fisher 1996). Reaksiyonları etkileyen parametrelere örnek olarak potansiyel, elektrot yüzeyinin yapısı ve bileşimi, çözeltide bulunan analit ve diğer iyonların aktiviteleri ve bunların kütle aktarımları gösterilebilir. Bu faktörler yük transfer sürecini etkilediğinden dolayı hızı değiştirir ve reaksiyon dinamiklerini etkiler.

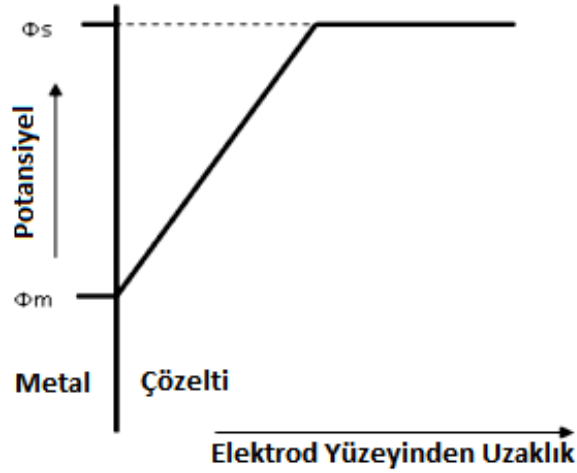
Metalik bir elektrodun (m) çözelti içerisinde bulunan reaktant moleküller (aq) gibi bir elektrot kaynağına konulması sonucunda elektrotla çözelti ara yüzeyinde yük transferi gerçekleşir.



Yukarıda örneklenen reaksiyon bir süre sonra dengeye ulaşır ve elektrot ile çözelti arasındaki ara yüzeydeki elektron transferi iki faz arasında potansiyel fark yaratarak net bir yük ayrımı ile sonuçlanır (Fisher 1999). Elektrot ile çözelti arasındaki ara yüzeyde gerçekleşen potansiyel düşüşü $\Delta\phi_{m/s}$:

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

ϕ_m metal potansiyelini, ϕ_s çözelti potansiyelini temsil etmektedir. Şekil 2.1’de elektrot ile çözelti arayüzündeki potansiyel değişimi gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Elektrot/çözelti ara-yüzeyinde potansiyel değişimi

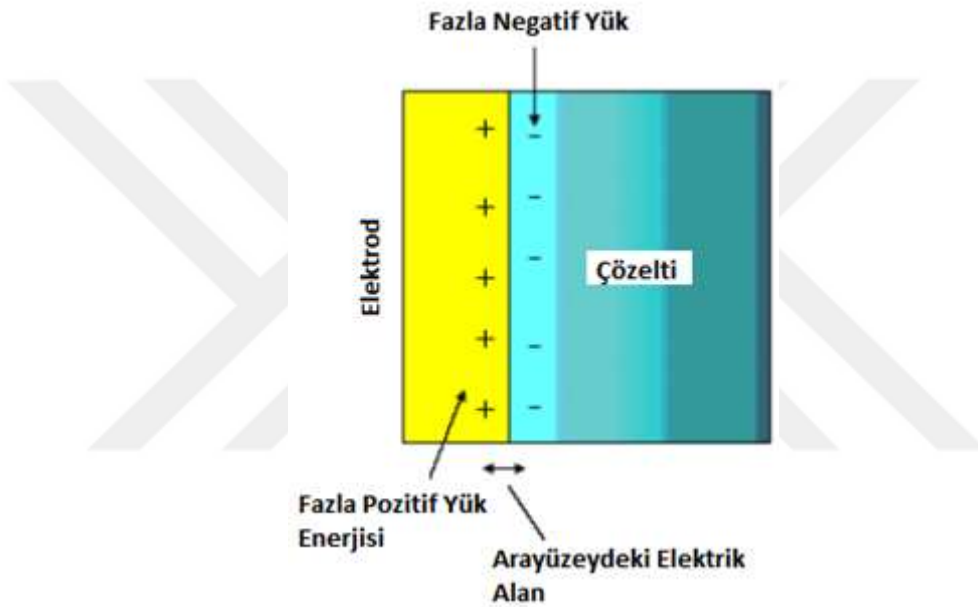
2.1.1 Elektriksel çift tabaka

İki faz arasında potansiyel fark oluşturan yük ayrımı, iki paralel plakanın oluşturduğu kapasitörde biriken yükler gibidir. Polarizasyon potansiyeli uygulanmasıyla elektrot yüzeyinin yükü kontrol edilebilir ya da elektrot ile çözelti arasındaki elektrostatik etkileşim artırılabilir.

Elektriksel çift tabakaya dair ilk model Helmholtz tarafından 1879 yılında önerilmiştir. Bu modele göre metal elektrot yüzeyinde bulunan fazla yük çözeltide tek tabaka halinde bulunan karşıt yükler tarafından nötrleştirilir. Yüklerin elektrostatik güç ya da dipollerin tekrar düzenlenmesi ile bu şekilde dağılması elektriksel olarak nötr bir yüzeyin oluşmasını sağlar.

$$q_m = - q_s \quad (2.3)$$

q_m metal yüzeydeki yük yoğunluğunu, q_s ise monomoleküler çözelti tabakasının yük yoğunluğunu temsil etmektedir. Helmholtz'a göre elektrot ile çözeltideki iyonlar arasında tek solvasyon tabakası olabileceğini, elektrot tarafından çekilen elektronların ara yüzeye, bu iyonların solvasyon kabukları tarafından sınırlanan bir mesafeye kadar yaklaşabileceklerini düşünmüştür. Bu sebepten iyonların tekrar düzenlenmesi ile oluşan potansiyel düşüşü doğrusaldır ve yalnızca Dış Helmholtz tabakası (Outer Helmholtz Plane, OHP) denilen, elektrot yüzeyi ile bu tek tabaka arasında gözlemlenmektedir.

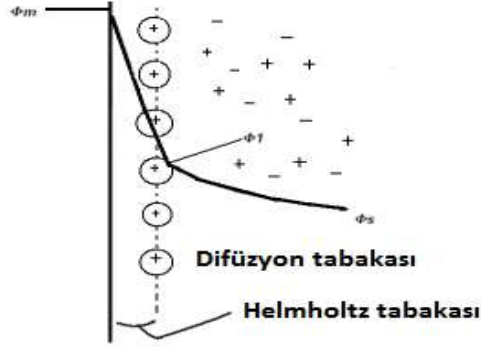


Şekil 2.2 Helmholtz çift tabaka modeli

Gouy ve Chapman (1910) yılında gerçekleştirdikleri bağımsız çalışmada Helmholtz'un çift tabaka modeline iyonların Brown hareketlerini ekleyerek kuramı geliştirmişlerdir. Onlara göre eğer iyonlar serbestçe dolaşabiliyorlarsa OHP için uygun değerlerdir ve bu sebepten metalle iyon arasındaki elektrostatik etkileşim etkisini yitirir ve yük difüzyon tabakasına dağılır. Potansiyel düşüşü elektrot yüzeyinin yakınında gerçekleşir ancak OHP'de meydana gelmez.

1924'te Stern, önceki iki modeli birleştirerek Gouy-Chapman-Stern modelini geliştirmiştir. Bu modelde çözünmüş iyonların boyutları ve su molekülleri ile sarılı

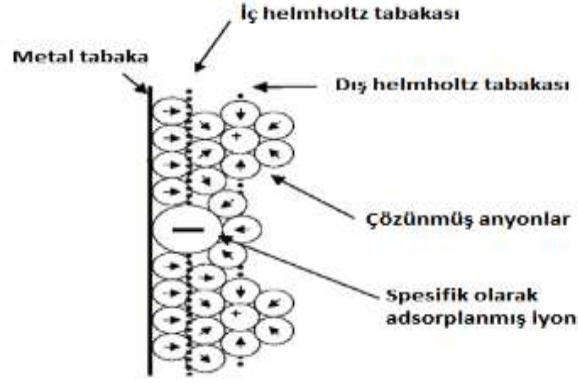
olmaları da hesaba katılmaktadır. Bu sebepten iyonlar elektrot yüzeyine yaklaşamamakta ve elektrot yüzeyi ile OHP arasında Gouy-Chapman modelinin öngördüğü kadar belirgin bir potansiyel düşüşü meydana getirememektedirler.



Şekil 2.3 Gouy-Chapman-Stern elektriksel çift tabaka modelinin şematik gösterimi ve elektrot/çözelti ara-yüzeyinde potansiyel düşüşü

Grahame ise 1947’de çözünmeyen ya da solvasyon kabuğunu kaybetmiş bir iyonun çözünebilen bir iyonla elektrot yüzeyine daha fazla yaklaşabileceğini göstererek Stern’in modelini geliştirmiştir. Bu modelde elektrot ile doğrudan temas halinde olan iyonlar spesifik olarak adsoplanır ve İç Helmholtz Tabakasını (Inner Helmholtz Plane, IHP) oluştururlar. Çözünmeyen iyonlar ise spesifik olmayan bir şekilde adsoplanır ve OHP bölgesini oluştururlar.

Borchris, Devanathan ve Muller ise 1963’te suyun çözücü olarak model alındığı bir görüş ortaya atmışlardır. BDM modeli denen bu modelde su moleküllerinin dipolleri elektroda yakınlıkları sebebiyle sabitlenmiş durumdadırlar. Günümüzde elektriksel çift tabakayı tanımlayan model, BDM modelidir.



Şekil 2.4 BDM modelin şematik gösterimi ve elektrot/çözelti ara yüzeyi potansiyel düşüşü

2.2 Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV)

Elektrokimyasal temele dayanan bütün analiz yöntemlerinde elektrot ve daldırıldığı çözelti sistemine elektriksel bir uyarım yapılarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Elektrokimyasal tekniklerde en sık kullanılan parametreler akım, potansiyel ve zamandır, aynı zamanda bu parametreler kullanılan yöntemin adını da belirler. Bu yöntemleri net akımın sıfır olduğu denge anındaki statik yöntemler ve denge durumu dışındaki durumlarda net akımın ölçüldüğü dinamik yöntemler olarak ikiye ayırmak mümkündür. Akımın kontrol edildiği yöntemler kronopotansiyometri ve kulometrik titrasyonlar olarak iki kısımda sınıflandırılabilirken iyon seçici elektrotların kullanıldığı yöntemler net akımın sıfır olduğu statik elektroanalitik yöntemlerdir.

Voltametrik deneyler üçlü elektrot sistemleri ile gerçekleştirilir. Bu elektrotlardan ilki potansiyel değişiminin uygulandığı çalışma (ya da indikatör) elektrottur. Çalışma elektrotu olarak en sık kullanılan elektrot türleri platin, altın, civa gibi metal elektrotlar ve bunların yanı sıra karbon, karbon pasta elektrot, karbon camısı elektrot ve grafit elektrottur. Sistemdeki ikinci elektrot, ölçüm esnasında potansiyeli sabit kalacak olan referans elektrottur. En sık tercih edilen referans elektrot türlerine gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot ve doymuş kalomel elektrot örnek olarak gösterilebilir. Üçlü elektrot sisteminin üçüncü ve son elemanı karşıt elektrottur. Karşıt elektrot olarak en sık platib (Pt) elektrot kullanılmaktadır.

Voltametri yönteminde gözlemlenen akım değerleri, çözeltide bulunan ve ya elektrot yüzeyine immobilize edilmiş maddelerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi ile elde edilir. Yükseltgenmeden kaynaklanan akıma anodik akım, indirgenmeden kaynaklanan akıma ise katodik akım adı verilmektedir. Elektrot yüzeyince oluşan akım, birim yüzeye gelen madde miktarı ile orantılıdır. Akım şu şekilde tanımlanabilir:

$$i = nFAq(0,t) \quad (2.4)$$

Bu denklemde $q(0,t)$ terimi elektrot yüzeyine birim zamanda gelen madde miktarını temsil etmektedir. Fick kanunları genişleyen küre elektrot sistemine uygulanıp q değerinin üstteki eşitlikte yerine konması ile İlkoviç eşitliği elde edilir:

$$i_d = 0,732nFCD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6} \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte:

i : akım, A;

n : elektron sayısı, mol (e^- /mol)

F : Faraday sabiti, (mol/mol e^-)

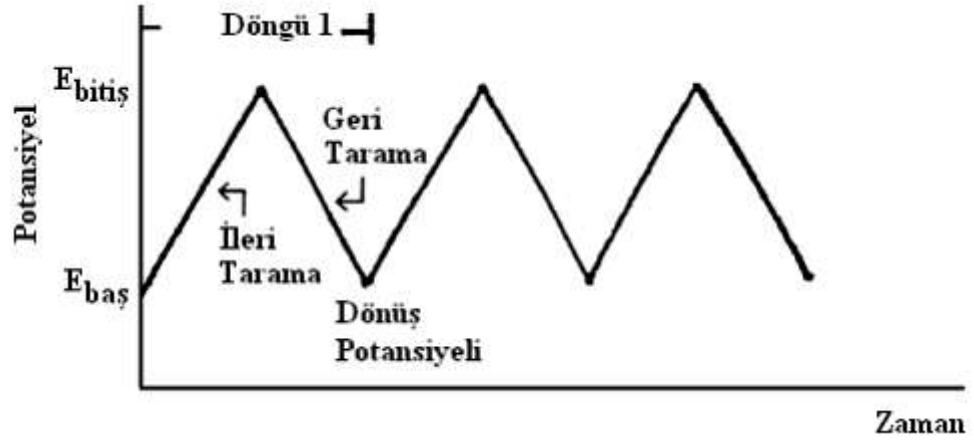
C : çözeltideki elektroaktif madde derişimi, (mol/cm³)

D : Difüzyon katsayısı, (cm²/s)

m : akış hızı, (g/s)

t : zaman (s)

terimleri ile ifade edilmiştir.

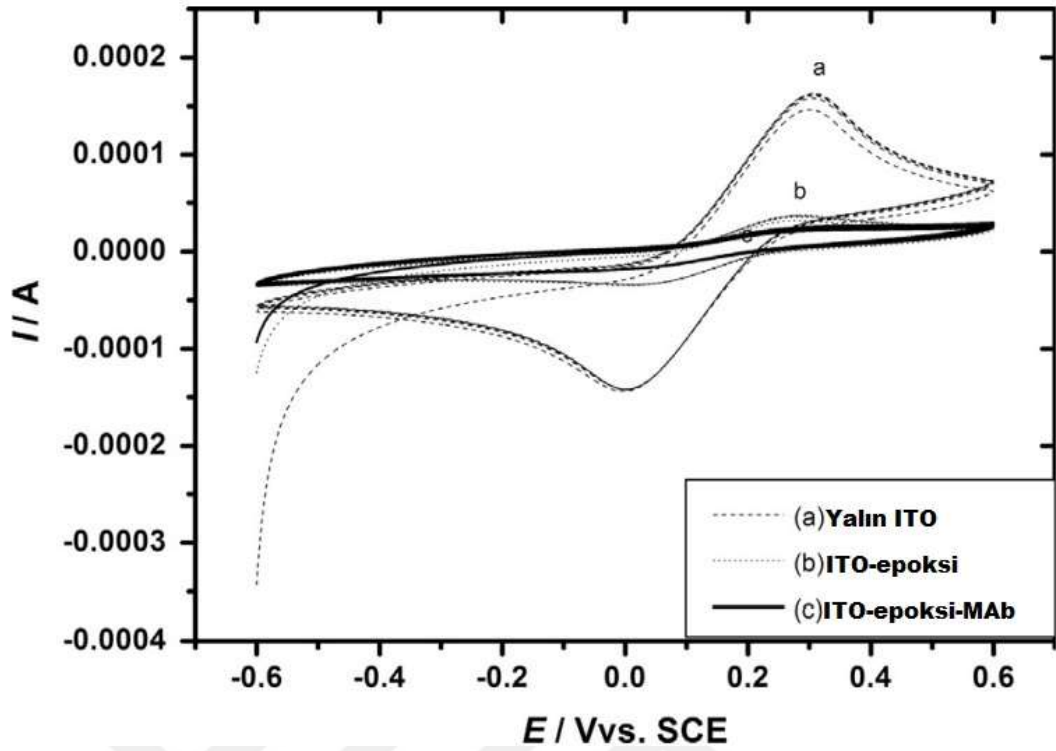


Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametrde uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi grafiği

Dönüşümlü voltametrde potansiyel zamana doğrusal olacak şekilde değiştirilir. Potansiyelin zamanla değişimi Şekil 2.5'te grafikleştirilmiştir. Potansiyel değişimi, E_1 gibi bir başlangıç potansiyelinden başlayarak, E_2 gibi bir bitiş potansiyeline doğru, ileri yönlü olarak ilerler. Bu noktadan sonra, ilk taramanın tersi yönlü olarak, E_2 potansiyelinden başlayarak tekrar E_1 potansiyeline ya da E_3 gibi farklı bir potansiyele kadar geri yönlü tarama yapılır. Eğer ileri yönlü taramada bir indirgenme tepkimesi olmuşsa, geri yönlü tarama esnasında yükseltgenme gerçekleşir. İleri ve geri yönlü bu potansiyel döngüsünden ötürü bu tekniğe dönüşümlü voltametri denmiştir. Bu yöntemle elde edilen pik, akım büyüklüğü, aktarılan elektron sayısı, elektroaktif tür derişimi ve difüzyon katsayısına bağlıdır.

Dönüşümlü voltametri elektrokimyasal analiz yöntemleri içerisinde oldukça sık kullanılmaktadır. Bu durumun sebeplerinden birisi farklı tarama hızlarında ölçüm alınmasına olanak sağlaması ve elektrotta gerçekleşen tepkimenin ara ürünlerinin kararlılıkları ile ilgili fikir sağlamasıdır. Adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarımına tesir eden kimyasal değişimleri belirlemek de bu yöntemle imkan dâhilindedir. İleri ve geri yönlü piklerin analizi ile reaksiyon mekanizması hakkında fikir edinilirken ileri yönde yapılan tarama ile kinetik veriler elde dileyebilir.

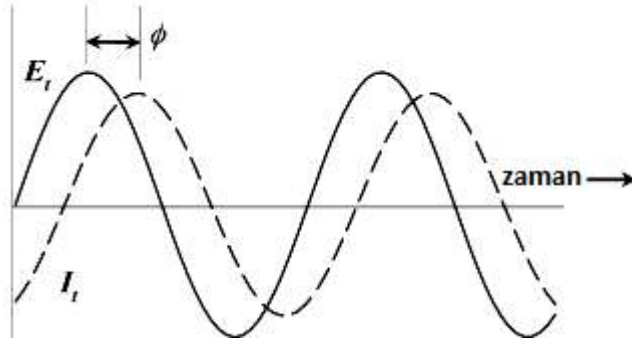
Dönüşümlü voltametri yöntemi ile karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilirken, modifiye edilmiş elektrot sisteme çalışma elektrotu olarak bağlanır ve yüzey modifikasyonlarının başarısının denetlenmesinde kullanılır. Aynı zamanda yüzey modifikasyonlarının yüzeye iletkenlik kazandırıp kazandırmadığı ya da yüzeyde herhangi bir yükseltgenme indirgenme reaksiyonunun yürüyüp yürümediğini de anlaşılabilir. Bu işlemler esnasında, çıplak elektrotun çalışma elektrotu olarak kullanıldığı bir sistemde, elektrot yüzeyinde hızlı ve tersinir şekilde yükseltgenip indirgenebilen redoks çiftlerinin (ya da redoks problemleri) elektrokimyasal davranışlarından yararlanılır. En sık kullanılan redoks çiftleri arasında potasyum ferrisiyanit/ferrosiyanit, dopamin ve ferrosen gösterilebilir. Modifiye edilmemiş elektrotun bu çözeltilere daldırıp elde edilen dönüşümlü voltamogramı ile modifiye edilmiş elektrotun voltamogramı karşılaştırılarak, yüzeyde gerçekleşen elektrokimyasal tepkimeler ve modifikasyon başarısı denetlenir. Şekil 2.6'da indiyum kalay oksit (Indium tin oxide, ITO) elektrot üzerine epoksi ve antikor modifikasyonlarının başarısı dönüşümlü voltametri ile incelenmiştir (Souiri vd. 2014). Şekilde “a” olarak belirtilen voltamogram çıplak ITO elektroda, “b” olarak ifade edilen voltamogram ITO yüzeyin epoksilenmesine, “c” olarak belirtilen voltamogram ise monoklonal anti-Legionella pneumophila antikoruна ait olup, modifikasyonun her basamağında elektron transferinin azalmış olması, modifikasyonun başarısını ortaya koymaktadır. Çalışmada redoks çifti olarak potasyum ferrisiyanit/ferrosiyanit kullanılmıştır ve referans elektrot olarak doymuş kalomel elektrottan yararlanılmıştır.



Şekil 2.6 ($K_3[Fe(CN)_6]$) nin 200 mV tarama hızında yalı ITO ve diğer modifikasyon basamaklarını gösteren voltamogramı (Souiri vd. 2014)

2.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

İmpedans ifadesi ilk kez 1886 yılında elektrik mühendisi, matematikçi ve fizikçi olan Oliver Heaviside tarafından, kompleks sayıların elektrik devrelerine uyarlanmasıyla kullanılmıştır (Josephs 1971). İmpedansa dayalı yöntemler korozyon, elektrot kinetiği, bataryalar ve biyoelektrokimya gibi elektrokimyasal araştırmada kullanılmaktadır. Bu yöntem, frekansa bağlı olarak elektriksel bilgi sunan bir karakterizasyon tekniğidir. Elektrokimyasal hücreye alternatif akım uygulanarak hücreden geçen akımın izlenerek ölçümler alınır. Bu alternatif akım, sünisoidal bir perturbasyon yaratır. Uygulanan sinüsoidal perturbasyona karşı oluşan cevap denge durumu potansiyeli ile aynı frekansta fakat farklı genlik ve faz açısına sahip zaman bağımlı bir alternatif akım sinyalidir.

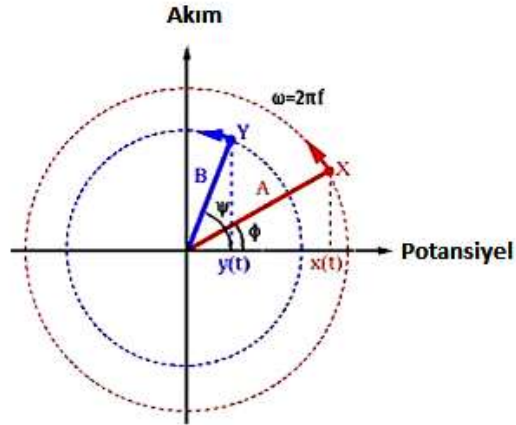


Şekil 2.7 Sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap

Ohm yasası temelinde bir sistemin impedansı:

$$\frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (2.6)$$

şeklinde ifade edilebilir. Bu eşitlik impedansı faz açısı kaymasına bağlı olarak göstermektedir. Bu durum, impedansın vektör düzleminde gösterilmesine olanak sağlar.

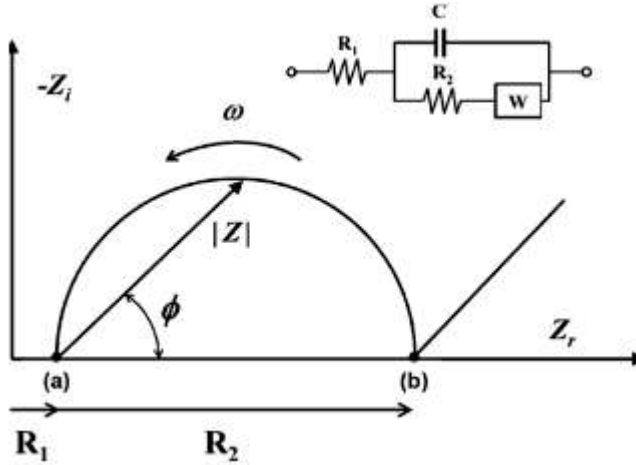


Şekil 2.8 ϕ faz açısı ile ayrılmış, akım-potansiyel değişimini gösteren fazör

$$Z = Z_r + jZ_i \quad (2.7)$$

Üstteki denklemde impedans, reel ve imajiner olmak üzere iki vektör olarak gösterilmektedir. Bu gösterimde reel (faz içi) bileşen sistemin direnci ile ilgiliyken imajiner (faz dışı) bileşen daha çok yalıtkan tabakaların oluşumu ile ilgilidir.

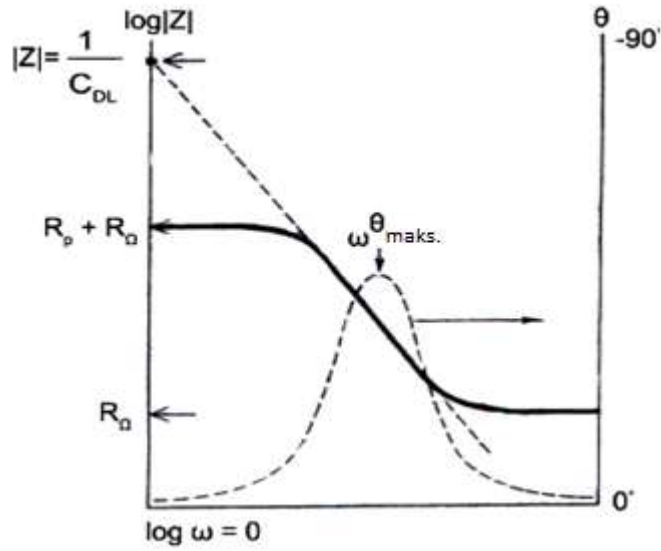
İmpedimetrik verilerin incelenmesinde en sık kullanılan iki grafik türü Nyquist ve Bode grafikleridir. Şekil 2.9'da bir Nyquist grafiği ve ilgili sistemin elektriksel devre elemanları gösterilmiştir. Bu grafikte gösterilen impedans profili (a) noktasında R_1 gibi bir direnç değerinden başlayan ve (b) noktasında sonlanan, toplam değeri R_1+R_2 olan yarım bir dairedir ve grafikteki her nokta farklı bir frekans değerine aittir. Ölçümün ilk noktalarında yüksek frekans, yani düşük enerji seviyelerinde uyarımlar uygulanır ve böylelikle çözelti direnci (R_s) ölçülür. Frekansın azalması, enerjinin artışı ile birlikte taranan bölge elektrot yüzeyine kayar. Elektrot yüzeyinde direnç en yüksek değerini aldığından ötürü kapasitif direnç maksimum değerine ulaşır ve kapasitörün kapasitans değeri imajiner impedansın maksimum değerine eşittir. R_1 değeri çözelti direncine karşılık gelirken R_2 değeri yük transfer direncini (R_{ct}) temsil etmektedir. Frekansın gittikçe azalıp enerjinin artması ile dalgalar elektrot yüzeyinin içine girerek Nyquist grafiğinde difüzyonu temsil eden doğrusal kısım meydana gelir.



Şekil 2.9 Nyquist impedans spektrumu grafiği ve sistemi temsil eden Randles devre modeli

Bode grafiğinin (Şekil 2.10) Nyquist grafiğine karşı bazı avantajları olduğundan bahsedilebilir. Nyquist grafiğinde frekansa dair bir bilgi yer almazken Bode grafiği apsise frekansı yerleştirir. Aynı zamanda frekans değerleri logaritmik olarak

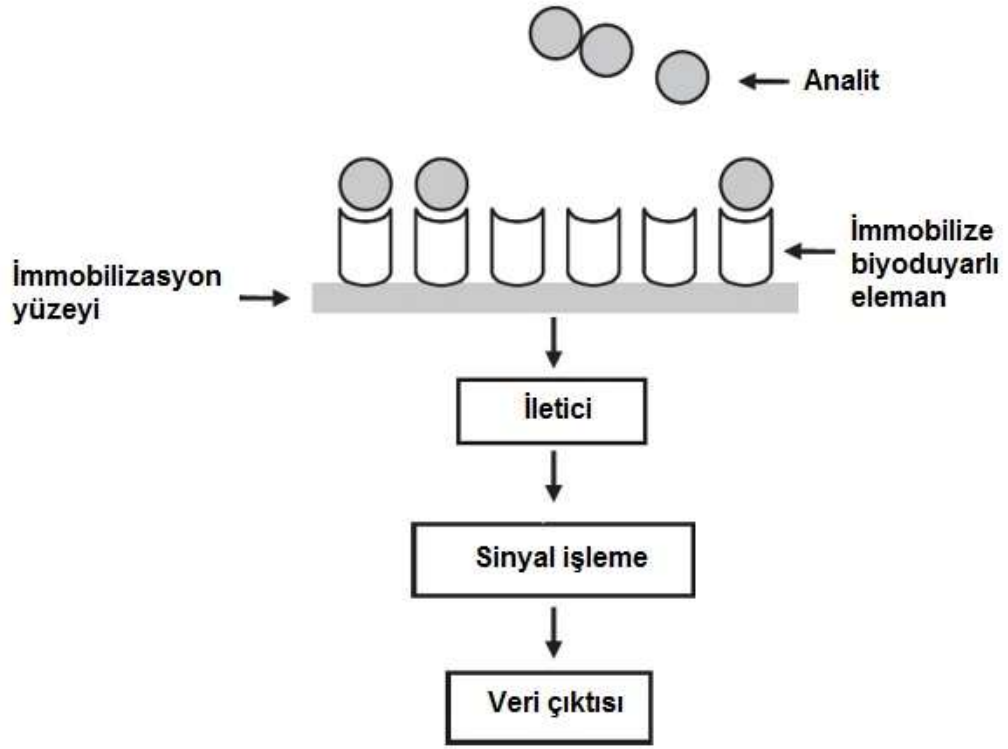
sunulduğundan, daha geniş aralıkta bir grafik elde edilmiş olur. Ayrıca elektrokimyasal sistem Bode grafiği ile daha net bir şekilde belirlenebilir. Düşük frekans değerlerinde polarizasyon direncinin belirlenmesinde de Bode grafiği ön plana çıkar.



Şekil 2.10 Bode grafiği

2.4 Biyosensörler

Bir biyosensör, biyoduyarlı (bioreseptör) bir eleman ve uygun bir ileticinin (transduser) birleştirilmesinden oluşur. Örnek bir biyosensör şeması şekil 2.11’de görülmektedir (Mungroo ve Neethirajan 2014).



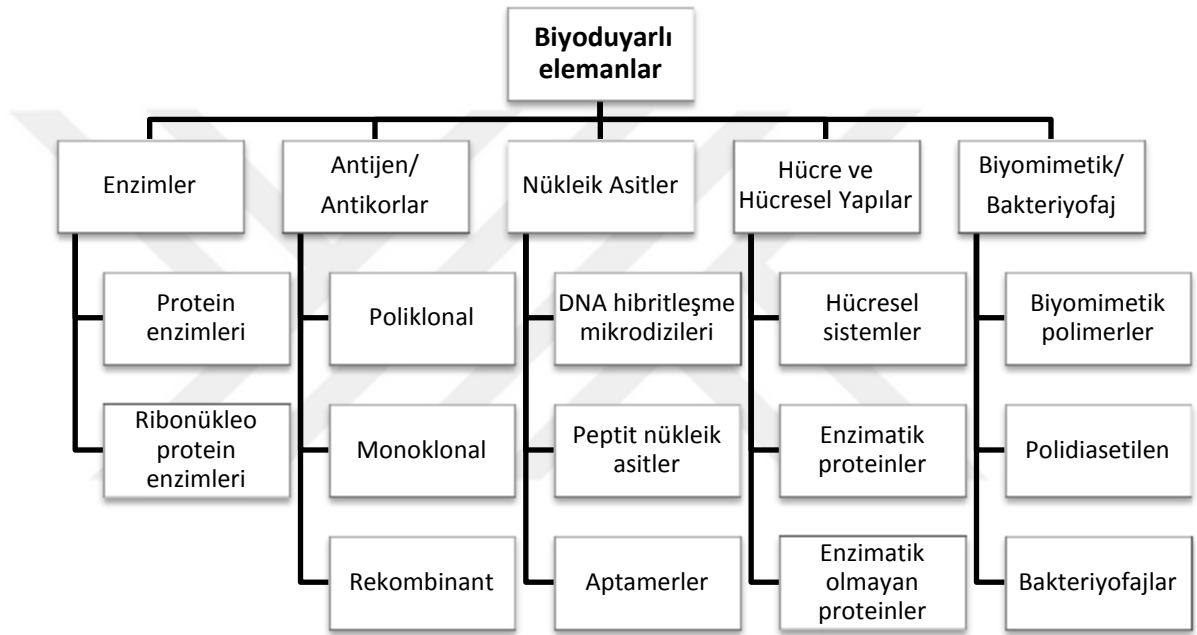
Şekil 2.11 Bir biyosensörün şematik gösterimi (Mungroo ve Neethirajan 2014)

Biyosensörlerin sınıflandırılmasında bir çok kriter göz önüne alınabilir. Bu sınıflandırmalar biyoduyarlı malzemeye göre, ileticiye göre ve immobilizasyon tekniğine göre yapılabilmektedir (Preda vd. 2011).

2.4.1 Biyoduyarlı elemanlar

Biyosensörlerin tasarımında bulunan biyoduyarlı elemanlar, biyosensörün ilgilendiği analiti belirler ve analitin sensöre bağlanmasını ve ya iletici elemanın sinyale dönüştürebileceği kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesini sağlarlar. Biyoduyarlı elemanlar birçok farklı formda olabilecekleri gibi bir analit için birden fazla biyoduyarlı eleman da olabilir. Buna karşılık bir biyoduyarlı elemanın birden fazla analite duyarlı olması spesifikliği azaltacağından pek tercih edilen bir durum değildir.

Enzimler, antijen-antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve hücresel yapılar ve biyomimetik-bakteriyofajlar biyoduyarlı biyosensör elemanlarına örnek olarak gösterilebilir. Biyosensör teknolojisinde en sık kullanılan biyoduyarlı elemanlar enzimler ve antijen-antikorlar olsa da son yıllarda bakteriyofaj temelli biyosensörler de önem kazanmıştır. Yine son yıllarda son derece popüler olan ve spesifikliği çok yüksek olan aptamer temelli biyosensörler de biyoduyarlı elemanın nükleik asit olduğu biyosensörlere örnek olarak gösterilebilir.



Şekil 2.12 Biyoduyarlı eleman tipine göre biyosensör sınıflandırması (Preda vd 2011)

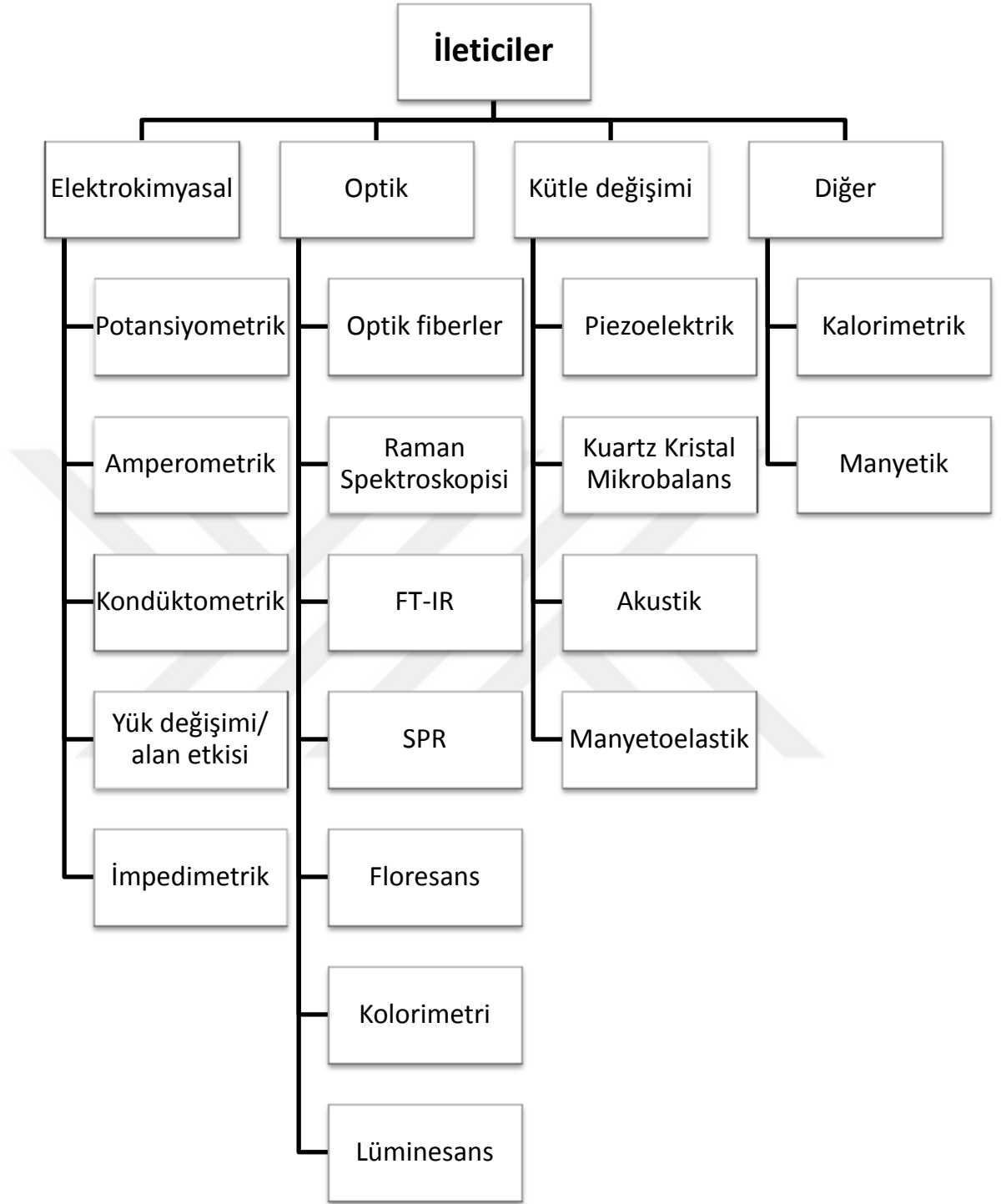
Bu sınıflandırmanın yanı sıra, biyoduyarlı elemanın analitle etkileşimine dayanan bir ayırım da yapılabilmektedir. Analitle etkileşimi afinite temeline dayanan biyosensörlere biyoafinite esaslı biyosensörler, enzim gibi katalitik temele dayanan biyosensörlere biyokatalitik esaslı biyosensörler adı verilmektedir.

Biyokatalitik esaslı biyosensörler, biyosensör yüzeyine immobilize edilmiş enzim, hücre ya da doku gibi bir biyoduyarlı eleman içermektedir. Bu biyokatalizörler ortamda bulunan substratı sürekli tüketirler ve sinyal bu katalitik reaksiyon sonucu elde edilir (Thevenot vd. 1999).

Biyoafinite esaslı biyosensörler ise biyosensör yüzeyinde, ilgilenilen analite yüksek ilgi duyan bir biyoduyarlı elemanın immobilize edildiği sistemlerdir. Bu sistemde analit ile biyoduyarlı eleman arasında belli bir süre sonunda denge hali oluşur ve daha fazla tüketilmez. Bu tip biyosensörlerde en sık kullanılan biyoduyarlı elemanlar antijen/antikorlar ve reseptör hücrelerdir (Thevenot vd. 1999). Biyoduyarlı eleman olarak antijen/antikor çiftlerinden yararlanan biyosensörlere özel olarak “immünosensör” adı verilmektedir. Bu sistemlerde sensör yüzeyindeki taşıyıcı tabakaya immobilize edilmiş antikor ve antikora spesifik antijenin bağlanması sonucu immunokimyasal bir reaksiyon gerçekleşir. Antijen-antikor etkileşiminin afinite sabiti genellikle çok yüksek olduğundan bu bağlanma tersinir değildir. Bu durum üretilen immünosensörlerin tek kullanımlık olmasına sebep olur. Bu durumu aşmak için zaman zaman, antijen-antikor kompleksinin çözünmesini sağlayan tampon çözeltiler kullanılır ve sistemin birden fazla kez kullanımına imkan sağlanır (Thevenot vd. 1999).

2.4.2 İleticiler

Biyosensör elemanlarından bir diğeri ileticilerdir ve biyoduyarlı eleman vasıtasıyla meydana gelen etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştürmekle görevlidirler. İdealde iletici tek başına analitin tayininde yeterli değildir ancak uygun bir biyoduyarlı eleman immobilizasyonu yüzeyine sahip bir iletici, biyolojik etkileşim sonucu ortaya çıkacak olan potansiyel değişimi, elektron aktarımı, sıcaklık ve kütle değişim ya da ışığın tepkime ürünü ya da substratı tarafından saçılmasını algılayabilir. Şekil 2.13'te ileticilerin genel bir sınıflandırılması ve her bir grubun en sık kullanılan türleri şematize edilmiştir (Preda vd. 2011).



Şekil 2.13 İletici tipine göre biyosensör sınıflandırması (Preda vd. 2011)

En sık kullanılan elektrokimyasal biyosensörler genel olarak potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik ve impedimetrik ileticileri kullanmaktadır. Potansiyometrik sensörler elektrot potansiyelinin ölçümü doğrudan analitin tayinini sağlamaktır. Amperometrik biyosensörlerde uygulanan potansiyel sonucu oluşan akımın ölçümü yapılmaktadır. Kondüktometrik biyosensörlerde elektrik alan varlığında elektrik yükü taşıyan iyonların iletkenliği ile ilgilenilir. Optik biyosensörlerde ışığın absorblanması, desorblanması ya da saçılması ile ilgili özelliklerden yararlanılır. Etkileşim esnasında ya da sonrasında ışığın bu özelliklerinin ölçümü ya da etkileşim sonrası açığa çıkan ürünün ışığa karşı davranışının incelenmesi ile analit derişimi tespit edilir. Piezoelektrik sensörlerde genel anlamda karakteristik kristal rezonansındaki değişimin ölçümü ile piezoelektrik kristal yüzeyindeki kütle değişimin incelenmesi temeline dayanır. Yüzeyde biyoduyarlı eleman vasıtasıyla biriken kütlenin kristal rezonansını değiştirmesi, ilgilenilen analitin derişimi ile doğru orantılıdır. Diğer iletici tipleri içerisinde ele alınan bir iletici türü de kalorimetrik sensörlerde kullanılır. Biyoduyarlı eleman ile analit arasında gerçekleşen etkileşimden doğan entalpi değişiminin ölçümüne dayanır.

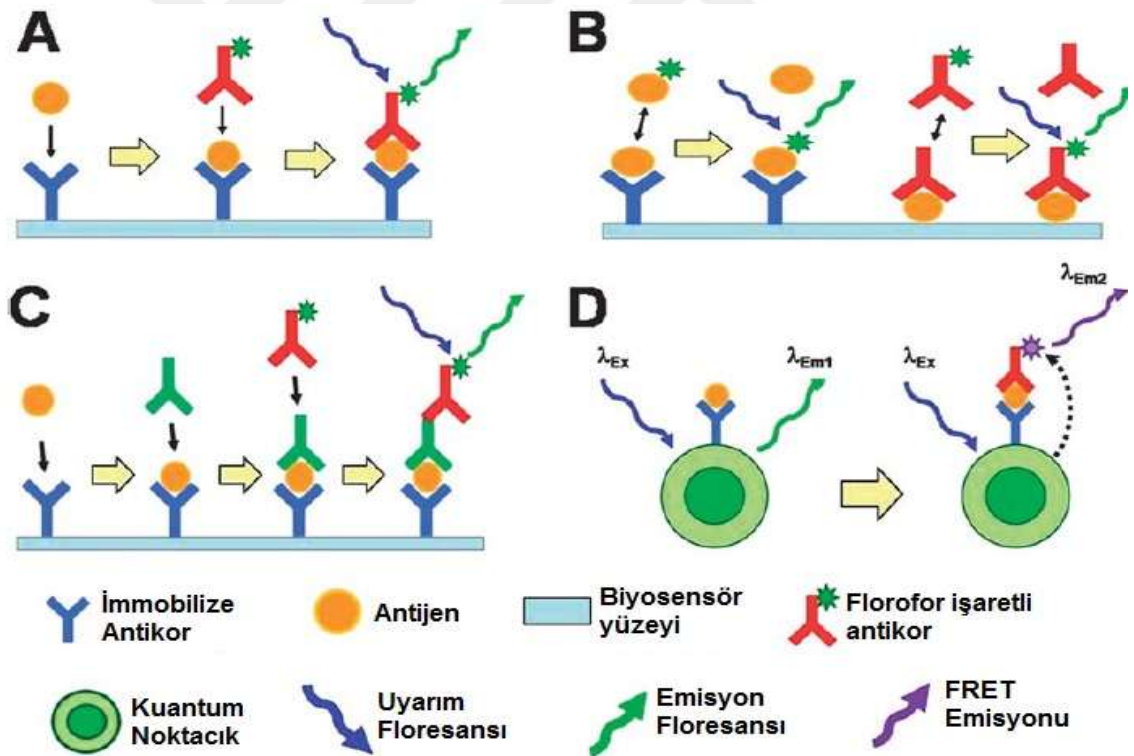
2.4.3 İmmünosensörler

Daha önce de bahsedildiği üzere immünosensörler, biyoduyarlı eleman olarak antijen ya da antikorun kullanıldığı ve bu iki tür arasındaki kompleks oluşturma etkileşimine dayanan biyosensörlerdir. Antijen-antikor etkileşiminin yüksek seçicilikte olması immünosensörlerin hassaslığını arttıran önemli bir faktördür. Ayrıca klinik anlamda bir çok hastalığa dair immünolojik biyobelirteçlerin ortaya koyulmuş olması da immünosensörlerin önemini bir kat daha arttırmaktadır.

İmmünosensörlerin temelleri immünotest anlayışından ortaya çıkmıştır. İmmünosensörleri, tasarlandıkları iletici tipine göre elektrokimyasal (amperometrik, kondüktometrik, potansiyometri ve impedimetrik), optik, akustik, kalorimetrik ve akustik olarak sınıflandırmak mümkündür. Bu türler arasında en sık kullanılan immünosensör türleri elektrokimyasal ve optik immünosensörlerdir. İmmünosensörler

ayrıca doğrudan ya da dolaylı olarak da sınıflandırılabilirler (Bahadır ve Sezgintürk 2015).

Doğrudan immünoensörlerde elde edilen sinyal antijen-antikor etkileşiminden sağlanmaktadır. Elektrotlar, membranlar, piezoelektrik materyaller ve optikçe aktif yüzeyler üzerine immobilize edilmiş antijen ya da antikor, çözelti içerisinde bulunan çiftiyle etkileşime girer ve bu kompleks oluşumu sonucu iletici tarafından ölçülebilir sinyal elde edilir. Doğrudan olmayan yöntemlerde ise antijen-antikor etkileşimi, antijen ya da antikora konjuge edilmiş işaretçinin gözlenebilmesi için gerçekleşir. Bu işaretçinin yüzeye tutunması ya da yüzeyden ayrılması, dolayısıyla sinyalin artması ya da azalması hedef analitin derişimi ile orantılı gerçekleşmektedir (Martin 2001, Mohammed ve Desmulliez 2011). Doğrudan ya da doğrudan olmayan yaklaşımlara dair şematik bir gösterim şekil 2.14’te gösterilmiştir.

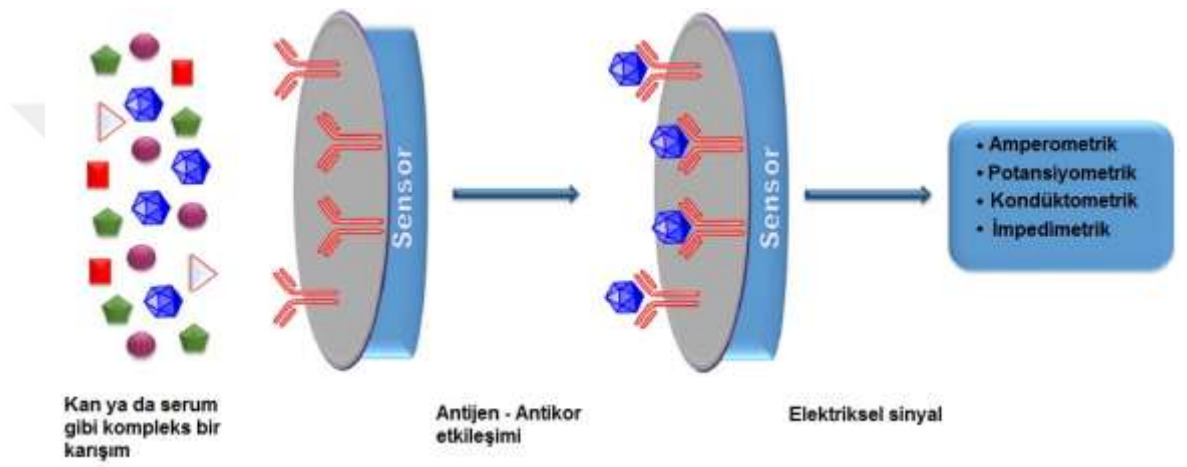


Şekil 2.14 Antijen-antikor bağlanma karakteristiklerine göre immünoensör tipleri.
(Mohammed ve Desmulliez, 2011)

a. Florofor etiketli ikincil antikor bağlanması ile oluşan sandviç yapısı. b. İşaretli antijen-antikor kullanılarak tasarlanan yarışmalı sistemler. c. İşaretli tersiyer antikor ile ileri düzey sandviç yapısı. d. İkincil FRET çiftli florofor kullanılarak kuantum noktacık üzerinde oluşturulan sandviç yapısı.

2.4.3.1 Elektrokimyasal immünosensörler

İmmünosensör teknolojisinde en yaygın kullanılan yaklaşım elektrokimyasal temele dayanan immünosensörlerdir. Duangkaew ve çalışma arkadaşları 2015 yılında gerçekleştirdikleri bir araştırmada, nanomateryal alanında kat edilen gelişimin elektrokimyasal immünosensör gelişimine büyük oranda ağırlık kazandırdığını bildirmişlerdir.



Şekil 2.15 Elektrokimyasal immünosensörlerin şematik gösterimi (Bahadır ve Sezgintürk 2015)

Elektrokimyasal immünosensörler genellikle kan ya da serum gibi, içerisinde birçok tür biyolojik molekül barındıran çözeltilerde çalışmak üzere tasarlanırlar. Bu kompleks karışım içerisinde ilgilenecek analitin seçilip tayin edilmesini antijen-antikor etkileşiminin kayda değer afinitesi sağlamaktadır. Bu amaç için elektrokimyasal iletici sistemi üzerine (örneğin elektrot üzerine) antijen ya da antikorun immobilizasyonu sağlanır. Bunun ardından çözelti içerisindeki analit ile immünolojik kompleks oluşumu gerçekleşir ve ilk durumla arada bir farklılık oluşmuş olur. Bu farklılığın iletici vasıtasıyla ölçülebilir sinyal haline getirilmesi ve değerlendirilmesi gerçekleştirilir (Şekil 2.15).

Elektrokimyasal immünosensörlerde iletici sistem olarak kullanılabilen birkaç yaklaşım mevcuttur. Bunlardan birisi amperometrik sistemlerdir ve bu sistemlerle ortaya koyulan immünosensörlere amperometrik immünosensörler adı verilir. Bu yaklaşımda sisteme uygulanan sabit potansiyel altında kimyasal etkileşim sonucu açığa çıkan geçen akım ölçülür. Bu gibi sistemlerde genellikle immünoaktif moleküller enzimlerle işaretlenirler. Bu işaretleme işleminde en sık glikoz oksidaz, yaban tüpu peroksidaz, oksidoredüktaz ve alkelen fosfataz gibi enzimler kullanılır. Amperometrik immünosensörlerin en büyük sınırlayıcısı çözelti içerisinde girişim etkisi yapabilecek başka türlerin olabileceğidir.

Bir diğer immünosensör çeşidi kondüktometrik sensörlerdir ve çoğuş biyolojik etkileşimin çözeltideki iyonik türlerin derişimini değıştirmesi temeline dayanır. Bu değışimin uygun elektrokimyasal düzenekle incelenmesi sonucu analitin derişimine geçiş yapılabilir. Ancak bu sistemin sahip olduğuş en büyük dezavantaj, diğer yaklaşımlara oranla duyarlılığın düşük olmasıdır.

Potansiyometrik immünosensörler ise iyon seçici elektrotta iyonik bir etkileşim sonucu gerçekleşen potansiyel değışimini ölçmek suretiyle tayin yapar. Elde edilen potansiyel değışim miktarı Nernst eşitliğinde yerine yazılarak analit miktarı tayin edilebilir. Bu yöntemin dezavantajı ise antijen antikor etkileşiminde potansiyel değışiminin düşük olması ve bazı durumların Nernst eşitliğine uymamasıdır.

2.5 Antikorlar

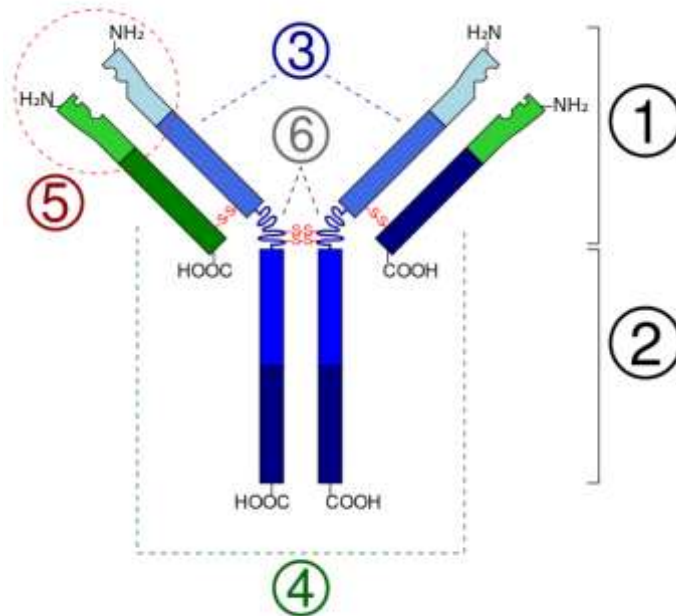
Antikorlar spesifik bir antijene bağlanma kapasitesi olan biyomoleküllerdir ve “Ab” olarak kısaltılır. Antijen ise immün yanıtı sebep olan ve vücut tarafından yabancı olarak algılanan bir moleküldür ve “Ag” olarak kısaltılır.

Antikorlar, immüoglobülinler olarak da adlandırılmaktadırlar ve toplam serum protein miktarının %20’sini oluştururlar. Genel olarak immüoglobülin A (IgA),

immünoglobülin D (IgD), immünoglobülin G (IgG), immünoglobülin E (IgE) ve immünoglobülin M (IgM) olarak beş ana sınıfta gruplandırılmakta olup serum immünoglobülinlerinin %80'i IgG'dir.

İmmünoglobülinlerin yapısı “Y” şeklinde monomerlere sahiptir. IgD, IgE ve IgG bu monomer yapısında immünoglobülinlerdir. IgA bu monomerin dimerleşmesinden meydana gelir. IgM ise monomerin beşli yani pentamer formunda bir araya gelmesinden oluşur. Y şeklindeki monomerin farklı bölümlerinin farklı görevleri vardır.

Ig monomerinde dört polipeptit zinciri mevcuttur. Birbirinin aynısı olan iki ağır zincir ve disülfid bağları ile birbirine bağlanmış iki hafif zincirin her biri immünoglobülin kısımları (immunoglobulin domains) adı verilen kompartmanlara ayrılır. Bu kısımlar 70-110 amino asit kalıntısı içermektedir ve boyut ya da şekillerine göre değişken ya da sabit olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 2.16 Bir immünoglobülin monomerinin yapısı

- 1) Fab bölgesi. 2) Fc bölgesi. 3) Ağır zincirler (mavi). 4) Hafif zincir (yeşil). 5) Antijen bağlanma bölgesi. 6) Bağlantı bölgeleri

Ağır zincirler α , δ , ϵ , γ ve μ gibi Yunan alfabesi harfleri ile ifade edilirler ve antikorun sınıfını belirlerler. Ağır zincir değişken ve sabit olmak üzere iki kısımdan oluşur. Sabit kısımlar aynı izotipteki bütün antikorlar için özdeştir. Memeli immünoglobülinlerinin hafif zincirlerde λ ve κ olmak üzere iki tür vardır. Ağır zincirde olduğu gibi hafif zincirde de sabit ve değişken kısımlar vardır.

Y formunun kolları, antijen bağlanma bölgesini içerir. Bu bölgeye Fab (fragment, antiden-binding) bölgesi adı verilir. Dallenmamış kısma ise Fc (fragment, crystallizable) bölgesi adı verilmektedir ve immün hücre aktivitesinin modülasyonunda görev alır. Antikorun antijeni tanıdığı bölgeye paratop, antijenin immün cevaba sebep olan bölgesine ise epitop adı verilmektedir. Aynı antijene cevap veren antikora poliklonal adı verilir. Monoklonal antikorlar ise bir antijenin aynı epitopuna cevap vermektedirler. Bu açıdan monoklonal antikorlar poliklonal antikora oranla daha yüksek spesifikliğı sahiptirler ancak afiniteleri daha düşüktür.

Antikor-antijen bağlanmasında hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler öne çıkmaktadır. Elektrostatik kuvvetler polaritesi yüksek moleküller arasındaki dipol etkileşimleri ya da yük taşıyan grupların birbirini itmesi ve ya çekmesinden doğmaktadır. Hidrojen bağları bu kuvvetlerin bir alt grubu olarak düşünülür ve yüksek elektronegativiteye sahip bir proton alıcının üzerindeki ortaklanmamış elektron çifti ile bir proton verici arasında gerçekleşir. Elektrostatik kuvvetler ve hidrojen bağları antikor-antijen etkileşiminin gücüne katkı sağlamaktadır. Van der Waals etkileşimleri zayıf dipoller arasında meydana gelir. Zayıf etkileşimler olmalarına rağmen fazla sayıda etkileşim meydana geldiğinden antijen-antikor etkileşimlerinin yaklaşık yarısından Van der Waals etkileşimleri sorumludur (Martin 2001).

İmmünoaktif moleküllerin bağlanma kinetikleri antikor ile antijen etkileşimini bir denge reaksiyonu olduğu üzerine kuruludur ve denge reaksiyonlarının kinetiğine benzetilmiştir. Birleşme (association) ve ayrılma (dissociation) yönlü tepkimelerin denge sabitleri oranı toplam reaksiyonun denge sabitine eşittir.

$$K = \frac{ka}{kd} = \frac{AbAg}{[Ab][Ag]} \quad (2.8)$$

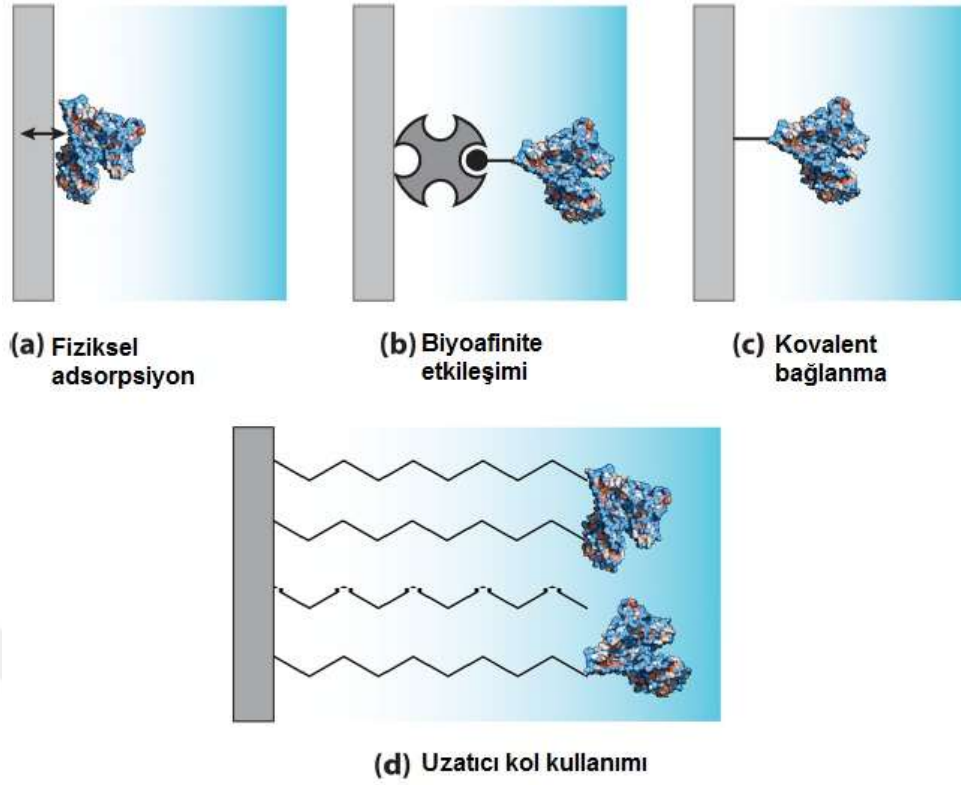
2.6 Biyoduyarlı Moleküllerin İmmobilizasyonu

Bir biyosensör ilgilenilen analiti tanıyıp bağlayacak biyoduyarlı bir eleman içermektedir. Bu elemanın sağladığı kimyasal değişim iletici yardımı ile ölçülebilir sinyale dönüştürülür. Biyoduyarlı elemanın iletici ile uygun şekilde bir araya getirilmesi biyosensör tasarımının en önemli basamaklarından birisidir. Bu basamağın tasarımı üretilcek biyosensörün duyarlılığından cevap süresine kadar birçok özelliğine doğrudan etki etmektedir (Kim ve Herr 2013).

Biyolojik materyaller doğrudan iletici yüzeyine bağlanabilecekleri gibi, polimer malzemeler gibi destek malzemelere ya da nanopartiküller üzerine de immobilizasyonları mümkündür. Günümüzde bu yaklaşımlar biyosensör teknolojisinde ön plana çıkan tasarım stratejileridirler.

2.6.1 Fizisorpsiyon (Fiziksel adsorpsiyon)

Bir proteinin herhangi bir yüzeye immobilizasyonuna dair en basit ve temel yaklaşım fizisorpsiyon yani fiziksel adsorpsiyondur (Şekil 2.17.a). Proteinler bu şekilde çeşitli yüzeylere elektrostatik, hidrofobik, Van der Waals ve hidrojen bağları gibi intramoleküler kuvvetler yardımıyla basitçe bağlanabilmektedirler. Protein çözeltisinin immobilizasyon yüzeyinde inkübe edilmesi ya da mikroakışkan sistemler için immobilizasyon yüzeyinde devamlı akışının sağlanması, karmaşık kimyasal süreçler gerektirmeksizin immobilizasyon yapılmasına imkan verir. Bu tekniğin en büyük sınırlaması, fiziksel adsorpsiyon etkileşimlerinin zayıf olması ve yüzeyde adsorbe olan protein tabakasının kararlılığının pH, sıcaklık ve iyonik şiddet gibi çevresel etkenlere büyük ölçüde bağlı olmasıdır (Kim ve Herr 2013).



Şekil 2.17 Biyoduyarlı moleküllerin immobilizasyonunda en sık kullanılan yaklaşımlar. (Kim ve Herr 2013)

a. Fiziksel adsorpsiyon. b. Biyoafinite etkileşimleri. c. Kovalent bağlama. d. Uzatici kol yardımı ile immobilizasyon.

2.6.2 Biyoafinite etkileşimleri

Biyoafinite etkileşimleri, ya da biyospesifik adsorpsiyon, doğada gözlemlenen spesifik bağlanma fenomeninden faydalanmaktadır. Bu teknik, görece daha güçlü, yüksek spesifitede ve yönlenmiş protein immobilizasyonu sağladığından ötürü fizisorpsiyona oranla daha avantajlıdır (Şekil 2.17.b). Bu şekilde immobilize protein daha iyi bir erişilebilirliğe sahip olur. Ayrıca kimyasal yöntemler, pH değişimi ve sıcaklık ayarlaması gibi işlemlerle geri dönüşüm sağlanabilir ve üretilen biyosensörün tekrar kullanılabilirliği sağlanabilir. Afinite sağlayacak ara biyomolekülün immobilizasyonu gerekli olduğundan, bu yaklaşım genellikle diğer bir immobilizasyon yaklaşımı (fizisorpsiyon ya da kovalent bağlama) ile birlikte kullanılır. Bu yöntemde sıklıkla

avidin-biyotin, protein A/G antikorları, DNA hibritleşmesi ve aptamerlerden yararlanılır (Kim ve Herr 2013).

2.6.3 Kovalent bağlanma

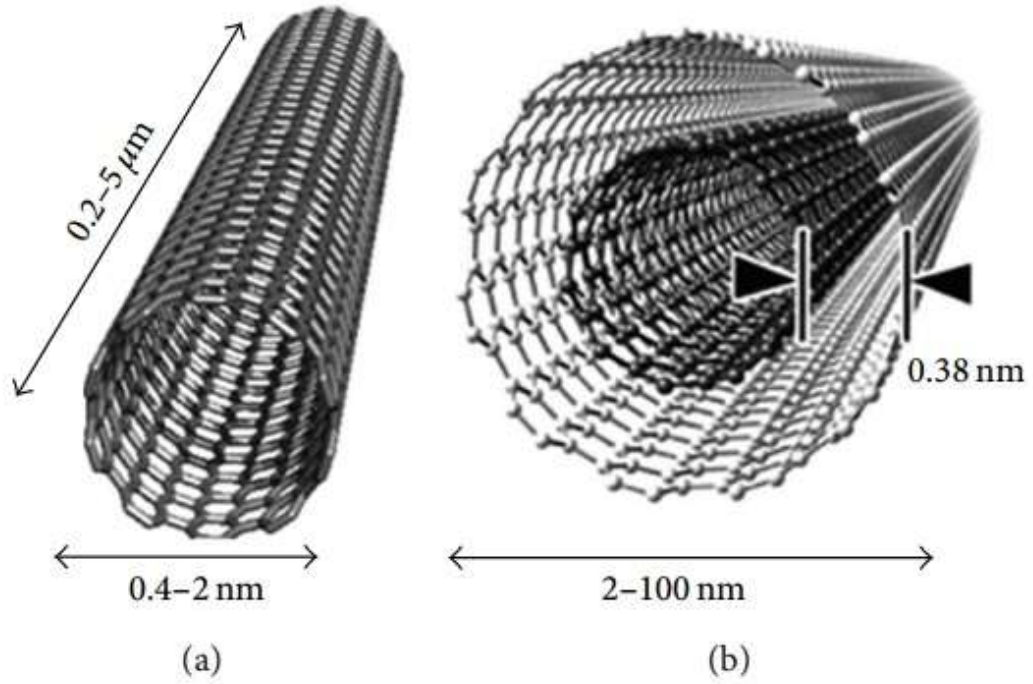
İmmobilizasyon yüzeyi ile biyoduyarlı molekül arasında kovalent bir bağ oluşumuna dayanan bu yaklaşımda, immobilizasyon yüzeyi aktive edilir ve biyoduyarlı elemanın yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanması sağlanır (Şekil 2.17.c). Bu yaklaşımla immobilize edilen biyolojik moleküller, fizisorpsiyon ya da biyoafinite yaklaşımına oranla yüzeyde daha kararlı şekilde tutuklanırlar. Bu yöntemde glutaraldehit, epiklorohidrin (ECH) ya da N-hidroksisüksinimit (NHS)/1-etil-3-(3-dimetilamonipropil) karbodiimit (EDC) çifti gibi çapraz bağlayıcılar yanı sıra biyoduyarlı eleman ile immobilizasyon yüzeyi arasına uzatıcı bir kol eklenmesi (Şekil 2.17d) sıklıkla kullanılır. Proteinlerin aktif bölgelerinden yüzeye bağlanmalarından kaynaklanan aktivite kaybı, toksik reaktantlar ve karmaşık kimyasal süreçler kovalent bağlanma yaklaşımının önemli sınırlayıcılarıdır (Kim ve Herr 2013).

2.7 Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler ilk kez Iijima tarafından 1991 yılında sentezlenmiştir (Iijima 1991). Iijima'nın keşfi ve Dunlop ve arkadaşlarının tek duvarlı karbon nanotüplerin kayda değer özellikleri ile ilgili ön görüşleri, dünya çapında bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. İlk etapta fulleren sentezi çabalarının bir uzantısı olarak görülen karbon nanotüp çalışmaları günümüzde nanopartikül temelli teknolojilerin geliştirilmesinde oldukça büyük bir öneme sahiptir (Sajid vd. 2016).

Karbon nanotüpler ilk olarak elektronik, optik, plastik ve nanoteknolojinin alanına giren diğer materyallerin yapısına katkı maddesi olarak eklenmiştir. 21. yüzyılın başından itibaren ise eczacılık ve tıp alanında ilaç taşıma ve terapötik amaçlarla yararlanılır bir nanopartikül haline gelmiştir. Yüksek yüzey alanı, mükemmel kimyasal kararlılık ve

yüksek elektronik poliaromatik yapıları sayesinde oldukça geniş yelpazede terapötik ajanları (ilaç, protein, antikorlar, DNA ya da enzimler gibi) absorblayabilir ya da konjugat oluşturabilir (He vd. 2013). Bunların yanı sıra diğer nanopartiküllerin de kullanım alanı bulduğu klinik diagnostik sistemlerin geliştirilmesinde de karbon nanotüplerin etkinliği gün geçtikçe artmakta, karbon nanotüp temeline dayanan birçok biyo- ve immünosensör literatürdeki yerlerini almaktadır.



Şekil 2.18 Karbon nanotüp yapısı

a. Tek duvarlı karbon nanotüp b. Çok duvarlı karbon nanotüp

Karbon nanotüpler yalnızca karbon atomlarından meydana gelir ve birbirine komşu benzen halkalarının tübüler bir yapı oluşturmak üzere sarılması ile oluşurlar. Bu sentetik nanomateryal grafit ve elmasla beraber karbonun üçüncü allotropu olan fullerenler ailesinin bir mensubudur. Yapısında hem sp^2 hem de sp^3 hibritleşmesinde karbon atomları bulundurmaktadır. Sahip olduğu katmanlara göre karbon nanotüpler iki sınıfa ayrılır:

- Tek duvarlı karbon nanotüpler (Single-walled carbon nanotubes, SWCNT)

- Çok duvarlı karbon nanotüpler (Multi-walled carbon nanotubes, MWCNT)

Tek bir grafen tabakasının kıvrılmasıyla tek duvarlı karbon nanotüpler elde edilirken birden fazla tabakanın kıvrılması, çok duvarlı karbon nanotüplerin oluşumuna imkan verir. Tek duvarlı karbon nanotüpler genellikle 0,4-2 nm arası çapa sahip iken çok duvarlı karbon nanotüplerin 2 ile 100 nm arası çap genişliği vardır. Çok duvarlı karbon nanotüplerin uzunlukları 0,2'den birkaç mikrometreye kadar değişebilmektedir (Sajid vd. 2016). Tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin basit bir karşılaştırılması çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin kıyaslanması (He vd. 2013)

Tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT)	Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT)
Bir grafen katmanı	Birden fazla grafen katmanı
Sentez için kataliz gerekli	Katalizörsüz üretilebilir
Toptan sentezi zor	Toptan sentez kolay
Fonksiyonellemede daha çok kusur	Daha az kusur ancak geliştirilmesi zor
Safılık düşük	Yüksek safılık
Vücutta birikimi az	Vücutta birikimi yüksek
Kolay karakterizasyon ve değerlendirme	Zor karakterizasyon ve değerlendirme
Bükülmesi kolay	Bükülmesi zor

Karbon nanotüp sentezinde en sık kullanılan yöntemler ark boşalması metodu, kimyasal buhar tortusu (chemical vapour deposition, CVD) ve lazer ablasyonudur. Bütün yöntemlerde birer karbon ve enerji kaynağı vardır. Karbon kaynağı olarak karbon elektrotlar ya da gazlar kullanılabileceği gibi enerji kaynağı olarak ise ark boşalması, lazer ya da sıcaklık kullanılabilir. Bu metotların temelinde tekil karbon ya da bir karbon grubu oluşturarak nanotüp üretebilecek rekombinasyonları sağlamaktır (Sajid vd. 2016). Uzun yıllardır fulleren sentezinde kullanılmış olan ark boşalması metodu karbon nanotüp sentezinin en kolay ve en sık kullanılan yöntemidir. Bu metotta karbon elektrotlar karbon kaynağı olarak kullanılır ve 20 V'luk potansiyel fark ve 50-100 A'lık akım ile oluşturulan ark enerji kaynağıdır. Düşük basınçlı inert gaz ortamında, kobalt, nikel ya da demir gibi bir katalizör yardımıyla oluşturulan arkın karbon elektrot

yüzeyinden karbonu buharlaştırıp karşıt elektrotta çubuk şekilli karbon yapılar oluşmasına imkan verecek düzeyde yüksek ısı açığa çıkarabildiği düşünülmektedir. Bu yöntemin çap aralığı 0,6-1,2 nm'dir (Sajid vd. 2016).

Lazer ablasyon metodu da karbon kaynağı olarak karbon elektrot kullanmakla beraber enerji kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır. Birbirini takip eden lazer pulslarının hedefi eşit şekilde buharlaştırması temeline dayanır. İkinci lazer pulsunun büyük parçaları kırarak küçük parçalar oluşturduğu ve bu küçük parçaların nanotüp yapılarına doğru büyüdükleri farz edilmektedir. Geçiş metalleri bu yöntemde de katalizör olarak kullanılır. Bu yöntemle 100 mikrometre boyunda ve 10-20 nm çap genişliğinde nanotüpler elde edilir (Sajid vd. 2016).

Kimyasal buhar tortusu büyük çaplı karbon nanotüp sentezi için kullanılan bir yöntemdir. Metan, asetilen ve karbonmonoksit gibi organik bileşikler karbon kaynağı olarak olarak kullanıldığı bu yöntemde yüksek sıcaklık karbon bileşiklerinin bozunması için gerekli enerjiyi sağlar. Kobalt ya da demirin katalizör, silika ya da zeolitin destek materyal olarak kullanıldığı bu yöntem büyük miktarlarda tek duvarlı karbon nanotüp sentezine imkan vermektedir. Bu yöntemlerin (Çizelge 2.2) haricinde alev sentezi metodu ve silan çözeltisi metodu da rapor edilmiştir (Sajid vd. 2016).

Çizelge 2.2 Karbon nanotüp sentezinde en sık kullanılan yöntemler

Ark boşalma metodu	Kimyasal buhar tortusu	Lazer ablasyonu metodu
Enerji kaynağı elektrik boşalması	Enerji kaynağı yüksek sıcaklık (900° C)	Yüksek sıcaklıkta yüksek yoğunluklu lazer pulsları
Karbon kaynağı karbon elektrot	Karbon kaynağı metan, karbonmonoksit ve asetilen gibi gazlar	Karbon kaynağı karbon elektrot
Saf karbon elektrotlar MWCNT üretir	Karbon kaynağının metal katalizörle katı destek materyali üzerinde bozunması CNT üretir	Saf karbon elektrotlar MWCNT üretir
Metal doplanmış elektrotlar SWCNT üretir		Metal doplanmış elektrotlar SWCNT üretir
Yüksek safsızlık dezavantajı		

Karbon nanotüplerin mekanik, elektronik ve pratik faydaları olmasına rağmen canlı organizmalar için toksik etkisi vardır. Çok sayıda çalışma hücre hatlarında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indüklediği ve mitojen aktiflenmiş protein kinaz (MAPK), aktivatör protein-1 (AP-1) ve aktiflenmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir çoğaltıcı (NF-κB) gibi ROS ile ilişkili hücreler arası sinyal yollarını doza bağlı olarak aktive ettiğini rapor etmiştir. Karbon nanotüplerin IL-1β, TNF-α, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin makrofajlar ve mezotelial hücrelerden salgısını stimüle edebildiği bildirilmiştir (Fard vd. 2015).

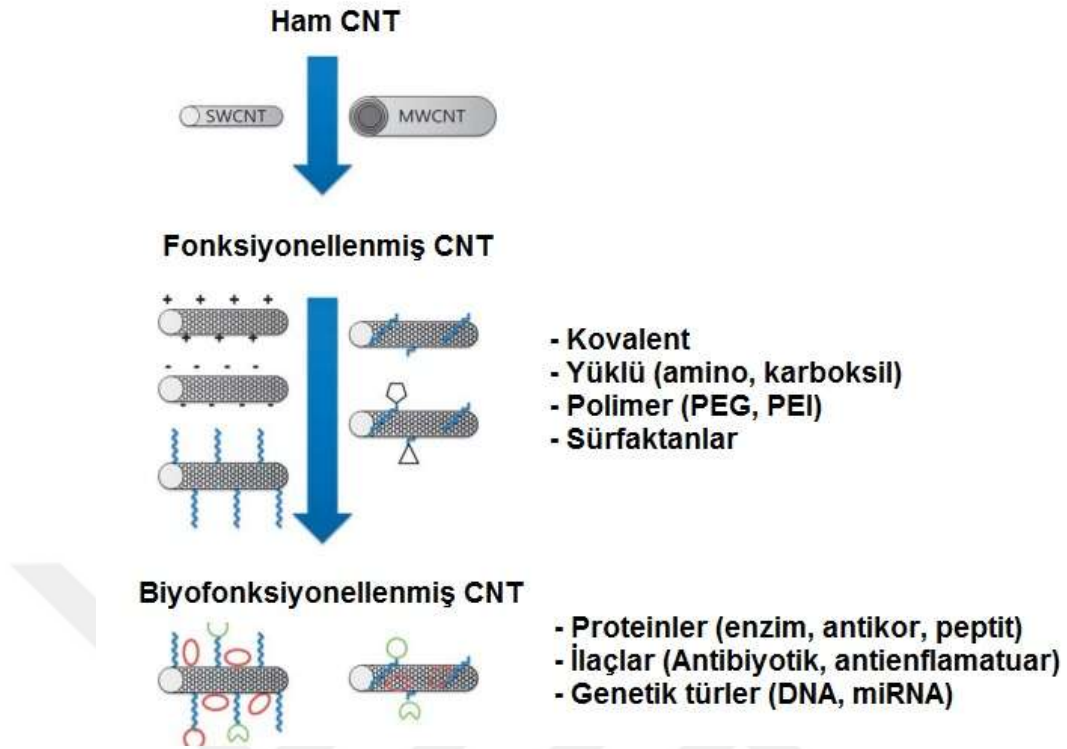
Yapısal, mekanik ve elektronik özelliklerinin yanı sıra yüksek yüzey alanı/hacim oranı sağlayabilmeleri, kolaylıkla fonksiyonellenip ilgilenilen özellikleri kazanabilmeleri ve biyouyumluluk kazanabilmeleri karbon nanotüpleri biyosensör alanında önemli bir araç haline getirmiştir. Biyosensör uygulamalarına karbon nanotüplerin dahil edilmesinin birkaç yolu rapor edilmiştir. Substrat üzerinde materyalin oluşturulması, damlatma metodu ile iletici üzerine karbon nanotüp immobilizasyonu, polimer karışımlarına karbon nanotüp ilave ederek nanokompozit yapılar elde etme, karbon nanotüpler ile metal nanopartiküllerin birlikte kullanılması bunlardan yalnızca bir kaçıdır. Karbon nanotüp temelli biyosensörlerin en büyük avantajları düşük maliyet ile üretilabilmeleri ve elektrokimyasal sensörler özelinde oldukça iyi elektron transferi sağlayabilmeleridir (Yang vd. 2015).

2.7.1 Karbon nanotüplerin fonksiyonellenmesi

Karbon nanotüplerin sahip olduğu en önemli avantajlardan birisi de ilgilenilen alana yönelik özellikler kazandırma amaçlı olarak yüzeye farklı fonksiyonel grupların eklenebilmesidir. Dahası, elektron transferini artırma amaçlı olarak enzimlerin karbon nanotüp üzerine yönlenme kontrolü immobilizasyonu gibi çalışmalar bildirilmiş ve karbon nanotüplerin fonksiyonellenmesinin önemini bir kez daha ortaya koymuştur. Karbon nanotüp fonksiyonellenmesinde en sık kullanılan iki fonksiyonel grup karboksil ve amino gruplarıdır. Bu grupların yüzeyde oluşturulması ile daha farklı ajanların yüzeye immobilizasyonu mümkün kılınabilmektedir (Babadi vd. 2016).

Kovalent ve kovalent olmayan fonksiyonellemeler ile yüzey konjugasyonları ya da geri dönüşümlü fonksiyonellemeler sağlanabilmektedir. Kovalent fonksiyonellemenin ilk basamağı genelde karbon nanotüp yüzeyindeki defektlerde karboksil fonksiyonel grubu oluşturulur. Bu işlem için, katalizörden arındırılmış ham karbon nanotüpler, güçlü asit karışımları (H_2SO_4/HNO_3 gibi) ile muamele edilir. Elde edilen karboksil fonksiyonel karbon nanotüpler bu halleriyle biyolojik materyalle etkileştirilebileceği gibi, fonksiyonellemenin ilerleyen basamaklarında amino gruplarıyla da etkileştirilebilirler. Devam eden fonksiyonelleme işlemi için karboksil basamağının bir sonrasında tiyonil klorür ($SOCl_2$) klorlayıcı bir ajan ile açıl klorürlerin oluşturulması hedeflenir. Açıl klorürler, reaksiyon yatkınlıkları çok yüksek olduğu için istenen moleküllerle etkileşimi kolaylaştırır ancak çabuk bozunabilme gibi dezavantajları da mevcuttur. Açıl klorürlenmiş karbon nanotüp bu aşamadan sonra hidroksil ($-OH$) ya da amino ($-NH_2$) gibi gruplarla etkileştirilerek istenen molekülün (örneğin polimer zinciri) karbon nanotüpe kovalent bağlanması gerçekleştirilmiş olur.

Kovalent olmayan karbon nanotüp fonksiyonellesinde karbon nanotüplerin aromatik yapılarından yararlanılır. Protein gibi içerisinde aromatik aminoasitleri barındıran yapılarla karbon nanotüplerin aromatik halkaları arasında p-istiflemesi yolu ile fonksiyonelleme sağlanabilmektedir. Ayrıca DNA gibi uzun zincirli moleküllerin karbon nanotüp yüzeyine sarılması da bir başka kovalent olmayan fonksiyonelleme biçimidir. Son olarak karbon nanotüplerin polimerlerle kaplanması da istenen fonksiyonelleme özelliklerini karşılayabilmektedir.



Şekil 2.19 Karbon nanotüp fonksiyonellemesinin biyolojik uygulamaları (Hwang vd 2013)

2.8 Multipl Skleroz (MS)

Multipl Skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin, inflamasyon, demiyelinizasyon, aksonal bozunma ve glioz ile karakterize olan kronik, immün-aracılı bir hastalıdır. MS teşhisi genellikle 20 ile 50 yaş arasında koyulur ve kadınların erkeklere oranla iki ila üç kat daha fazla yatkınlıkları söz konusudur (Streber vd. 2016). 13. yüzyıldan itibaren bazı kaynaklarda MS belirtilerine benzer hastalık öykülerine rastlanıyor olsa da, MS'in klinik ilk tanımlaması, "Nörolojinin babası" olarak anılan Jean Martin Charcot tarafından, 1868 yılında La Salpetriere Hastanesi'nde yapılmıştır (Charcot 1868). MS hastalığı, beyin ve omurilik beyaz cevherinde ortaya çıkan inflamatif plakaların nörolojik yıkıma sebep olduğu, birbirini izleyen hastalanma ve iyileşme dönemleri ile ifade edilebilir. Plakalar çok sayıda ve farklı zamanlarda ortaya çıkmışlardır. Her atakta aksonlar yıkıma uğramaktadır ve bir sonraki atakta da aynı akson demetinin hasara uğraması durumunda, aksondaki hasar kalıcı hale gelmektedir. Bu durumda nörolojik işlevlerin sekteye uğraması, ilerleyen durumlarda ise işlevin kaybolması söz konusudur.

2.8.1 Epidemiyoloji

MS hastalığı genellikle 20 ile 50 yaş aralığında görülmektedir ve ortalama başlangıç yaşı 30'dur. Buna rağmen hastalık çocukluk çağında ya da 60 yaş sonrası da gelişebilmektedir. Kadınların erkeklere oranla 3 kat daha fazla hastalığa yakalanma istatistiği mevcuttur. Dünya'da 2,5-3 milyon MS hastası olduğu düşünülmektedir. Afrika'nın büyük bölümü ile Doğu Asya'da 5/100.000 gibi bir görülme sıklığına sahipken Kuzey ve Orta Avrupa, Kuzey Amerika ve Güneydoğu Avusturalya'da bu oran 100/100.000'e kadar çıkmaktadır. Göç üzerine yapılan çalışmalarda özellikle ergenlik çağı öncesi yaşanan göç sonucunda, göçmenlerin yerel toplulukla benzer bir prevelans sıklığına sahip olduğu bildirilmiştir (Milo ve Miller 2014).

2.8.2 Klinik özellikler ve prognoz

MS hastaları merkezi sinir sisteminin farklı kısımlarından kaynaklanan, tek başına ya da kombinasyon halinde görülen oldukça çeşitli nörolojik belirtiler ve işaretler göstermektedir. Bu belirtiler ani bir atak ya da sürekli bir şekilde ilerleyen şekilde ortaya çıkabilir. Genel belirtileri uyuşma, karıncalanma, motor güçsüzlüğü, görme bozuklukları, çift görme, koordinasyon bozukluğu, baş dönmesi, vertigo ve yürüyüş bozukluğudur. Diğer bazı eşlik eden belirti ve işaretler ise yorgunluk, kasların kasılı kalması, ataksi, sensörsel kayıp, nöropatik ağrı, üriner sistem bozukluğu, seksüel disfonksiyon, depresyon ve sıcaklık intöleransı gibidir. Yaklaşık 10 yıllık hastalık devamında yürüyüş bozuklukları artmakta ve hastalar genelde destek ile yürüyebilmektedirler. Tahmini ömür 7 ila 10 yıl arasında kısalmaktadır (Milo ve Miller 2014).

2.8.3 Hastalığın seyri

Her ne kadar hastalığın seyri hastadan hastaya farklılık gösteriyor olsa da dört ana başlık altında toplanabilmektedir (Milo ve Miller 2014):

- Relapsing (atak) – remitting (iyileşme) MS (RRMS): Yeni ya da önceden ortaya çıkmış nörolojik semptomların açıkça ortaya koyulmuş atakların tam ya da kısmi iyileşmesi ve bu ataklar arasında hastalık ilerlemesinin olmaması ile ifade edilir. Tüm MS vakalarının %80-85'i RRMS olarak tanımlanmıştır.
- Birincil İlerleyen MS (PPMS): Başlangıçtan itibaren ilerleyen seyirde devam eden MS hastalığı için kullanılır. Zaman zaman yatay seyir ve ufak düzelmeler olabilir. Tüm hastaların %10-15 kadarı birincil ilerleyen MS'den muzdariptir.
- İkincil İlerleyen MS (SPMS): RRMS ile başlayan hastalığın ataklı ya da ataksız ve ufak iyileşmeler ve kısmi yatay seyirlerle ilerleyen hal alması ile ifade edilir. RRMS hastalarının %50'si 10 yıl içerisinde, %90'ı se 25 yıl içerisinde SPMS'e dönüşür.
- Ataklı İlerleyen MS (PRMS): Açık akut ataklar ve iyileşmesiz, ilerleyici karakterde MS hastalığıdır. Ataklar arasında hastalık ilerlemesi devam eder.

Bazı diğer MS sınıflandırmaları şu şekildedir:

- Klinik olarak izole sendrom (CIS): MS şüphesi olan ilk klinik bölüm.
- Radyolojik olarak izole sendrom (RIS): Tipik MS lezyonlarının, klinik kanıt olmaksızın MRI'da görüldüğü bölüm. Bazen belirtisiz ya da prelinik MS olarak adlandırılır.
- İyi huylu MS: Bir hayli tartışmalı olan bu sınıflandırmada hasta, hastalık başlangıcından sonraki 15 yıl içerisinde herhangi bir fonksiyon kaybına uğramaz.
- Kötü huylu MS: Hızlı bir ilerleme süreci sonunda, birçok nörolojik sistemde kayda değer miktarda fonksiyon kaybı olması ya da ölümlerle ifade edilen hastalık tipidir.
- Tek ataklı ilerleyen MS: SPMS'in bir alt türü olarak kabul edilen ve nadir görülen bu tipte tek bir atak sonrası ilerleyen tipte bir hastalık seyri vardır.
- Geçiş MS: RRMS ile SPMS arasındaki geçiş fazını ifade eden bir türdür.

2.8.4 Patoloji ve patogeneze

MS plakları merkezi sinir sisteminin herhangi bir yerinde; ventriküller, optik sinirler, corpus collosum, uzun traktlar ve omuriliği subpial bölgeleri ile beyin sapının beyaz maddesinde meydana gelebileceği gibi boz maddede de oluşabilmektedir. Bu plakalar mononükleer inflamasyon hücrelerinin (T-lenfositler, monositler/makrofajlar, B ve plazma hücreleri) perivenüler infiltratlarından, demiyelinize olmuş aksonlardan, azalmış sayıda oligodendrositten, kesilmiş aksonlardan, gliozaya sebep olan astrosit proliferasyonundan meydana gelmiştir. Geleneksel anlamda MS, T-hücre aracılı otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilir.

MS büyük ihtimalle CD4+ T yardımcı tip 1 (Th1) hücrelerinin, merkezi sinir sistemi antijenlerine karşı aktive olması ile başlar. Aktive olmuş immün hücreler hücre adezyonu moleküllerinin sentezini artırır ve interlekin-2, interferon gama ve tümör nekroz faktörü alfa gibi inflamasyon öncesi sitokinleri salgılar. Merkezi sinir sistemine girdikten sonra T hücreleri, mikroglia gibi antijen barındıran hücreler tarafından ya da merkezi sinir sistemi antijenleri barındıran dendritik hücreler tarafından tekrar aktive edilebilir. Bu tekrar aktif hale getirme, inflamasyon bölgesinde başka hücrelerin de aktive olmasına, bazı sitokin ve kemokinlerin salgılanmasına sebep olur ve bölgede buluna mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu sağlar. Bununla beraber, çok sayıda miyelin proteinlerini tanıyan MHC sınıf-II kısıtlı CD8+ sitotoksik T-hücresi de lezyon kenarları ve perivasküler bölgelerde mevcuttur ve miyelin, oligodendrosit ve akson hasarını antijen bağımlı ya da bağımsız olarak arttırmaktadır (Milo ve Miller 2014).

2.8.5 Teşhis

MS teşhisi semptomların ve işaretlerin değerlendirilmesi, MRI gibi görüntüleme sistemlerinden yararlanılması ve MS semptomlarını mimik edebilen başka hastalıkların elenmesi yoluyla yapılmaktadır. MS teşhisinde kullanılan tek bir laboratuvar testi

olmamakla beraber, beyin omurilik sıvısının protein yapısının incelenmesi gibi yardımcı yöntemler ile teşhis gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır.

MS teşhisine yönelik belirli bir standart getirmek amacıyla yapılan ilk öneri, Schumacher vd. (1965) tarafından 1965 yılında bildirilmiştir:

- Nörolojik incelemede merkezi sinir sistemi fonksiyonu bozukluğuna ithaf edilebilir objektif anormallikler, teşhis için belirtiler yeterli değildir
- Nörolojik inceleme ya da medikal geçmişte hastalıkla bağdaştırılabilecek merkezi sinir sisteminin en az iki farklı bölgesinde kanıt olmalı.
- Beynin beyaz maddesinde merkezi sinir sistemi hastalığı olduğu kanıtı
- İki farklı tipte dağılım:
 - 24 saat sürmüş ve kötüye giden 2 ya da daha fazla atağın en az bir ay aralıkla yaşanmış olması
 - 6 aylık süreçte yavaş ya da adım adım kötüleşen belirtiler olması
- Hastanın yaşı 10 ila 50 arasında olmalıdır
- Hastalık belirtileri MS'den başka bir hastalıkla daha iyi açıklanamaz olmalıdır.

Bu kriterlerin MS teşhisinde standardı oluşturmasının ardından, klinik testlerin gelişimiyle beraber Poser vd. (1983) bir başka kriter sistemini 1983'te önermişlerdir.

Çizelge 2.3 MS teşhisinde Poser kriterleri (Poser vd. 1983)

	Ataklar	Klinik lezyonlar	Paraklinik lezyonlar	MSS bantları ya da artan IgG endeksi
Klinik kesin MS	2	2		
	2	1	ve 1	
Laboratuvar destekli kesin MS	2	1	ya da 1	+
	1	2		+
	1	1	ve 1	+
Klinik olası MS	2	1		
	1	2		
	1	1	1	
Laboratuvar destekli olası MS	2			+

Yeni ve etkili terapiler, erken teşhis ve tedavi gerekliliği ve MRI görüntülerinin kullanılması, yaygın bir şekilde kullanılan Poser kriterlerinin revize edilmesini gerekli kılmıştır. 2000 yılında Dr. W. Ian McDonald başkanlığında toplanan International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis (Uluslararası Multipl Skleroz Teşhisi Paneli) Poser kriterlerini tartışmış ve uygun değişiklikler önermiştir (McDonald vd. 2001).

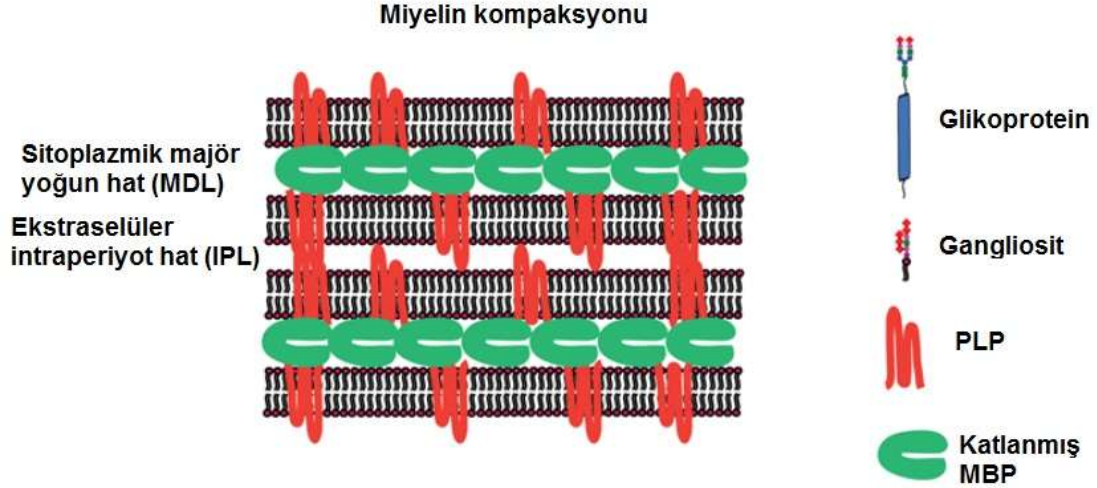
Çizelge 2.4 MS teşhisinde McDonald kriterleri (McDonald vd. 2001)

Klinik Görünüm	MS tanısı için gerekli ek bulgu
≥ 2 atak	Yok
≥ 2 lezyonun klinik kanıtı	
≥ 2 atak	• MRI
1 lezyonun klinik kanıtı	• MS pozitif BOS ile desteklenmiş ≥ 2 MRI’da gözlenen lezyon
	• Bir diğer klinik atak tarafından alana yayılım
1 atak	• MRI
≥ 2 lezyonun klinik kanıtı	• İkinci klinik atak tarafından alana yayılım
1 atak	• MRI
1 lezyonun klinik kanıtı	• MS pozitif Bos ile desteklenmiş ≥ 2 MRI’da gözlenen lezyon tarafından alana yayılım ve
	• MRI
	• İkinci atak

2.9 Çalışmada Kullanılan Biyomolekül, Taşıyıcı, Nanopartikül ve Çapraz Bağlayıcılar

2.9.1 Miyelin temel protein (Myelin Basic Protein, MBP)

Miyelin Temel Proteini (Myelin Basic Protein, MBP) merkezi sinir sisteminde, sinirlerin etrafını saran miyelin kılıfının önemli bir bileşeni olan bir proteindir. Olgunlaşan oligodendrositlerde MBP geni tarafından kodlanan bu proteinin farklı kesim izoformları mevcuttur ve bu izoformlar 14-21,5 kDa'luk moleküler kütleye sahiptir. Yetişkin miyelinin büyük bir kısmını oluşturan 18,5 kDa'luk izoform oligodendrosit membranının sitozolik yüzeylerini bitişirir ve komplakt haldeki miyelinin içerisine protein difüzyonunu kısıtlayan iki boyutlu bir moleküler elek oluşturur. Fakat bu görevinin yanı sıra sitoiskelet oluşumu, membran uzaması, Fyn-aracılı sinyalizasyon yolları ve kalsiyum homeostazisi gibi etkileşimlerde de yer almaktadır (Harauz ve Boggs 2013).



Şekil 2.20 Miyelin kılıfın şematik gösterimi. Yeşil ile gösterilen bileşen katlanmış MBP molekülünü temsil etmektedir. (Bakhti vd. 2014)

Klasik 18,5 kDa'luk izoform yaklaşık 50 yıl önce ensealojenik determinant olarak izole edilmiştir ve bu protein merkezi sinir sisteminin bütünleyici bir proteini olarak oligodendrositlerin sitoplazmik tabakalarını birbirlerine bitişirerek majör yoğun hattı

oluşturur. (Harauz ve Boggs 2013). MBP geni knock out edilmiş farelerde titreme modeli oluşturulmuş ve bu farelerin merkezi sinir sistemi miyelinleri seyrek ve yapılandırılmamış halde oldukları gözlenmiştir. Miyelinizasyon mertebesi MBP seviyesine bağlıdır. Farklı MBP seviyeleri ile modellenmiş farelerde yapılan çalışmalarda miyelin kılıfın kalınlığının MBP seviyeleri ile doğru orantılı olduğu keşfedilmiştir (Readhead vd. 2006).

Merkezi sinir sistemindeki miyelinlerin ağırlık olarak yaklaşık %70 kadarı lipitlerden oluşmasına ve birçok farklı proteinin yapıda bulunmasına rağmen en sık görülen proteinler MBP ve PLP (miyelin proteolipit protein)'dir (Kramer vd. 2001). Miyelin direnci 5000 kat arttırıp kapasitansı 50 kat azaltır ve böylelikle sinir iletiminin sınıf liflerine oldukça hızlı bir şekilde aktarılmasını sağlar. Bunun yanı sıra elektriksel sinir iletiminin dağılmasını da önlemektedir.

MBP'nin BOS'taki normal seviyesi 4 ng/mL değerinden azdır. Bu seviyenin 4 ila 8 ng/mL olması merkezi sinir sistemi tramvası, kronik miyelin yıkımı ya da daha önceden yaşanmış olan bir merkezi sinir sistemi tramvasının düzelme aşamasını temsil eder. 9 ng/mL değerinden yüksek BOS MBP seviyesi etkin miyelin yıkımını gösterir (Lamers vd. 2003).

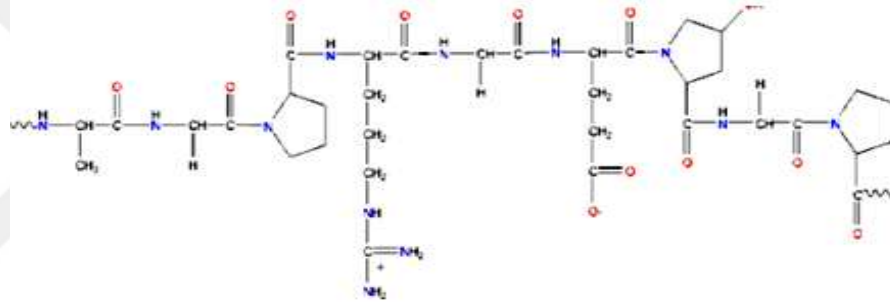
2.9.2 Jelatin

Bu tez çalışmasında biyolojik duyarlı eleman immobilizasyonunda taşıyıcı unsur olarak jelatin kullanılmıştır.

Jelatin, kolajenin hidrolizi ile elde edilir ve fizyolojik ortamda yüksek biyoyumluluk ve biyobozunurluk gösterir. Jelatinin biyolojik bozunumunda oldukça az antijen açığa çıkar ve sinidirimini ara basamaklarında zararsız metabolik ürünler oluşur (Santoro vd. 2014). Jelatin üretiminde çıkış maddeleri olarak genellikle domuz derisi, sığır postu,

kemik ve diğer kaynaklar kullanılır. Jelatin üretiminde %39'luk oranla Batı Avrupa başı çekmektedir.

Jelatin polipeptit yapısındadır. Molekül ağırlığı 3000 ile 20000 arasında değişmektedir. Jelatinin biyolojik uygulamalarda en öne çıkan özelliği, bir hidrojel olarak sıcaklığa bağlı geri dönüşümlü jel oluşumudur. Çapraz bağlayıcılarla zincirler arası bağlanma sağlanarak bu sol-gel (çözelti-jel) durumu geri dönüşümsüz hale getirilebilmektedir. Jelatinin bir diğer önemli özelliği, polipeptit yapısından dolayı, amin (-NH₂), karboksil (COOH) ve hidroksil (-OH) gibi bir çok fonksiyonel grubu barındırması ve bu gruplar vasıtasıyla, arzu edilen özelliklerin kazandırılabilen olmasıdır.



Şekil 2.21 Jelatin monomerinin yapısı

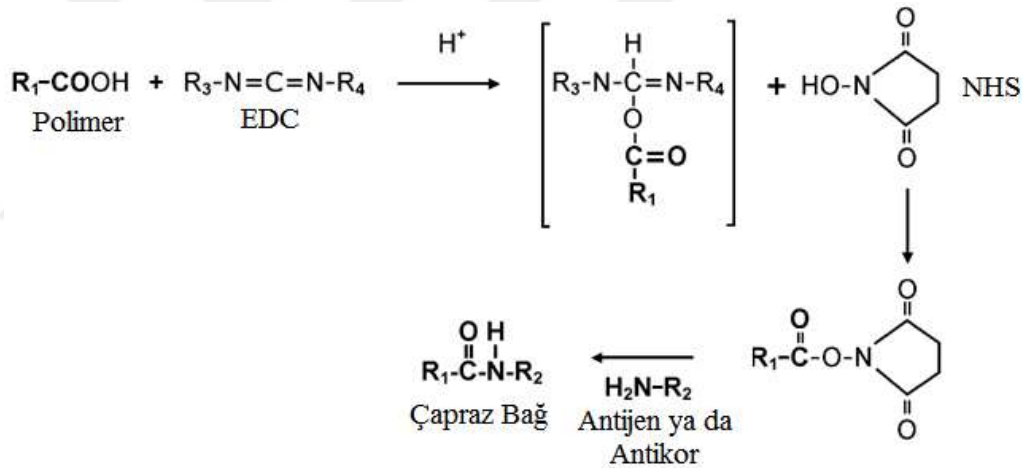
2.9.3 Karbon nanotüpler

Bu tez çalışmasında Sinop Üniversitesi, Malzeme Mühendisliği bölümü öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Mehmet Lütfi Yola ve ekibi tarafından sağlanan karbon nanotüpler kullanılmıştır. Söz konusu karbon nanotüpler karbonil grubu ile fonksiyonellendirilmiştir.

2.9.4 Çapraz bağlayıcılar

2.9.4.1 (NHS)/ (EDC) çapraz bağlayıcı çifti

N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDC) birlikte kullanıldıkları takdirde bir karboksil (-COOH) grubu ile bir primer amin grubunu (R-NH₂) birbirine amit bağı ile kovalent olarak bağlamaktadır. Etkileşimin ilk basamağında EDC karboksil grubu ile birleşerek kararsız bir açilizoüre bileşiği oluşturur. Bu bileşiğin NHS ile etkileşerek amin gruplarına karşı reaktif NHS esteri oluşturması ve oluşan bileşiğin karşıt molekülündeki primer amino grubu ile etkileşmesi sonucu iki molekül birbiri ile kovalent olarak bağlanır.



Şekil 2.22 NHS/EDC çapraz bağlama çiftinin kimyasal etkileşim mekanizması

2.9.4.2 Epiklorohidrin (ECH)

1848 yılında Marcellin Berthelot tarafından tanımlanan epiklorohidrin, oksiran halkasına bağlı bir metilen klorür grubu barındırmaktadır ve IUPAC tarafından klorometiloksiran olarak isimlendirilmektedir. Çapraz bağlama reaksiyonlarında sıkça kullanılan epiklorohidrin, hidroksil gruplarının aktive edilmesi ve diğer fonksiyonel gruplara bağlanmasında görev alır. Bazı ortamda gerçekleşen bu reaksiyon, hidroksil

fonksiyonel grubunun oksijeni ile oksiran halkasında kısmı pozitiflik kazanmış karbon atomu arasında oluşan bağın halkayı açması, yapıdan klorun ayrılması ve karşıt molekülde bulunan nükleofil karakterli atom ile bağlanmanın sağlanması mekanizması ile gerçekleşmektedir.

2.10 Kaynak Araştırması

İmmüno sensör çalışma prensibinin temeli Yalow ve Berson tarafından 1959 yılında atılmış, o günden bu yana bu alandaki bilgi birikimi katlanarak artmıştır. Bu alandaki çalışmalar 1980 itibaren yoğunlaşmıştır. Haga ve arkadaşları (1980) geliştirdikleri oksijen elektrodunda spin membran immünotest ve enzim immünotest yöntemlerinden yararlanılmış ve tiofilin antijeninin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Amplifikasyon için lipozomların dahil olduğu bu sistemle 4×10^{-9} M mertebesinde tayin yapmışlardır. Boitieux vd. (1984) radyoaktif izotoplarla çalışmaktan doğan engelleri aşmak için, model olarak seçtikleri Hepatit B yüzey antijeni kullanarak immüno sensör sistemi tasarlamışlardır. Jelatin membran üzerine immobilize edilen Hepatit B spesifik antikor ile katı halde sandviç tipinde hazırlanan bu immüno sensör ile Hepatit B antijeninin düşük konsantrasyonda ve hızlı tayinini başarmışlardır. Parry vd. (1990) geliştirdikleri immüno sensör ise serum, plazma ve tam kanda ölçüm alabilen, *rubella* antikorunun tayinine yönelik optik bir sensördür. Reaktif eklenmesine gerek duymayan bu sistem ile %94'lük bir regresyon katsayısına sahiptir ve 10 dakika içerisinde 30 IU/mL mertebesinde tayin gerçekleştirebilmektedir. Bouvrette ve Luong (1995) gıda örneklerinden *E.coli* tayini yapmak amacıyla poröz aminopropil cam boncuklara anti-*E.coli* antikorları immobilize etmişler ve akış enjeksiyonu içeren bu sistem ile 30 dakikada 5×10^7 CFU/mL'lik tayin gerçekleştirmişlerdir. Susmel vd. ise (2000) piezoelektrik prensibine dayanan bir metot ile, Protein A ve tiyol/poli-L-lizin içeren destek materyali üzerine immobilize ettikleri antijen ile insan sitomegalovirüsü için bir immüno sensör hazırlamışlardır. Tasarladıkları sistem 2,5 ile 5 µg/mL konsantrasyon aralığında lineer davranış göstermekte ve 1 µg/mL tayin limitine sahip idi. Diaz-Gonzalez ve çalışma arkadaşları (2005), çalışma, karşıt ve referans elektrotların aynı substrat üzerine entegre edilmesinden meydana gelen baskı devre (screen-printed)

karbon elektrotlar kullanarak ve bu elektrotlar üzerine Ag360 antijenini immobilize ederek, voltametrik ölçümlere dayanan bir elektrokimyasal mikobakter tüberkloziz immünosensörü geliştirmişlerdir. Bu sistem ile 1 ng/mL mertebesinde teşhis sağlayabilmektedir. Messina ve çalışma arkadaşları ise (2008) mikroakışkan bir biyoçip kullanarak interlökin-6'nın serum konsantrasyonunu saptamaya yönelik elektrokimyasal bir sistem geliştirmişler ve 1,56 pg/mL'lik bir tayin sınırına ulaşmışlardır.

1991 yılında Iijima ve arkadaşları tarafından sentezlenen karbon nanotüpler, keşfedildikleri günden bu yana gittikçe büyüyen bir nanoteknoloji araştırma sahasıdır. Mekanik kararlılıkları ve üstün elektronik özellikleri sayesinde bu nanoparçacıklar günümüzde kök hücre farklılaşmasından biyosensör uygulamalarına kadar oldukça geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmaktadır. Karbon nanotüplere fonksiyonelleme işlemi ile istenilen özellikler kazandırılabilen ve böylelikle araştırmacılara esnek bir çalışma alanı kazandırılabilir. Fonksiyonelleme işlemi için önerilen ilk çalışmalardan birisinde, Mattson vd. (2000) embriyonik sıçan nöronlarının gelişimi, çok duvarlı karbon nanotüplerin fonksiyonellemesi ile gözlenmiştir. 4-hidroksinoneral kaplanmış çok duvarlı karbon nanotüplerin hücre gelişiminde oldukça yararlı olduğu gözlenmiştir. Bahr vd. 2001 yılında kısa tek duvarlı karbon nanotüpleri aril diazonyum tuzları ile türevlendirmişler ve bunun sonucunda, elektronik sistemlerde kullanılabilir özellikte elektrotlar elde etmişlerdir. Pastorin vd. (2006) çok duvarlı karbon nanotüplerin farklı organik taşıyıcı gruplar ile kovalent fonksiyonellemesi ve bu sistemin ilaç taşınmasında kullanım potansiyelini bildirmişlerdir. Sentezledikleri organik taşıyıcı sistemleri karbonil uçlarından karbon nanotüpün yan duvarına kovalent olarak bağlayan araştırmacılar, bu sistemi hem ilaç hem de floresans problemleri ile etiketleyerek davranışını incelemişlerdir. Byrne vd. (2008) polistiren kompozitlerinin mekanik kararlılıklarını arttırmak amacıyla organometalik bir karbon nanotüp fonksiyonelleme metodu önermişlerdir. Çok duvarlı karbon nanotüpler n-BuLi ile iki kez fonksiyonellenerek kompozit oluşumuna hazırlanmıştır. Fonksiyonellenmiş karbon nanotüplerle hazırlanan polistiren kompozitlerin gerilmelere karşı %50 daha dayanıklı olduğu ortaya konmuştur. Paiva vd. 2010 yılında çözücüsüz ve tek basamakta gerçekleşen bir karbon nanotüp fonksiyonelleme metodu önermişlerdir. 1,3-dipolar siklo katılma temeline dayanan yöntemde N-benziloksikarbonil glisin ve formaldehit

yardımı ile azomethin ilürilerinin karbon nanotüp yüzeyine kovalent bağlanması sağlanmıştır. 180°C’de siklik benzil karbamin, 250°C’de ise pirrolidin ana ürün olduğu ortaya koyulan çalışma çözücüsüz fonksiyonellenmenin bir örneğidir. Swierczewska vd. 2012’de biyomedikal uygulamalar için karbon nanotüp fonksiyonellenmesi önermişlerdir. Karbon nanotüplerin biyolojik sıvılarda dispersiyonunun düşük olması ve bu sebepten biyolojik aktivite kaybı yaşanmasından yola çıkan ekip tek duvarlı karbon nanotüpleri hyalüronik asit-5β-kolanik asit (HAC) konjugatı ile sonike ederek yüzeye tutunmalarını sağlamıştır. HAC karbon nanotüp yüzeyinde bir sürfaktan olarak görev alıp distile su içerisindeki çözünürlüğünü 5 mg/mL gibi pek alışık olunmadık ölçüde yüksek bir değere taşımıştır. Bu çalışmada ayrıca fonksiyonellenmiş karbon nanotüplerin CD44 ile hücre içine alımı da gösterilmiştir. Li vd. (2014) karbon nanotüp fonksiyonellenmesi ile enzim gerektirmeyen bir hidrojen peroksit sensörü geliştirmişlerdir. Bu amaç için öncelikle çok duvarlı karbon nanotüpler anyonik bir sürfaktan olan sodyum dodezil sülfat ile fonksiyonellenmiştir. Bunun ardından yüzeye elektrobiriktirme yardımı ile yüksek oranda platin biriktirilmiştir. Bu sistem ile geniş bir lineer aralıkta ve $1,9 \times 10^{-9}$ M mertebesinde tayin limiti ile hazırlanan sensörün gerçek örneklere uyarlabilirliği de araştırılmıştır.

Karbon nanotüpler, mekanik ve elektronik özellikleri ile beraber fonksiyonellenebilme avantajı sayesinde biyosensör çalışmalarında oldukça sık kullanılan bir nanoparçacık haline gelmiştir. Bu alanda gerçekleştirilen ilk çalışmalardan birinde, Cai vd. (2003) DNA hibritleşmesinin dedeksiyonunda fonksiyonellenmiş karbon nanotüplerden yararlanmışlardır. Karbon nanotüpler karboksil fonksiyonel grupları kazandırılarak, oligonükleotitlerin 5’ ucundaki amino grupları ile kovalent bağlanmış ve bu konjugatla hazırlanan camsı karbon elektrotlar ile diferansiyel puls voltametri (DPV) ölçümleri alınmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada karbon nanotüplerin yüksek yüzey alanı ve yük transfer karakteristiklerini gözlemleyerek DNA bağlanma kalitesinin ve dedeksiyon hassasiyetinin önemli ölçüde arttırıldığını rapor etmişlerdir. Chen vd. 2009 yılında dopamin tayinine yönelik karbon nanotüp, kuersetin ve nafyon temelli bir sensör önermişlerdir. Camsı karbon elektrot yüzeyine kompozit halinde immobilize ettikleri çok duvarlı karbon nanotüp, kuersetin ve nafyon ile $900 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ’lik bir akım yoğunluğu elde eden araştırmacılar karakterizasyon için dönüşümlü voltametri ve kare dalga

voltametrisi kullanmışlar ve dopamin tayinini amperometrik gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemle duyarlılıkta 11 kata varan bir gelişme sağlamışlardır. Leng vd (2011) karbon nanotüp temelli bir immünosensör geliştirmişlerdir. Bu sistemde altın nanopartiküllerle donatılmış grafen nanokatmanları ile kaplı karbon baskı devre elektrotlar üzerine immobilize edilmiş yakalama antikorunun antijen ile etkileşmesi sağlanmış, bu yapı üzerine sandviç modeli oluşturacak şekilde paladyum nanoparçacıklarla dekore edilmiş karbon nanotüp gönderilmiştir. Oluşan bu yapı ile oksijen indirgenmesi sağlanarak tayinler gerçekleştirilmiştir. Geliştirdikleri bu sistem ile araştırmacılar 0,3 pM mertebesinde insan IgG tayini gerçekleştirmişlerdir. Palanisamy vd. 2012'de karbon nanotüp ve çinko oksit nanopartiküllerinin hemoglobin ile birlikte kullanılması ile yüksek duyarlıklı bir hidroje peroksit sensörü üretmişlerdir. Camsı karbon elektrot üzerine gönderdikleri karbon nanotüplerin üzerinde elektrokimyasal olarak çinko oksit süngerleri oluşturan grup bu materyalin üzerine hemoglobin immobilize etmiştir. Üretilen biyosensör yüksek seçicilik, kabul edilebilir düzeyde kararlılık, iyi tekrar üretilebilirlik ile beraber mükemmel bir iletkenlik göstermiştir. Bu sistemle hidrojen peroksitin yüksek seçicilikte tayinini gerçekleştiren grup 0,02 μ M mertebesinde bir tayin limiti elde etmiştir.

3. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu tez çalışmasının amacı, MS'e neden olan oto-antikorlardan Anti-Miyelin Temel Proteini'nin hızlı, ekonomik ve güvenilir olarak tayin edecek ve MS teşhisinde manyetik rezonans görüntülerine destek olacak klinik veriler sunabilecek karbon nanotüp temelli MBP immünosensörünün geliştirilmesidir. Pek çok hastalıkta olduğu gibi MS'de de erken teşhis, hastanın yaşam kalitesini arttıracak önlemlerin doğru zamanda alınabilmesi için önemlidir. Bu amaçla tez kapsamında karbon nanotüpler polietilen glikol ile fonksiyonellenip, taşıyıcı materyal olarak jelatin ile kaplanmış karbon baskı devre elektrotlara immobilize edilmiş, bu platform üzerine MBP immobilizasyonu gerçekleştirilerek immünosensör sistemi tamamlanmıştır. Immünosensörün optimizasyon ve karakterizasyonu elektrokimyasal impedans spektroskopisi, dönüşümlü voltametri ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile denetlenmiştir. Karbon nanotüp fonksiyonelleme işlemi Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. Geliştirilen immünosensöre ait kalibrasyon grafiklerinin çizilmesinden sonra gerçek örneklerle uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmanın bir diğer amacı ise beyin-omurilik sıvısı analizi gibi riskli bir yöntemle başvurulmadan, serumda Anti-MBP düzeyinin in vivo şartlarda doğrudan belirlenebilmesidir. MS hastası olduğu bilinen kişilerden alınan örneklerle ölçümler alınıp literatür ile kıyaslanarak geliştirilen immünosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliği denetlenmiştir. Çalışma tamamlandığında insan kanından bir MS biyobelirteci olan Anti-MBP'nin doğru ve hızlı tayini için bir immünosensör önerilmiştir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan Myelin Basic Protein, Monoclonal Anti-Myelin Basic Protein, insan immünoglobulin G (hIgG), Anti-myelin associated glycoprotein (Anti-MAG), Anti-tumor necrosis factor α (Anti-TNF α), Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (Anti-MOG), bovine serum albumin (BSA), jelatin, N-hidroksisüksinimit (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC), epiklorohidrin (ECH), potasyum ferrosiyaniit ve potasyum ferrisiyaniit ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$) ve tiyonil klorür (SOCl_2) Sigma Aldrich'den; potasyum klorür (KCl), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) Merck'den; PEG₂₀₀₀ Fluka'dan; N,N-dimetilformamit Carlo Erba Reagents'tan ve etanol Riedel De Haen'den temin edilmiştir.

Stok çözelti hazırlama ve deneysel ekipmanların hazırlanması ile yıkanmasında kullanılan saf su MilliPore kullanılarak $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ direncinde olacak şekilde elde edilmiştir.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler “Gamry Instrument Impendace Analyzer- Framework Version 6.20 software” programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SEM görüntüleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'da bulunan NanoSEM cihazı ile, TEM görüntüleri yine aynı kurumda bulunan TEM cihazı ile elde edilmiştir. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi grafikleri Shimadzu model cihaz ile elde edilmiş ve Shimadzu IRRsolution 1.5 programı ile denetlenmiştir.

4.1.3 Kullanılan elektrotlar

Çalışma kapsamında Pine Research Instruments (ABD) tarafından üretilen Karbon Baskı Devre Elektrotlar (Screen Printed Carbon Electrode, SCPE) kullanılmıştır. Söz konusu elektrotlar, $0,02 \text{ cm}^2$ yüzey alanına sahip karbon çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve bu sistem etrafında konuşlanmış bir karşıt elektrodu içermekte ve yalnızca elektrot alanlarını açık bırakan yalıtkan bir malzeme ile kaplanmış haldedir.



Şekil 4.1 Karbon baskı devre elektrot, bağlantılar ve elektrokimyasal hücre

Üretici tarafından paketlenmiş elektrotlar, kullanım öncesinde herhangi bir işleme tabi tutulmamış ve doğrudan immobilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

4.1.4 Kullanılan çözeltiler

0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı hazırlanmıştır. Fosfat tamponu ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4) bu çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan diğer çözeltiler fosfat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır.

PEG fonksiyonel karbon nanotüp stok çözeltileri 5 ve 10 mg/mL olacak şekilde, fosfat tamponu yardımıyla hazırlanmıştır.

Epiklorohidrin çözeltisi, bazik koşulları sağlamak amacıyla 0,8 M NaOH içerisinde istenen miktarda ECH ilave edilerek hazırlanmıştır.

Çapraz bağlayıcılar NHS ve EDC, fosfat tamponu kullanılarak 14 mM'lık stok çözeltiler halinde hazırlanmış ve immobilizasyon işlemlerinde istenen miktarlarda kullanılmıştır.

Biyoreseptör olarak kullanılan MBP optimizasyon işlemleri esnasında karbonat tamponu ile 125 µg/mL'lik stok çözelti olarak hazırlanmış ve bu çözeltiden gereken miktarda alınarak kullanılmıştır.

MBP'nin otoantikoru olan Anti-MBP fosfat tamponu ile 1000 ng/mL'lik stok çözelti halinde hazırlanmış ve seri seyreltme işlemine tabi tutularak kullanılmıştır.

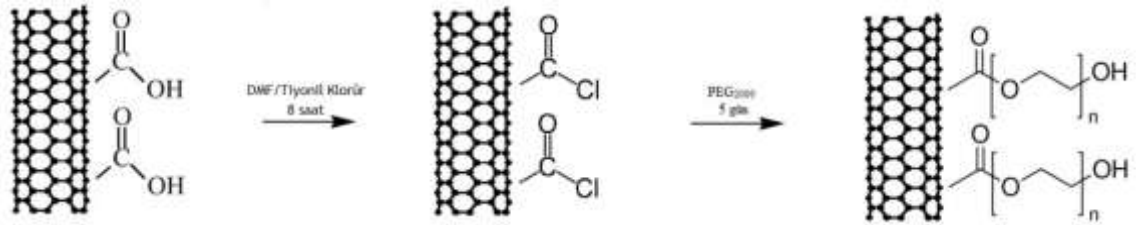
Elektrokimyasal ölçümlerde, üretici tarafından tasarlanmış elektrokimyasal hücre içerisinde, 1 mL'lik hacim içerisinde 5 mM olacak şekilde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ çifti ve 0.1 M KCl kullanılmıştır. Gerekli hacim fosfat tamponu ile tamamlanmıştır.

İmmünoensörler hazırlandıktan sonra MBP immobilize olmamış matriksin fonksiyonel gruplarına Anti-MBP'nin non-spesifik bağlanmasını önlemek amacıyla %0.1'lik BSA kullanılmıştır. Ayrıca optimize immünoensörlere non-spesifik bağlanmaları tespit etmek amacıyla hIgG, Anti-MAG, Anti-MOG ve Anti-TNF α kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 Karbon nanotüp fonksiyonellendirilmesi

Fonksiyonelleme işlemi literatürde (Andersen vd. 2013) açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Kısaca, karboksil fonksiyonel halde elde edilen karbon nanotüp yan duvar yüzeyinde açıl klorür gruplarının elde edilmesi amacıyla DMF içerisinde tiyonil klorür ile 8 saat muamele edilmiştir. Ortamdaki fazla tiyonil klorürün uzaklaştırılmasından sonra aynı çözelti içerisinde, PEG₂₀₀₀ fazla miktarda ilave edilmiş ve karışım 100°C'de 5 gün boyunca karıştırılmıştır. 5 günün sonunda karışım soğutulmuş, filtre edilmiş ve etanol-saf su karışımı ile yıkanarak vakum altında kurutulmuştur. İmmobilizasyon basamaklarına geçilmeden önce karbon nanotüpün FTIR grafikleri ve SEM görüntüleri elde edilmiş ve fonksiyonelleme işleminin başarısı denetlenmiştir.



Şekil 4.2 Karbon nanotüp fonksiyonelleme basamakları şeması

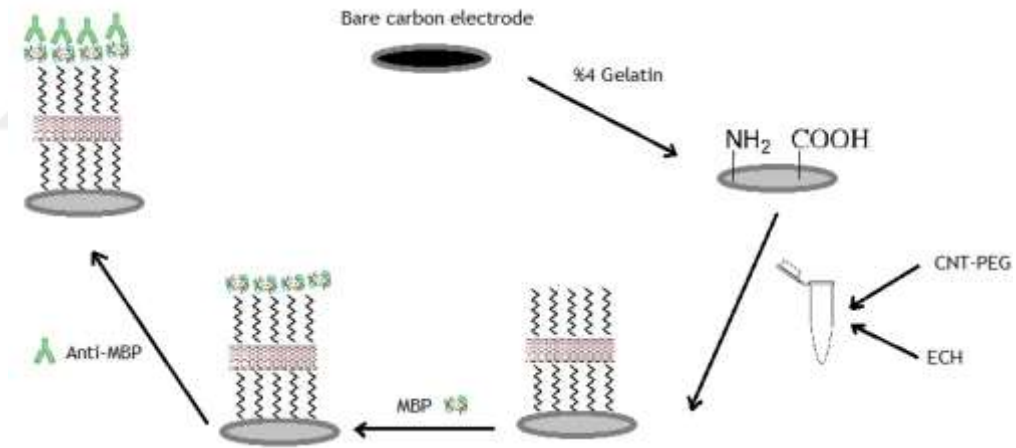
4.2.2 İmmünoşansörün hazırlanması

Jelatin fosfat tamponu içerisinde yarım saat bekletilerek şişirilmiş, bunun ardından çözünmesi için 60°C'lik sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Jelatin çözüldükten sonra NHS/EDC çapraz bağlayıcıları eklenmiş ve homojenizasyonun sağlanması için vortekslenmiştir. 0,02 cm² yüzey alanına sahip karbon elektrotlat üzerine, 10 µL jelatin çözeltisi damlatılmış ve yüzeyi kaplayacak şekilde dağılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından elektrotlar 2 saat kurumaya bırakılmıştır.

Karbon nanotüp aktivasyonu ve immobilizasyonu, eppendorf tüpü içerisine istenen miktarlarda karbon nanotüp ve ECH ilave edilip homojenizasyonu sağlamak için karışımın vortekslenmesi suretiyle hazırlanmıştır. Elde edilen homojen aktive edilmiş karbon nanotüp çözeltisinden gerekli miktarlarda alınıp jelatin kaplı karbon elektrotlar üzerine damlatılmış ve yüzeyi tamamen kaplaması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından elektrotlar 1 saat kurumaya bırakılmıştır.

MBP immobilizasyonu, istenen miktarda MBP'nin aktive edilmiş karbon nanotüp barındıran elektrot yüzeyine damlatılmasıyla elde edilmiştir.

Bu işlemlerin ardından elektrotlar ölçüme hazır hale gelmeleri için bir gece bekletilmiştir. İmmünosensörün üretim basamakları şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Elektrot fabrikasyon basamakları şeması

4.2.3 SEM ve TEM mikrograflarının alınması

Karbon nanotüp fonksiyonelleme başarısı TEM mikrografları ile denetlenmiştir. Jelatin, jelatin-PEG-CNT ve jelatin-PEG-CNT-MBP filmlerin morfolojileri SEM ile

görüntülenmiş, MBP ve CNT immobilizasyonunun başarısı incelenmiştir. SEM ve TEM görüntüleri Bilkent Üniversitesi UNAM’da alınmıştır.

4.2.4 Optimizasyon çalışmaları

4.2.4.1 Karbon nanotüp optimizasyonu

İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu için ilk aşamada CNT-PEG optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Karbon nanotüp optimizasyonu amacıyla iki farklı konsantrasyonda (5 ve 10 mg/mL) PEG fonksiyonel karbon nanotüp stok çözeltisi hazırlanmıştır. Jelatin, ECH ve MBP konsantrasyonları sırasıyla %4, %5 ve 125 µg/mL değerlerinde sabit tutularak 0,001, 0,002, 0,005, 0,008 ve 0,0010 mg CNT-PEG değerleri denenmiştir.

4.2.4.2 Epiklorohidrin optimizasyonu

ECH optimizasyonlarında optimum karbon nanotüp konsantrasyonu 0,005 mg alınarak ve jelatin ile MBP konsantrasyonları %4 ile 125 µg/mL değerlerinde sabit tutularak, bazik koşulların sağlanması amacıyla 0,8 M NaOH çözeltisi içerisinde %4, %5, %6, %7 ve %8’lik ECH çözeltileri hazırlanmış ve denemeler gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.3 Miyelin temel proteini optimizasyonu

MBP optimizasyonları için 0,005 mg PEG-CNT ve %5’lik ECH konsantrasyonları optimum kabul edilmiş, sabit %4’lük jelatin konsantrasyonu alınmıştır. MBP optimizasyonu için geniş bir aralıkta deneyler gerçekleştirilmiştir. 5, 10, 15, 25, 50 ve

75 µg/mL'lik MBP konsantrasyonları denenerek optimum MBP konsantrasyonu araştırılmıştır.

4.2.4.4 İmmünosensör cevabına Anti-MBP inkübasyon süresinin etkisi

Geliştirilen Jelatin-PEG-CNT-MBP immünosensörü Anti-MBP ile inkübe edilmiştir. İmmünosensörün en iyi cevabının tespiti için Anti-MBP'nin immünosensöre inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Bu amaçla geliştirilen immünosensör Anti-MBP ile 5, 15, 30, 60 ve 120 dakika inkübe edilerek impedimetrik cevaplar ölçülmüş ve optimum inkübasyon süresi bulunmuştur.

4.2.5 Spesifiklik

Geliştirilen immünosensör sisteminin pratikte kullanımı için büyük önem arz eden spesifikliğinin araştırılması amacı ile Anti-Miyelin Temel Proteini ile ilişkili proteinler Anti-Miyelin İlişkili Glikoprotein (Anti-MAG), Anti-Tümör Nekroz Faktörü α (Anti-TNF α) ve insan Immüoglobülin G (hIgG) ile ölçümler alınarak Anti-Myelin Temel Protein'den alınan cevap ile kıyaslanmıştır.

4.2.6 İmmünosensörün elektrokimyasal davranışı

Geliştirilen immünosensörün impedans grafikleri ve dönüşümlü voltamogramları karşılaştırılmış, böylelikle modifikasyon ve immobilizasyon başarısı incelenmiştir. Elde edilen Nyquist grafikleri incelenerek immünosensörün elektrokimyasal devre modeli çizilmiştir.

4.2.7 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

Hazırlanan immünosensör sistemi için 1000 ng/mL üst limiti belirlenmiş ve sinyal alınabilen son değere kadar seri seyreltmeler vasıtasıyla ölçümler alınarak Anti-MBP kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafiklerin denklemleri elde edilmiştir.

4.2.8 Geliştirilen immünosensörün BOS'tan geri kazanım denemeleri

Geliştirilen immünosensörün yapay beyin-omurilik sıvısına (BOS'a) eklenmiş, miktarları bilinen Anti-MBP'yi geri kazanımı çalışmaları için, daha önceden hazırlanmış yapay BOS içerisine, immünosensörün lineer aralığı içerisinde kalan 50 ile 25 ve 6 ile 3 ng/mL değerlerinde Anti-MBP eklenmiş ve elektrokimyasal ölçümler alınmıştır.

4.2.9 Tekrar üretilebilirlik

Geliştirilen immünosensörün ticari üretimi için önemli bir faktör olan tekrar üretilebilirliği denetlenmiştir. Bu amaç için optimize değerlerle, aynı anda ve seri bir şekilde 5 adet elektrot üretilmiştir. Bu elektrotlar üzerine 20 ng/mL Anti-MBP gönderilerek seri ölçümler alınmış ve elde edilen değerler grafiğe geçirilerek elektrodun tekrar üretilebilirliği incelenmiştir.

4.2.10 İmmünosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliği

Geliştirilen immünosensörün klinik kullanımı için önem arz eden gerçek örneklerle uygulanabilirliği incelenmiştir. Bu amaç için MS hastası olduğu bilinen kişiden alınan kan örneği santrifüjlenerek hücrelerinden arındırılmış ve elde edilen serum -20° C'de

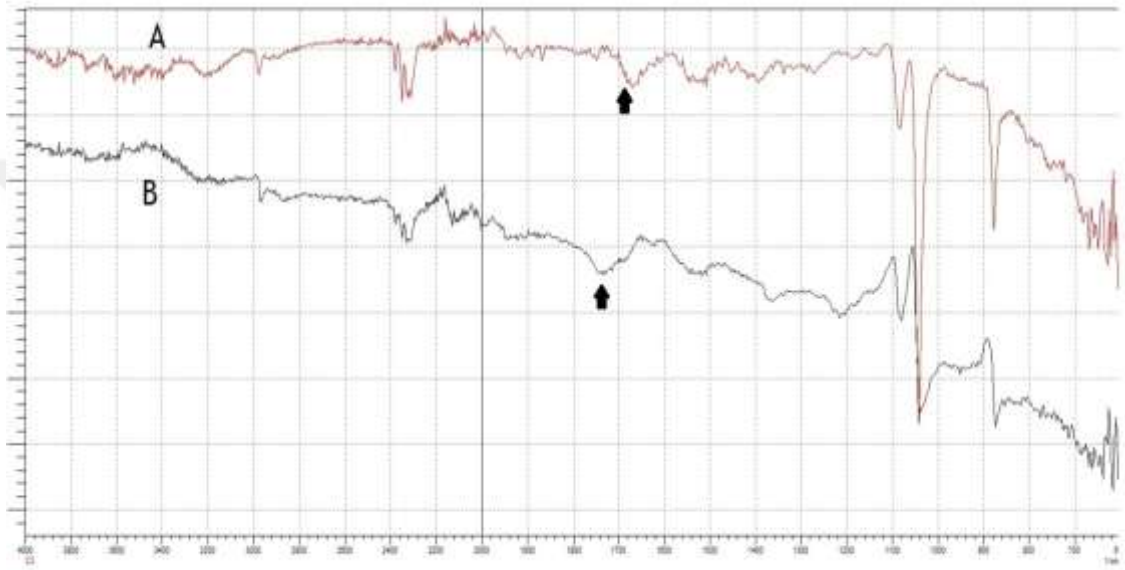
saklanmıştır. İmmünosensörler hazırlanmış ve serum örneğinden 5'er µL her bir elektroda damlatılarak ölçüm alınması için birer saat inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir elektrodun ölçümü alınarak elde edilen değerklerin ortalaması ve standart sapmaları hesaplanarak literatür karşılaştırması yapılmıştır.



5. BULGULAR

5.1 FTIR Grafiklerinin Değerlendirilmesi

Karbon nanotüp fonksiyonelleme işlemleri esnasında, fonksiyonelleme başarısının incelenmesi amacıyla FTIR spektrumları elde edilmiştir.



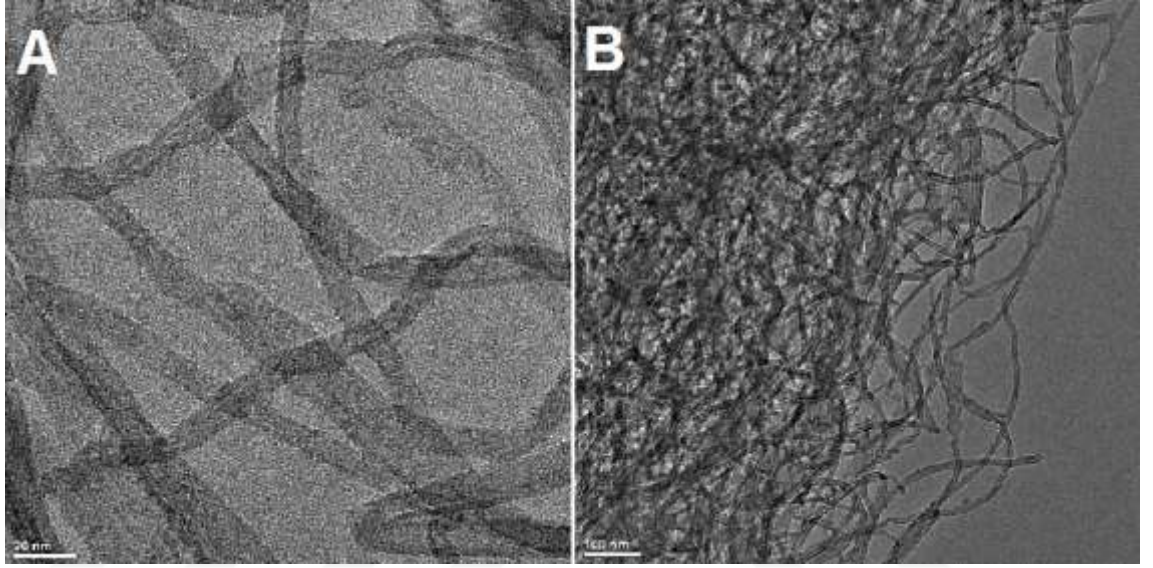
Şekil 5.1 Karbon nanotüp fonksiyonelleme basamaklarının FTIR spektrumları

a. CNT-COOH b. CNT-PEG

FTIR spektrumları incelendiğinde, karboksil fonksiyonel karbon nanotüpün (CNT-COOH) 1675 cm^{-1} 'de gözlenen karbonil gerilmesi, PEG₂₀₀₀ konjugasyonunun akabinde 1740 cm^{-1} 'de gözlenen ester grubunun karbonil titreşim pikine kaymıştır. Bu durum, CNT-COOH'ün başarılı bir şekilde PEG fonksiyonellendiğinin (CNT-PEG), fonksiyonelleme sonucunda açıl klorürleşmiş nanotüpün karbonil grubu ile polietilen glikolün hidroksil grupları arasında ester bağının oluştuğunu açıkça ortaya koymaktadır.

5.2 TEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi

Karbon nanotüp fonksiyonelleme başarıları Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ile de denetlenmiştir. Bu işlem için polietilen glikol ile fonksiyonellenmiş karbon nanotüplerin TEM görüntüleri elde edilmiş ve incelenmiştir.



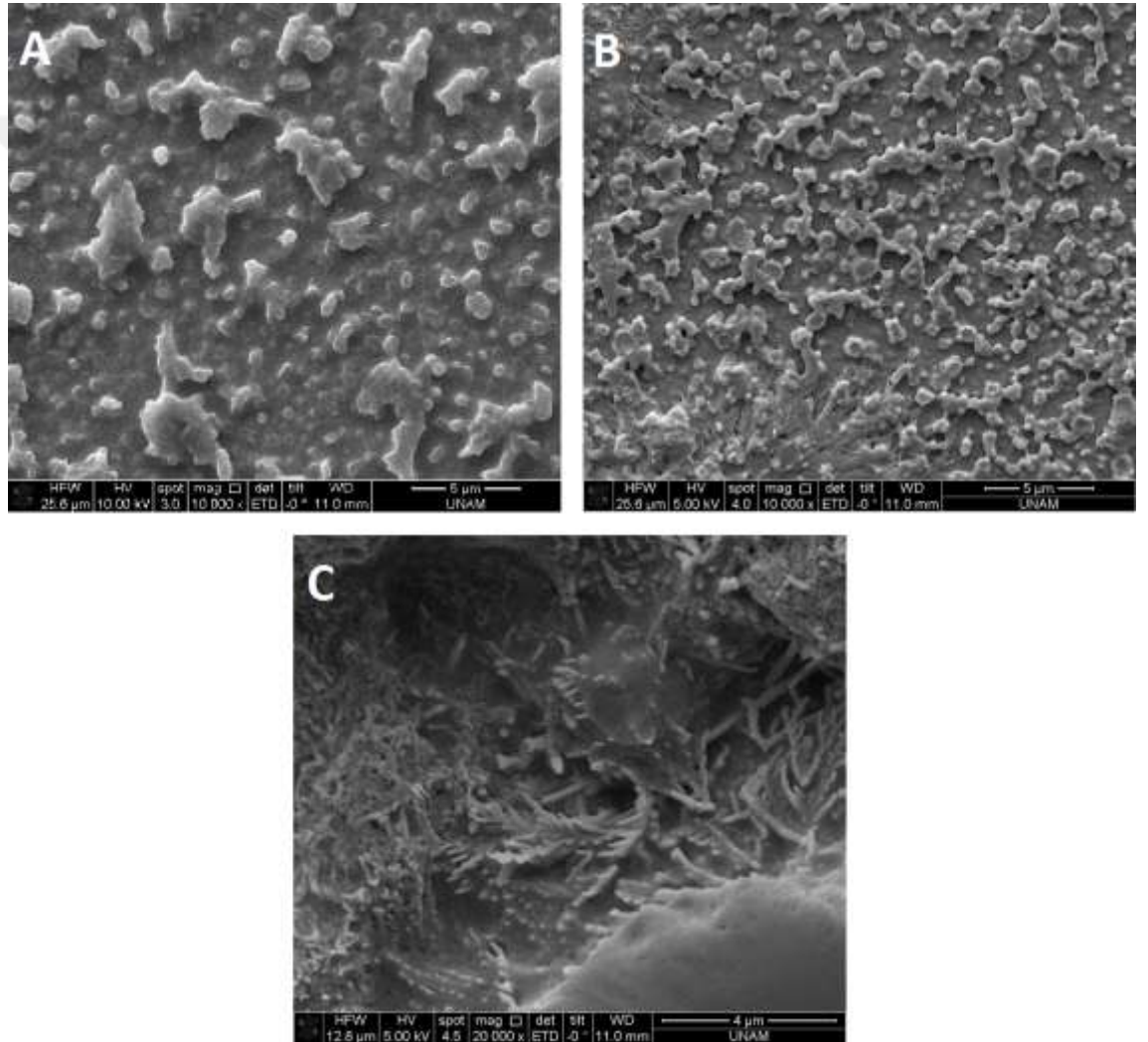
Şekil 5.2 Polietilen glikol ile fonksiyonellenen karbon nanotüplerin TEM görüntüleri

a. 20 nm ölçek b. 100 nm ölçek

Elde edilen TEM mikrograflarından herhangi bir fonksiyonelleme işlemine tabi tutulmayan karbon nanotüplerin yan duvarlarında gözlemlenen finger-print tipi izlerin kaybolduğu gözlemlenmiş, bu durumun yan duvarlara kovalent bağlanan polietilen glikol moleküllerinden ileri geldiği düşünülmüş ve fonksiyonelleme başarıları bu şekilde ortaya koyulmuştur.

5.3 SEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi

İmmünoşensörün tasarım aşamasında, Jelatin-CNT-PEG-MBP immünoşensörünün SEM görüntüleri elde edilerek söz konusu sistemin MBP bağlama kapasitesi ve CNT'nin jelatin film yüzey alanına etkisi incelenmiştir. Filmlerin morfolojileri hakkında bilgi edinmek amacıyla alınan SEM görüntülerinin çalışma potansiyeli 10 ve 5 kV'tır.



Şekil 5.3 İmmünoşensör yüzeyinin SEM mikrografları

a. Jelatin b. Jelatin-CNT-PEG c. Jelatin-CNT-PEG-MBP

SEM grafikleri incelendiğinde, jelatin kaplanmış elektrot yüzeyinde, jelatinin doğası sonucu oluşan mikroadacık yapıları göze çarpmaktadır. Mikroskopik adacık görüntüsüne makroskopik film görüntüsü eşlik etmektedir. Jelatin film üzerine gerçekleştirilen CNT ilavesi, mikroadacıkların aralarında oluşan köprü benzeri yapıların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu basamakta ayrıca yüzey alanındaki artış da dikkat çeken bir başka unsur olmuştur. MBP immobilizasyonu sonucu elektrot yüzeyinde proteinin karakteristik yapısı görülebilmektedir. Bu görüntü MBP immobilizasyonunun başarı ile gerçekleştirildiğini gözler önüne sermektedir.

5.4 Optimizasyon Çalışmaları

Yapılan bütün optimizasyon ve kalibrasyon deneylerinde sinyal olarak relatif impedans kullanılmıştır.

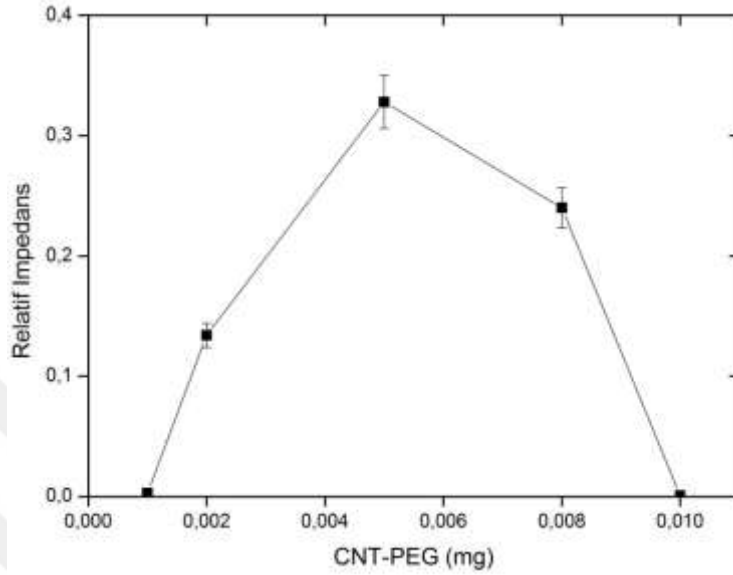
$$\text{Relatif İmpedans} = \frac{Rct(i) - Rct(0)}{Rct(0)}$$

$Rct(0)$, daha önce anlatılmış immobilizasyon basamakları uygulanmış elektrotun yük transfer direnci, $Rct(i)$ Anti-MBP inkübe edilmiş elektrotun yük transfer direncidir. İmpedans ölçümleri referans elektrota göre, sisteme akım verilmeden elde edilmiştir.

5.4.1 Karbon nanotüp miktarının immünosensör cevabına etkisi

MBP immobilizasyon verimini ve elektron transfer hızını arttırarak daha duyarlı bir immünosensör geliştirmek için polietilen glikol fonksiyonel karbon nanotüp (CNT-PEG) nanopartiküller kullanılmıştır. Anti-MBP'nin MBP'ye bağlanması için en uygun CNT-PEG miktarının tespiti amacıyla CNT-PEG optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla %5 epiklorohidrin ve 125 µg/mL MBP miktarları sabit tutularak 0,001, 0,002,

0,005, 0,008 ve 0,010 mg CNT-PEG miktarları denenmiştir. CNT-PEG optimizasyonu çalışmaları 20 ng/mL Anti-MBP kullanılmıştır.



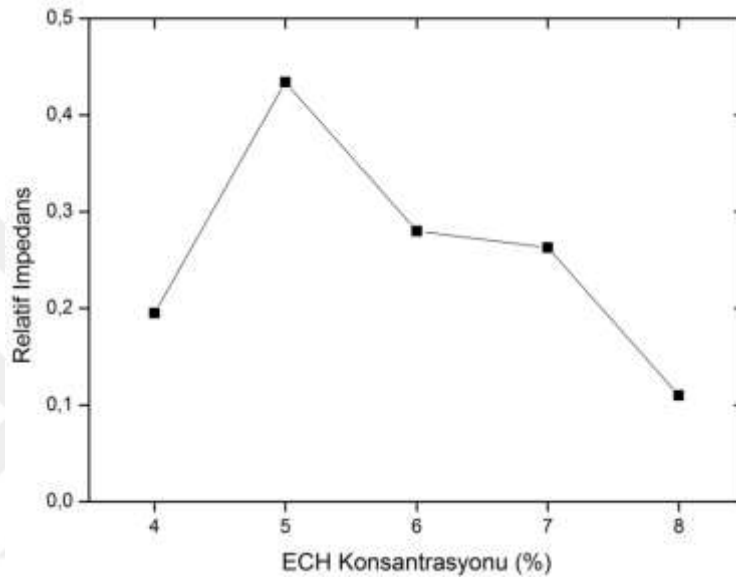
Şekil 5.4 İmmünosensör cevabına CNT miktarının etkisi

Düşük miktarda CNT-PEG, duyarlı bir immünosensör geliştirmeye müsaade etmeyecek kadar düşük verimde MBP immobilizasyonu sağlayabilmiştir. CNT-PEG miktarındaki artış, MBP immobilizasyonu verimini, dolayısıyla MBP – Anti-MBP etkileşimini arttırmış, böylelikle immünosensör sinyalinin artmasına sebep olmuştur. Yüksek miktarda CNT-PEG ise, nanopartiküllerin üst üste binerek MBP bağlama verimini azaltmasına, bu doğrultuda impedans sinyalinde düşüşe sebep olmuştur. Optimizasyon deneyleri sonucu en uygun CNT-PEG miktarı 0,005 mg olarak tespit edilmiştir.

5.4.2 Epiklorohidrin miktarının immünosensör cevabına etkisi

Bir ucuyla karbon nanotüpe kovalent bağlanmış polietilen glikol moleküllerinin diğer uçlarını aktive etmek, böylelikle MBP'nin immobilizasyonunu sağlamak amacıyla çalışmada epiklorohidrin (ECH) reaktif kullanılmıştır. ECH, hidroksil gruplarıyla

oksiran yapısı oluşturarak, karşı molekülde bulunan azotun ortaklanmamış elektronları ile tepkime verir ve iki molekülün birbirine bağlanmasını sağlar. En uygun ECH konsantrasyonunun tespiti için, 0,005 mg CNT ve 125 µg/mL MBP değerleri sabit tutularak ECH'in 0,8 M NaOH içerisindeki %4, %5, %6, %7 ve %8'lik konsantrasyonları denenmiştir.

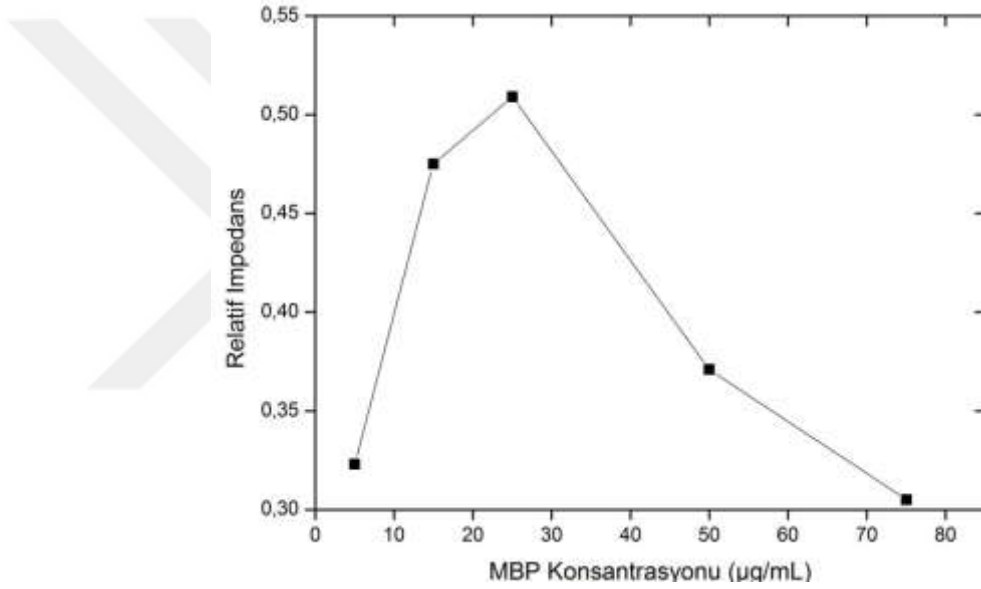


Şekil 5.5 İmmünoşansör cevabına epiklorohidrinin etkisi

Düşük ECH konsantrasyonu, yeterli düzeyde hidroksil fonksiyonel grubu aktivasyonu sağlayamadığından ve bu sebepten ötürü yeterli MBP immobilizasyonu gerçekleşmediğinden dolayı düşük sinyal alınmasına sebep olmuştur. ECH konsantrasyonundaki artış MBP immobilizasyonu verimini arttırmış, böylelikle yüksek sinyal alınmasını sağlamıştır. Artan ECH konsantrasyonu ile beraber hidroksil aktivasyonu oldukça artmış, fakat bununla birlikte aktive olan hidroksil gruplarının birbirleri ile reaksiyon verme oranı da artmış ve MBP immobilizasyonunun verimi azalmıştır. Bu sebepten yüksek ECH derişimlerinde MBP immobilizasyonunun azalması ve buna bağlı olarak elektrokimyasal sinyalde düşüş gözlenmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda en uygun ECH konsantrasyon değeri %5'lik çözelti olarak tespit edilmiştir.

5.4.3 Miyelin Temel Proteini miktarının immünosensör cevabına etkisi

Geliştirilen immünosensörün biyoduyarlı molekülü olan Miyelin Temel Proteini'nin (MBP) optimizasyonu amacıyla, daha önceki optimizasyon çalışmalarında elde edilen en uygun CNT-PEG ve ECH konsantrasyonları sabit tutularak farklı MBP konsantrasyonlarında denemeler yapılmış ve elektrokimyasal yanıtlar incelenerek en uygun MBP miktarı elde edilmiştir. Sabit tutulan CNT-PEG ve ECH konsantrasyonları sırasıyla 0,005 mg ve %5'tir.

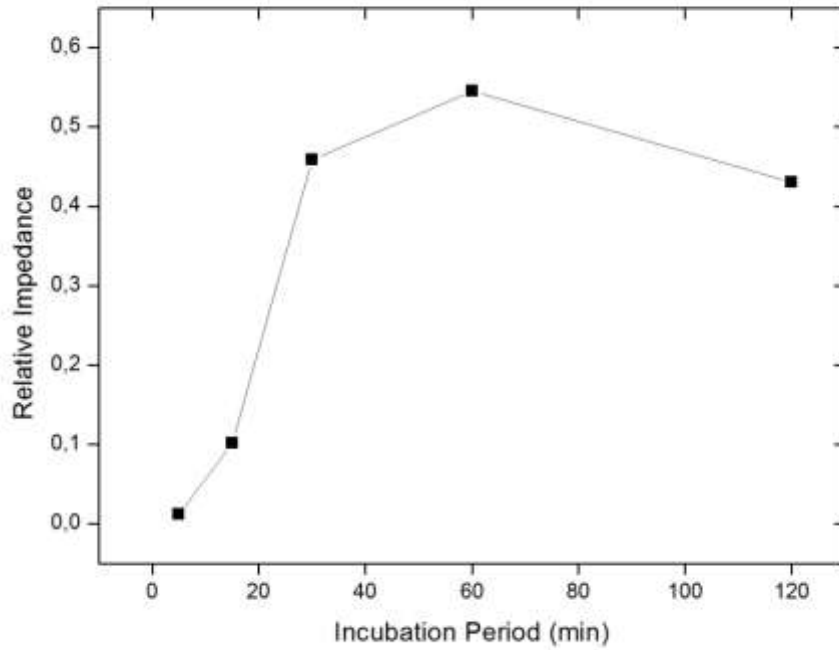


Şekil 5.6 İmmünosensör cevabına miyelin temel proteininin etkisi

En uygun MBP konsantrasyonunu saptamak ve böylelikle optimum immünosensör bileşimini elde etmek için 5-75 µg/mL'lik MBP konsantrasyon aralığında elektrotlar hazırlanmış ve elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.5). Taşıyıcı sisteme immobilize edilecek MBP için optimum değer 25 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Düşük MBP konsantrasyonlarında, sistem elde edilebilecek en iyi performansı göstermezken; artan MBP konsantrasyonlarında, taşıyıcı polimer jelatinin gözenekleri protein tarafından doygunlaştırılmış, böylelikle elektron difüzyonu engellenmiş ve elektron transfer hızı azalmasına bağlı olarak düşük sinyal elde edilmiştir.

5.4.4 Anti-MBP inkübasyon süresinin immünosensör cevabına etkisi

Tasarlanan immünosensör sisteminden en iyi cevabın tespiti için anti-MBP'nin immünosensöre inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Bu amaçla tasarlanan immünosensör sistemi anti-MBP ile 5, 15, 30, 60, 120 dakika inkübe edilmiş ve elde edilen relatif impedans değerleri grafiğe geçirilmiş ve optimum inkübasyon süresi tespit edilmiştir.

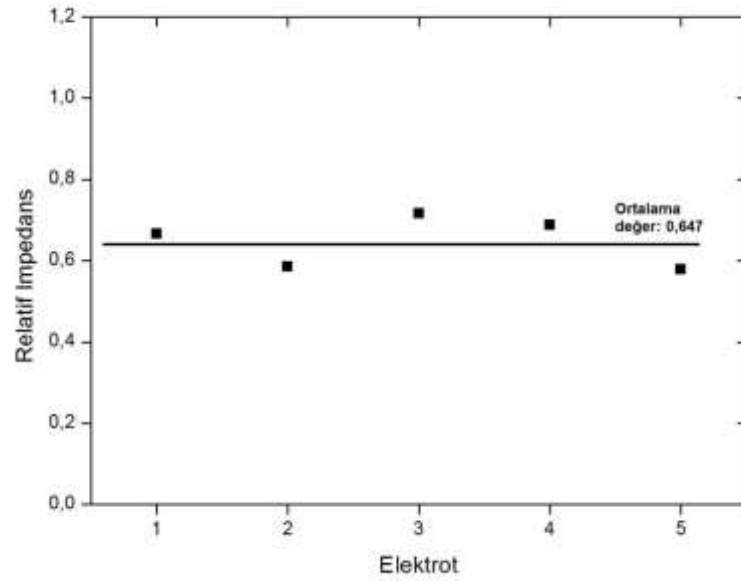


Şekil 5.7 İnkübasyon süresinin immünosensör cevabına etkisi

Elde edilen relatif impedans grafiğinden, tasarlanan immünosensör sisteminin en verimli çalıştığı anti-MBP inkübasyon süresinin 60 dakika olduğu anlaşılmış, böylelikle immünosensörün cevap süresinin 60 dakika olduğu belirlenmiştir.

5.5 İmmünoşensörün Tekrar Üretilabilirliği

Geliştirilen immünoşensör sisteminin, pratik kullanımı açısından büyük önem arzeden tekrar üretilebilirliği denetlenmiş, bu amaç için, daha önceki basamaklarda maksimum performans sağlanan immünoşensör bileşiminde 5 adet immünoşensör hazırlanmış ve 20 ng/mL’lik anti-MBP ilavesi ile impedimetrik cevaplar irdelenmiştir.

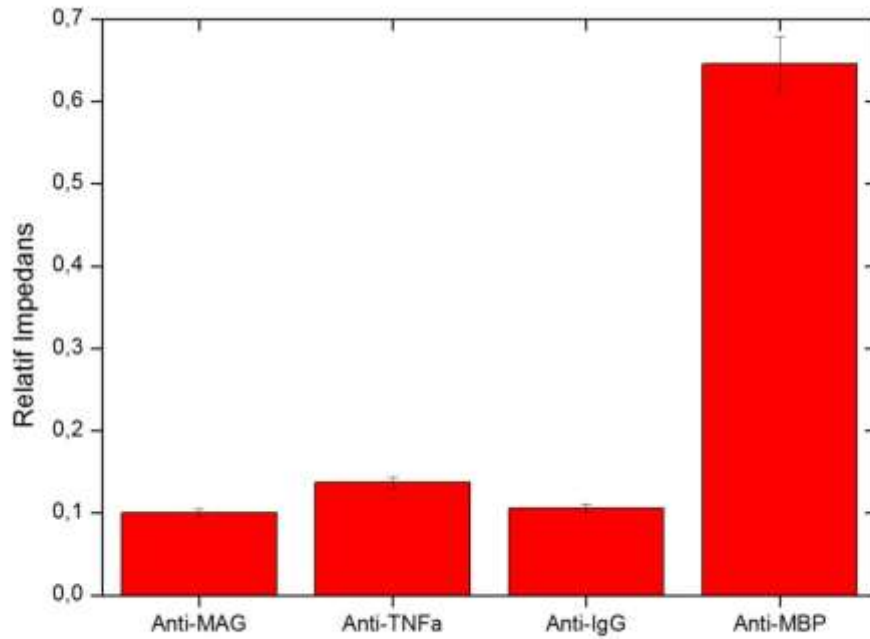


Şekil 5.8 İmmünoşensörün tekrar üretilebilirliği

Elde edilen veriler ışığında, hazırlanan immünoşensörün 0,647 ortalama değere sahip olduğu bulunmuş, standart sapmanın % 6,2 olduğu gözlenmiştir. Söz konusu standart sapmanın, elektrot fabrikasyon sürecinde PEG ile fonksiyonellenmiş karbon nanotüplerin elektrot yüzeyinde farklı homojenlikte dağılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.6 Spesifiklik

Geliştirilen immünosensörün yalnızca hedef anlite (Anti-MBP) özgü olduğunu, girişim etkisi yaratabilecek ve vücut sıvılarında bulunduğu bilinen diğer proteinlere minimum yanıtı verdiğini ortaya koyabilmek için spesifiklik çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaç için Anti-MBP yanı sıra Anti-Miyelin ilişkili glikoprotein (Anti-MAG), Anti-Tümör Nekroz Faktörü Alfa (Anti-TNF α) ve Anti-İnsan İmmüoglobülin G (Anti-hIgG) ile seri deneyler gerçekleştirilmiş ve alınan cevaplar incelenmiştir.



Şekil 5.9 İmmünosensörün spesifikliği

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen immünosensörün, tasarlandığı gibi Anti-MBP'ye spesifik olduğu ortaya koyulmuştur. Hedeflenen ölçüm örneklerinde ve hastalıklarda gözlemlenebilecek diğer proteinlere karşı cevabın oldukça az olduğu görülmüştür. Diğer proteinlere karşı verilen cevapların, söz konusu proteinlerin polietilen glikol zincirleri arasına kısmen hapsolmesinden kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir.

5.7 Geliştirilen İmmünosensörün BOS'tan Geri Kazanım Denemeleri

Optimize ve karakterize edilmiş, kalibrasyon grafikleri elde edilmiş immünosensörün daha önceden hazırlanmış yapay beyin-omurilik sıvısından (BOS'tan) geri kazanım denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapay BOS içerisine, immünosensörün lineer aralıkları arasında kalan 50 ve 25 ile 6 ve 3 ng/mL Anti-MBP ilave edilmiş ve ölçümler alınarak elde edilen relatif impedans değerleri kalibrasyon grafiklerinden elde edilen denklemlerde yerlerine yazılarak, eklenen Anti-MBP'nin geri kazanımı incelenmiştir.

Çizelge 5.1 Geliştirilen immünosensörün BOS'tan geri kazanımı

Eklenen Miktar (ng/mL)	Elde edilen miktar (ng/mL)	Geri Kazanım
50	50,21	% 100,42
25	25,06	% 100,24
6	6,18	% 103,00
3	2,86	% 95,34

Elde edilen sonuçlar üretilen immünosensörün BOS'tan geri kazanımının % 103,00 ile % 95,34 arasında olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar geliştirilen immünosensörün geri kazanımının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

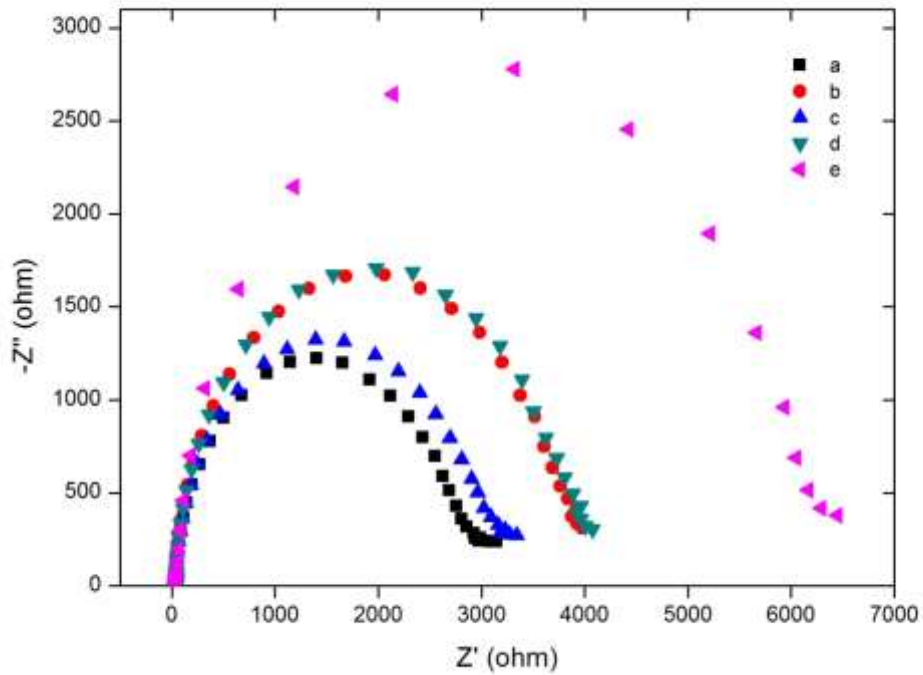
5.8 İmmünosensörün Elektrokimyasal Davranışı

Elektrokimyasal immünosensörün elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi amacıyla immobilizasyon basamaklarının her birinde dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi incelemeleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek incelenmiştir.

Elektrokimyasal immünosensörün elektrokimyasal impedans spektroskopisi incelemelerinde ilk olarak, karbon elektrodun modifiye edilmeden ölçümü alınmıştır.

Bunun akabinde yüzeye jelatin gönderilmiş ve kuruması beklenerek aynı şartlarda impedans spektrumu elde edilmiştir. Sonrasında aynı işlemler sırasıyla karbon nanotüp, miyelin temel proteini ve anti-miyelin temel proteini ile tekrarlanarak her basamağa dair impedans spektrumları elde edilmiş ve birbirleriyle kıyaslanmıştır.

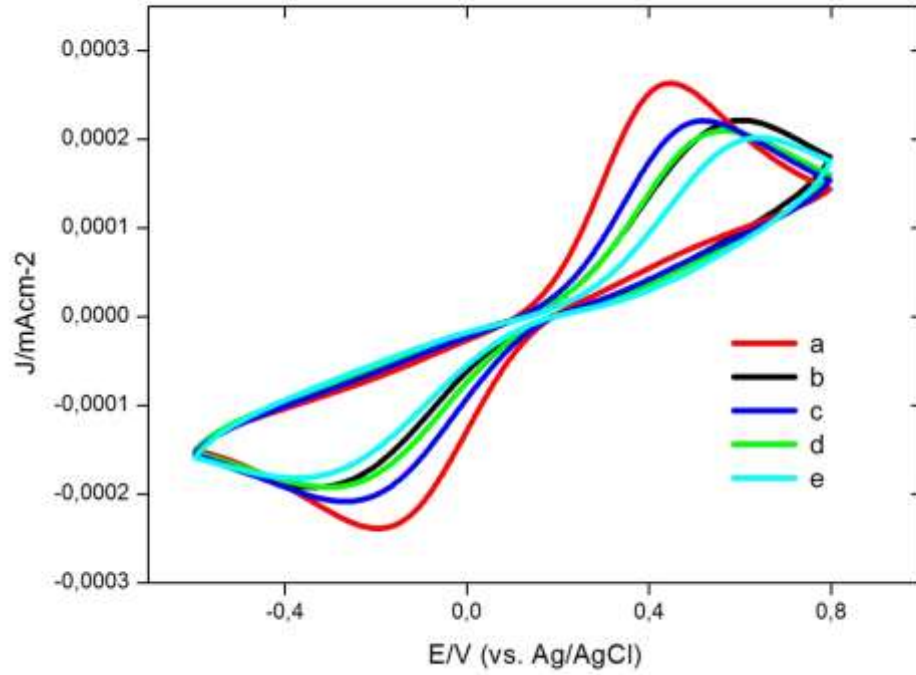
Elektrokimyasal impedans spektrumlarının kıyaslanmasında göze çarpan ilk unsur jelatin modifiye elektrodun çıplak elektroda oranla daha fazla direnç gösteriyor olmasıdır. Bu direnç artışı yüzeye karbon nanotüp ilavesi ile azalmaktadır. Bunun sebebi karbon nanotüpün yüzey alanını arttırması ve bilinen en iletken malzemelerden biri olmasından mütevellit elektron aktarım hızını arttırmasıdır. Karbon nanotüp üzerine immobilize edilen MBP ve bunu izleyen Anti-MBP ilaveleri yük transfer direncinin artmasına sebep olmuştur (Şekil 5.9).



Şekil 5.10 İmmobilizasyon basamaklarının elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile incelenmesi

a. Çıplak karbon elektrot b. Jelatin c. Jelatin-CNT-PEG d. Jelatin-CNT-PEG-MBP e. Jelatin-CNT-PEG-MBP-AntiMBP

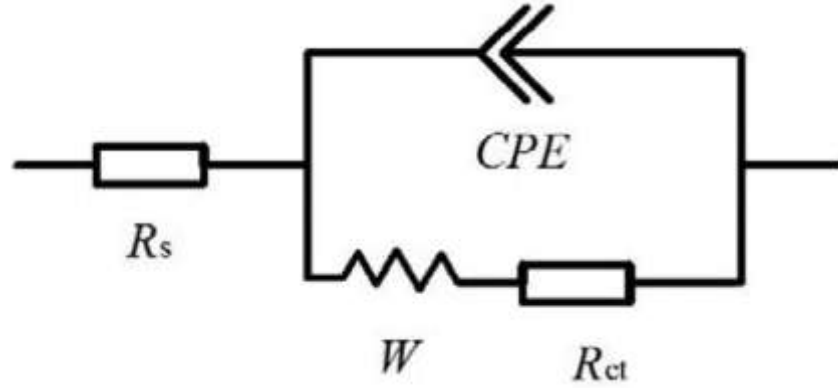
İmmobilizasyon basamakları dönüşümlü voltametri ile de incelenmiştir. Elde edilen veriler, elektrokimyasal impedans spektroskopisi verileri ile uyum içerisindedir. Dönüşümlü voltamogramlarda en yüksek akım değeri çıplak karbon elektrotta elde edilmiş ve $0,00026 \mu\text{Acm}^{-2}$ seviyesindedir. Bu değer elektrodun jelatin ile modifiye edilmesinden sonra $0,00021 \mu\text{Acm}^{-2}$ seviyesine düşmüştür. Akımda meydana gelen bu düşüş, jelatinin elektrot yüzeyini başarılı şekilde modifiye ettiğini göstermektedir. Jelatin üzerine gönderilen karbon nanotüp-polietilen glikol konjugatı akım değerini arttırmıştır. Bundan sonra eklenen sırası ile miyelin temel protein ve anti miyelin temel proteini tekrarlanan akım düşüşlerine sebep olmuştur ve bu durum elektrot yüzeyinde immobilizasyon ve immünolojik etkileşimin başarı ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 5.11 İmmobilizasyon basamaklarının dönüşümlü voltametri ile incelenmesi.

a. Çıplak karbon elektrot b. Jelatin c. Jelatin-CNT-PEG d. Jelatin-CNT-PEG-MBP e. Jelatin-CNT-PEG-MBP-AntiMBP

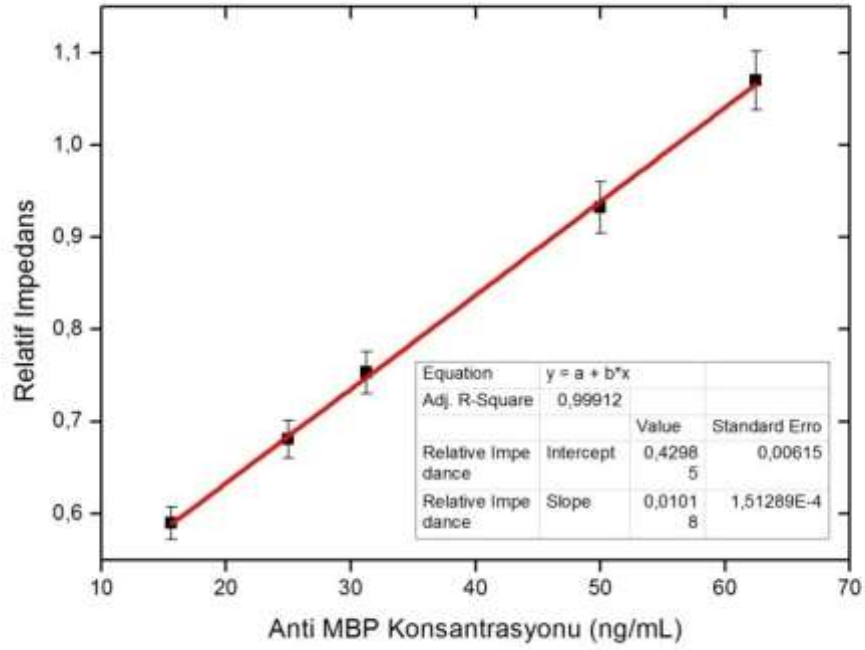
Elde edilen Nyquist grafiklerinin incelenmesi ile geliştirilen immünosensörün devre modeli “Constant Phase Element with Diffusion” (CPE with Diffusion, Difüzyonlu Sabit Faz Elemanı) olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.12 Elektrokimyasal immünosensörün devre modeli, Difüzyonlu Sabit Faz Elemanı (CPE with Diffusion)

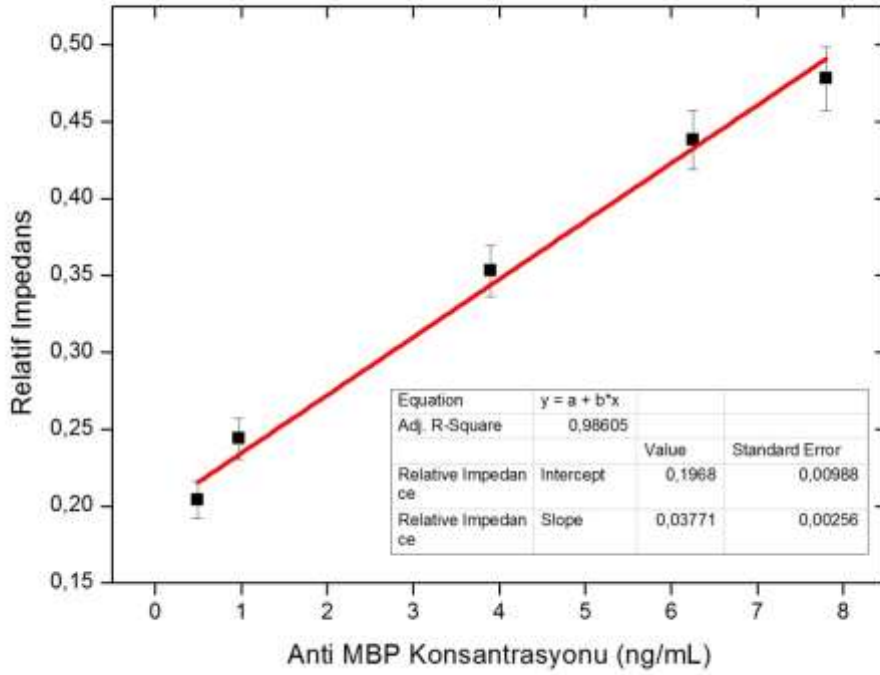
5.9 Kalibrasyon Grafikleri

Geliştirilen immünosensörün kalibrasyon grafiklerinin elde edilebilmesi için, farklı konsantrasyonlarda Anti-MBP ile ölçümler alınmış, bu ölçümlerde elde edilen sonuçlarla lineer aralıklar ve tayin limiti belirlenip kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. İmmünosensör karakterizasyonunun önceki basamaklarında, immünosensörün diğer proteinlere oldukça düşük afinite göstermiş olması göz önüne alınarak herhangi ek bir proteinle kalibrasyon grafikleri çizilmesi gerek görülmemiştir.



Şekil 5.13 İmmünoensörün yüksek konsantrasyon bölgesindeki kalibrasyon grafiği

Şekil 5.9’da geliştirilen immünoensöre ait üst kalibrasyon bölgesi grafiği görülmektedir. Bu bölge için elde edilen kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayısı $R^2=0,99912$ olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyon grafiğinin üzerinde kalan Anti-MBP değerlerinde gözlenen doğrusallıktan sapmanın, elektrot yüzeyinin doygunluğa ulaşarak elektron aktarımını azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 5.14 İmmünoensörün düşük konsantrasyon bölgesindeki kalibrasyon grafiği

Şekil 5.10’da immünoensörün düşük Anti-MBP konsantrasyon bölgesine dair kalibrasyon grafiği verilmiştir. Bu bölgede, kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayısı $R^2=0,98605$ olarak saptanmıştır. İmmünoensörün düşük konsantrasyon kalibrasyon bölgesi 0,49 ng/mL Anti-MBP değeri ile son bulmaktadır ki bu değer aynı zamanda immünoensörün tayin sınırını temsil etmektedir.

5.10 Geliştirilen İmmünoensörün Gerçek Örneklerle Uygulanabilirliği

İmmünoensör sistemi optimize ve karakterize edilip kalibrasyon grafiklerinin çizilmesinin ardından klinik açıdan önem arz eden gerçek örneklerle uygulanabilirliği denetlenmiştir. Bu amaç için MS’li hastalardan alınan kan örnekleri ile geliştirilen immünoensör sistemi kullanılarak elektrokimyasal ölçümler alınmıştır.

Hazırlanan immünosensör sistemine MS hastası olduğu bilinen bir hastadan alınan kan örneğinden 5 µL damlatılarak kurutulmuş ve ölçüm alınmıştır. Elektrokimyasal ölçüm sonucunda 0,44'lük relatif impedans değeri elde edilmiş ve bu değer kalibrasyon grafiğinde yerine yazılarak 6,45 ng/mL'lik serum Anti-MBP değerine ulaşılmıştır. Bu sonuçlar literatürde karşılaşılan (Derkuş vd. 2013) değerlerle tutarlı görülmektedir. Bu sonuçla geliştirilen immünosensörün gerçek örneklerle çalışmaya uygun olduğu anlaşılmıştır.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasının amacı, MS'e neden olan oto-antikorlardan Anti-Miyelin Temel Proteini'nin hızlı, ekonomik ve güvenilir olarak tayin edecek ve MS teşhisinde manyetik rezonans görüntülerine destek olacak klinik veriler sunabilecek karbon nanotüp temelli MBP immünosensörünün geliştirilmesidir. Bu amaçla tez kapsamında karbon nanotüpler polietilen glikol ile fonksiyonellenip, taşıyıcı materyal olarak jelatin ile kaplanmış karbon baskı devre elektrotlara immobilize edilmiş, bu platform üzerine MBP immobilizasyonu gerçekleştirilerek immünosensör sistemi tamamlanmıştır. İmmünosensörün optimizasyon ve karakterizasyonu elektrokimyasal impedans spektroskopisi, dönüşümlü voltametri ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile denetlenmiştir. Karbon nanotüp fonksiyonelleme işlemi Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. Geliştirilen immünosensöre ait kalibrasyon grafiklerinin çizilmesinden sonra gerçek örneklerle uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Karbon nanotüp fonksiyonelleme işlemleri esnasında, fonksiyonelleme başarısının incelenmesi amacıyla FTIR spektrumları elde edilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde, karboksil fonksiyonel karbon nanotüpün (CNT-COOH) 1705 cm^{-1} 'de gözlenen karbonil gerilmesi, PEG₂₀₀₀ konjugasyonunun akabinde 1740 cm^{-1} 'de gözlenen ester grubunun karbonil titreşim pikine kaymıştır. Bu durum, CNT-COOH'ün başarılı bir şekilde PEG fonksiyonellendiğinin (CNT-PEG), fonksiyonelleme sonucunda açıl klorürlenmiş nanotüpün karbonil grubu ile polietilen glikolün hidroksil grupları arasında ester bağının oluştuğunu açıkça ortaya koymaktadır (Andersen vd. 2013).

İmmünosensörün tasarım aşamasında, Jelatin-CNT-PEG-MBP immünosensörünün SEM görüntüleri elde edilerek söz konusu sistemin MBP bağlama kapasitesi ve CNT'nin jelatin film yüzey alanına etkisi incelenmiştir. Filmlerin morfolojileri hakkında bilgi edinmek amacıyla alınan SEM görüntülerinin çalışma potansiyeli 10 ve 5 kV'tır. SEM grafikleri, jelatin kaplanmış elektrot yüzeyinde, jelatinin doğası sonucu oluşan mikroadacık yapılarını göstermiştir. Jelatin film üzerine gerçekleştirilen CNT ilavesi, mikroadacıkların aralarında oluşan köprü benzeri yapıların ortaya çıkmasına sebep

olmuştur. Bu basamakta ayrıca yüzey alanındaki artış da dikkat çeken bir başka unsur olmuştur. MBP immobilizasyonu sonucu elektrot yüzeyinde proteinin karakteristik yapısı görülebilmektedir. Bu görüntü MBP immobilizasyonunun başarı ile gerçekleştirildiğini gözler önüne sermektedir (Derkus vd. 2013).

Optimum elektrot bileşiminin belirlenebilmesi amacıyla optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak karbon nanotüp optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla %5 epiklorohidrin ve 125 µg/mL MBP miktarları sabit tutularak 0,001, 0,002, 0,005, 0,008 ve 0,010 mg CNT-PEG miktarları denenmiştir. CNT-PEG optimizasyonu çalışmalarında 20 ng/mL Anti-MBP kullanılmıştır. Düşük miktarda CNT-PEG, duyarlı bir immünosensör geliştirmeye müsaade etmeyecek kadar düşük verimde MBP immobilizasyonu sağlayabilmiştir. CNT-PEG miktarındaki artış, MBP immobilizasyonu verimini, dolayısıyla MBP – Anti-MBP etkileşimini arttırmış, böylelikle immünosensör sinyalinin artmasına sebep olmuştur. Yüksek miktarda CNT-PEG ise, nanopartiküllerin üst üste binerek MBP bağlama verimini azaltmasına, bu doğrultuda impedans sinyalinde düşüşe sebep olmuştur. Optimizasyon deneyleri sonucu en uygun CNT-PEG miktarı 0,005 mg olarak tespit edilmiştir.

Polietilen glikol fonksiyonel gruplarını aktifleştirmek ve MBP'ye bağlanmasını sağlamak amacıyla epiklorohidrin kullanılmış ve bu bileşenin optimum şartları belirlenmiştir. ortaklanmamış elektronları ile tepkime verir ve iki molekülün birbirine bağlanmasını sağlar. En uygun ECH konsantrasyonunun tespiti için, 0,005 mg CNT ve 125 µg/mL MBP değerleri sabit tutularak ECH'in 0,8 M NaOH içerisindeki %4, %5, %6, %7 ve %8'lik konsantrasyonları denenmiştir. Düşük ECH konsantrasyonu, yeterli düzeyde hidroksil fonksiyonel grubu aktivasyonu sağlayamadığından ve bu sebepten ötürü yeterli MBP immobilizasyonu gerçekleşmediğinden dolayı düşük sinyal alınmasına sebep olmuştur. ECH konsantrasyonundaki artış MBP immobilizasyonu verimini arttırmış, böylelikle yüksek sinyal alınmasını sağlamıştır. Artan ECH konsantrasyonu ile beraber hidroksil aktivasyonu oldukça artmış, fakat bununla birlikte aktive olan hidroksil gruplarının birbirleri ile reaksiyon verme oranı da artmış ve MBP immobilizasyonunun verimi azalmıştır. Bu sebepten yüksek ECH derişimlerinde MBP immobilizasyonunun azalması ve buna bağlı olarak elektrokimyasal sinyalde düşüş

gözlenmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda en uygun ECH konsantrasyon değeri %5'lik çözelti olarak tespit edilmiştir.

Geliştirilen immünosensörün biyolojik ajanı Miyelin Temel Proteini'dir ve Anti-Miyelin Temel Proteini elektrot yüzeyine bağlayarak derişiminin belirlenmesinde görev almaktadır. En uygun MBP konsantrasyonunu saptamak ve böylelikle optimum immünosensör bileşimini elde etmek için 5-75 µg/mL'lik MBP konsantrasyon aralığında elektrotlar hazırlanmış ve elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Taşıyıcı sisteme immobilize edilecek MBP için optimum değerin 25 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Düşük MBP konsantrasyonlarında, sistem elde edilebilecek en iyi performansı göstermezken; artan MBP konsantrasyonlarında, taşıyıcı polimer jelatinin gözenekleri protein tarafından doyunlaştırılmış, böylelikle elektron difüzyonu engellenmiş ve elektron transfer hızı azalmasına bağlı olarak düşük sinyal elde edilmiştir.

Tasarlanan immünosensör sisteminden en iyi cevabın tespiti için anti-MBP'nin immünosensöre inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Bu amaçla tasarlanan immünosensör sistemi anti-MBP ile 5, 15, 30, 60, 120 dakika inkübe edilmiş ve elde edilen relatif impedans değerleri grafiğe geçirilmiş ve optimum inkübasyon süresi tespit edilmiştir. Elde edilen relatif impedans grafiğinden, tasarlanan immünosensör sisteminin en verimli çalıştığı anti-MBP inkübasyon süresinin 60 dakika olduğu anlaşılmış, böylelikle immünosensörün cevap süresinin 60 dakika olduğu belirlenmiştir.

Geliştirilen immünosensör sisteminin, pratik kullanımı açısından büyük önem arzeden tekrar üretilebilirliği denetlenmiş, bu amaç için, daha önceki basamaklarda maksimum performans sağlanan immünosensör bileşiminde 5 adet immünosensör hazırlanmış ve 20 ng/mL'lik anti-MBP ilavesi ile impedimetrik cevaplar irdelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, hazırlanan immünosensörün 0,647 ortalama değere sahip olduğu bulunmuş, standart sapmanın % 6,2 olduğu gözlenmiştir. Söz konusu standart sapmanın, elektrot fabrikasyon sürecinde PEG ile fonksiyonellenmiş karbon

nanotüplerin elektrot yüzeyinde farklı homojenlikte dağılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bir immünosensörün hedef analite yüksek, çözelti içerisinde bulunabilecek diğer türlere ise düşük afinite göstermesi beklenmektedir. Geliştirilen immünosensörün spesifikliğini denetlemek için Anti-Miyelin ilişkili glikoprotein (Anti-MAG), Anti-Tümör Nekroz Faktörü Alfa (Anti-TNF α) ve Anti-İnsan İmmüoglobülin G (Anti-hIgG) ile seri deneyler gerçekleştirilmiş ve alınan cevaplar incelenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen immünosensörün, tasarlandığı gibi Anti-MBP'ye spesifik olduğu ortaya koyulmuştur. Hedeflenen ölçüm örneklerinde ve hastalıklarda gözlemlenebilecek diğer proteinlere karşı cevabın oldukça az olduğu görülmüştür. Diğer proteinlere karşı verilen cevapların, söz konusu proteinlerin polietilen glikol zincirleri arasına kısmen hapsolmesinden kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir.

İmmünosensörün vücut sıvılarındaki davranışının incelenmesi amacıyla yapay beyin omurilik sıvısından geri kazanım çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla yapay BOS içerisine, immünosensörün lineer aralıkları arasında kalan 50 ve 25 ile 6 ve 3 ng/mL Anti-MBP ilave edilmiş ve ölçümler alınarak elde edilen relatif impedans değerleri kalibrasyon grafiklerinden elde edilen denklemlerde yerlerine yazılarak, eklenen Anti-MBP'nin geri kazanımı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar üretilen immünosensörün BOS'tan geri kazanımının % 103,00 ile % 95,34 arasında olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar geliştirilen immünosensörün geri kazanımının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen immünosensörün kalibrasyon grafiklerini elde etmek amacıyla, farklı Anti-MBP konsantrasyonlarında ölçümler alınmış ve elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek immünosensörün lineer aralığı ve tayin limiti incelenmiştir. İmmünosensörün vücut sıvılarında gözlemlenebilecek diğer proteinlere düşük afinite gösterdiği sonucundan hareketle, kalibrasyon grafikleri bir başka proteinle tekrarlanmasına gerek görülmemiştir. Elde edilen veriler ışığında elektrokimyasal immünosensörün, 62,5 ile 15,63 ng/mL ve 7,8 ile 0,49 ng/mL olmak üzere iki farklı bölgede doğusallık gösterdiği

tespit edilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinin yüksek konsantrasyon bölgesinde $R^2=0,99912$, düşük konsantrasyon bölgesinde $R^2=0,98605$ determinasyon katsayılarına sahip olması verilerin güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Geliştirilen immünosensörün tayin limiti 0,49 ng/mL olarak ortaya koyulmuştur.

İmmünosensör sistemi optimize ve karakterize edilip kalibrasyon grafiklerinin çizilmesinin ardından klinik açıdan önem arz eden gerçek örneklerle uygulanabilirliği denetlenmiştir. Bu amaç için MS'li hastalardan alınan kan örnekleri ile geliştirilen immünosensör sistemi kullanılarak elektrokimyasal ölçümler alınmıştır. Elektrokimyasal ölçüm sonucunda 0,44'lük relatif impedans değeri elde edilmiş ve bu değer kalibrasyon grafiğinde yerine yazılarak 6,45 ng/mL'lik serum Anti-MBP değerine ulaşılmıştır. Bu sonuçlar literatürde karşılaşılan (Derkuş vd. 2013) değerlerle tutarlı görülmektedir. Bu sonuçla geliştirilen immünosensörün gerçek örneklerle çalışmaya uygun olduğu anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Andersen, A.J., Windschiegl, B., Ilbasimis-Tamer, S., Degim, I.T., Hunter, A.C., Andersen, T.L. and Moghimi, S.M. 2013. Complement activation by PEG-functionalized multi-walled carbon nanotubes is independent of PEG molecular mass and surface density, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* Vol. 9 469–473
- Andreescu, S. and Sadik, O.A. 2004. Trends and Challenges in Biochemical Sensors for Clinical and Enviroment Monitoring., *Pure Appl. Chem.*, Vol.76(4); pp. 861-878.
- Babadi, A.A., Bagheri, S. and Hamid, S.B.A. 2016. Progress of implantable biofuel cell: Nano-carbon functionalization for enzyme immobilization enhancement. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol 79. 850-860
- Bagheryan, Z., Noori, A., Bathaie, Z. and Yousef-Elahi, M. 2016. Preparation of a new nanobiosensor fort he determination of some biogenic polyamines and investigation of their interaction with DNA. *Biosensors & Bioelectronics*, Vol 77. 767-773
- Bahadır, E.B. and Sezgintürk, M.K. 2015. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*, Vol 132. 162-174
- Bahr J.L., Yang, J., Kosynkin, D.V., Bronikowski, M.J., Smalley, R.E. and Tour J.M. 2001. Functionalization of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: a bucky paper electrode. *J Am Chem Soc*. Jul 11;123(27):6536-42
- Bakhti, M., Aggarwal, S. and Simons, M. 2014. Myelin architecture: zippering membranes tightly together. *Cell. Mol. Life Sci*. Vol 71. 1265-1277
- Boitieux, J.L., Romette, J.L., Aubry, N. and Thomas, D.A. 1984. Computerised enzyme immunosensor: application for the determination of antigens. *Clin Chim Acta.*, Vol.136(1); pp.19-28.
- Bouvrette, P. and Luong, J.H. 1995. Development of a flow injection analysis (FIA) immunosensor for the detection of Escherichia coli. *Int J Food Microbiol*. Vol.27(2-3); pp. 129-37.
- Byrne, M.T., McNamee W.P. and Gun'ko, Y.K., 2008. Chemical functionalization of carbon nanotubes for mechanical reinforcement of polystyrene composites. *Nanotechnology*. 15;19(41):415707. doi: 10.1088/0957-4484/19/41/415707
- Cai, H., Cao, X., Jiang, Y., He, P. and Fang, Y. 2003. Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. *Anal Bioanal Chem*. 2003 Jan;375(2):287-93

- Chen, P.Y., Vittal, R., Nien, P.C. and Ho, K.C. 2009. Enhancing dopamine detection using a glassy carbon electrode modified with MWCNTs, quercetin, and Nafion. *Biosens Bioelectron.* 2009 Aug 15;24(12):3504-9. doi: 10.1016/j.bios.2009.05.003
- Charcot, J.M., 1868. Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz. Hop. Paris.*
- Choi, J.W., Min, K. M., Hengoju, S., Kim, G.J., Chang, S. I., deMello, A.J., Choo, J. and Kim, H.Y. 2016. A droplet-based microfluidic immunosensor for high efficiency melamine analysis. *Biosensors & Bioelectronics.* Vol 80. 182-186
- Cosnier, S. 2003. Biosensors based on electropolymerized films: new trends, *Anal Bioanal Chem*, 377: 507-520
- Derkus, B., Emregul, E., Yucesan, C. and Emregul, K.C. 2013. Myelin basic protein immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* 46 53–60
- Díaz-González, M., González-García, M.B. and Costa-García, 2005. A. Immunosensor for Mycobacterium tuberculosis on screen-printed carbon electrodes. *Biosens Bioelectron.*, Vol. 20(10); pp. 2035-43.
- Duangkaew, P., Tapaneeyakorn, S., Apiwat C., Dharakul, T., Laiwejpithaya, S., Kanatharana, P. and Laocharoensuk, R. 2015. Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on dual signal amplification process for p16^{INK4a} cervical cancer detection in clinical samples. *Biosensors & Bioelectronics.* Vol 74. 673-679
- Fard, J.K., Jafari, S. and Eghbal M.A. A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 5(4), 474-455
- Fisher, A.C. 1996. *Electrode Dynamics*, Oxford Sci. Publ., Oxford, UK.
- Ghindilis, A. L., Atanasov, P., Wilkins, M. and Wilkins, E. 1998. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol 13., No. 1, pp 113-131
- Haga, M., Itagaki, H., Sugawara, S. and Okano, T. 1980. Liposome immunosensor for theophylline, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 95(1); pp. 187–192.
- Harauz, G. and Boggs, J.M. 2013. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *J. Neurochem.* Vol 125. 334-361.
- He, H., Pham-Huy, L.A., Dramou, P., Xiao, D., Zuo, P. and Pham-Huy, C. 2013. Carbon nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *BioMed Research International.* Vol 2013.
- Hwang, J.Y., Shin, U.S., Jang, W.C., Hyun, J.K., Wall, I.B. and Kim, H.W. 2013. Biofunctionalized carbon nanotubes in neural regeneration: a mini-review. *Nanoscale*, Vol 5. 487.

- Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. Vol 354. 56-58
- Josephs, H.J. 1971. *The Heaviside Papers found at Paignton in 1957. Electromagnetic Theory by Oliver Heaviside*, Chelsea Publishing Co, New York
- Kaur, G., Tomar, M. and Gupta, V. 2016. Realization of a label-free electrochemical immunosensor for detection of low density lipoprotein using NiO thin film. *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 80 294-299
- Kramer, E.M., Schardt, A. and Nave, K.A. 2001. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes, *Microsc. Res. Tech.*, Vol.52; pp. 656-671.
- Lamers, K.J.B., Vos, P., Verbeek, M.M., Rosmalen, F., van Geel, W.J.A. and van Engelen, B.G.M. 2003. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients, *Brain Research Bulletin*, Vol.61; pp. 261-264
- Leng, C., Wu, J., Xu, Q., Lai, G., Ju, H. and Yan, F. 2011. A highly sensitive disposable immunosensor through direct electro-reduction of oxygen catalyzed by palladium nanoparticle decorated carbon nanotube label. *Biosens Bioelectron.* 2011 Sep 15;27(1):71-6. doi: 10.1016/j.bios.2011.06.017
- Li, X., Liu, X., Wang, W., Li, L. and Lu, X. 2014 High loading Pt nanoparticles on functionalization of carbon nanotubes for fabricating nonenzyme hydrogen peroxide sensor. *Biosens Bioelectron.* 2014 Sep 15;59:221-6. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.046
- Liu, G., Qi, M., Zhang, Y., Cao, C. and Goldys, E. M. 2016. Nanocomposite of gold nanoparticles and graphene oxide towards an stable label-free electrochemical immunosensor for detection of cardiac marker troponin-I, *Analytica Chimica Acta*. Vol 909. 1-8
- Ma, H., Zhou, J., Li, Y., Han, T., Zhang, Y., Hu, L., Du, B. and Wei, Q. 2016. A label-free electrochemiluminescence immunosensor based on EuPO₄ nanowire for the ultrasensitive detection of Prostate specific antigen, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol 80, 352-358
- Mattson M.P., Haddon, R.C. and Rao A.M., 2000. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J Mol Neurosci.* 2000 Jun;14(3):175-82.
- Martin, E.J. 2001. *Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating*, Master's Thesis
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P. and Lublin, F.D. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* Vol 50. 121-127

- Messina, G.A., Panini, N.V., Martinez, N.A. and Raba, J. 2008. Microfluidic immunosensor design for the quantification of interleukin-6 in human serum samples, *Anal Biochem.*, Vol.380(2); pp.262-7.
- Milo, R. and Miller, A. 2014. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. Vol 13. 518-524
- Mohammed, M. I. and Desmulliez, M. P. 2011. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. *Lab Chip*. Vol 11. 569-595
- Mungroo, N. A. and Neethirajan, S. 2014. Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry- a review. *Biosensors*. Vol 4, 472-493
- Parry, R.P., Love, C. and Robinson, G.A. 1990. Detection of rubella antibody using an optical immunosensor, *J. Virol. Methods.*, Vol.27(1); pp. 39-48.
- Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Briand, J.P., Kostarelos, K., Prato, M. and Bianco, A., 2006. Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery, *Chem Commun (Camb)* 21;(11):1182-4. Epub 2006 Feb 13.
- Paiva, M.C., Simon, F., Novais, R.M., Ferreira, T., Proença, M.F., Xu, W., and Besenbacher, F. 2010. Controlled functionalization of carbon nanotubes by solvent free multi component approach, *ACS Nano* 28;4(12):7379-86. doi: 10.1021/nn1022523
- Palanisamy, S., Cheemalapati, S. and Chen, S.M. 2012. Highly sensitive and selective hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin immobilized at multiwalled carbon nanotubes-zinc oxide composite electrode. *Anal Biochem.* 2012 Oct 15;429(2):108-15. doi: 10.1016/j.ab.2012.07.001
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A. and Ebers, G.C. 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. Vol 13. 227-231
- Preda, G., Bizerea, O. S. and Vlad-Oros, B. 2011. Biosensors for Health, Environment and Biosecurity. Chapter 17.
- Readhead, C., Takasashi, N., Shine, H.D., Saavedra, R., Sidman, R. and Hood, L. 2006. Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin. *Ann. N Y Acad. Sci.* Vol 605. 280-285
- Sajid, M.I., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H. and Elaissari, A. 2016. Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications.
- Santoro, M., Tatara, A.M. and Mikos, A.G. 2014. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. Vol 190. 210-218.
- Schumacher, G.A., Beebe, G., Kibler, R.F., Kurland, L.T., Kurtzke, J.F. and McDowell, F. 1965. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis:

report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy. *Ann N Y Acad Sci.* Vol 122. 552-568

- Souiri, M., Blel N., Sboui, D., Mhamdi, L., Epalle T., Mzoughi, R., Riffard S. and Othmane, A. 2014. AFM, CLSM, and EIS chracterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila*, *Talanta*, Vol 118, 224-230
- Streber, R., Peters, S. and Pfeifer, K. 2016. Systematic review of correlates and determinants of physical activity in persons with multiple sclerosis, *ARCHIVES OF PHYSICAL MEDICINE AND REHABILITATION*, doi: 10.1016/j.apmr.2015.11.020
- Susmel, S., O'Sullivan, C.K. and Guilbault, G.G. 2000. Human cytomegalovirus detection by a quartz crystal microbalance immunosensor, *Enzyme Microb Technol.* Vol.127(9); pp.639-645.
- Swierczewska, M., Choi, K.Y., Mertz E.L., Huang, X., Zhang, F., Zhu, L., Yoon, H.Y., Park, J.H., Bhirde, A., Lee, S. and Chen, X., 2012. A facile, one-step nanocarbon functionalization for biomedical applications, *Nano Lett.* 2012 Jul 11;12(7):3613-20. doi: 10.1021/nl301309g
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, S. 1999. *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report)*, *Pure Appl. Chem.*, Vol.71 (12); pp. 2333-2348.
- Tang, F., Pang, D.W., Chen, Z., Shao J. B., Xiong, L. H., Xiang Y. P., Xiong, Y., Wu, K., Ai, W. H., Zhang, H., Zheng X. L., Lv, J. R., Liu, W. Y., Hu, H. B., Mei, H., Zhang, Z., Sun, H., Xiang Y. and Sun, Z. Y. 2016. Visual and efficient immunosensor technique for advancing biomedical applications of quantum dots on *Salmonella* detection and isolation. *Nanoscale*. DOI: 10.1039/c5nr07424j
- Yang, C., Denno M. E., Pyakurel P. and Venton B.J. 2015. Recent trends in carbon material based electrochemical sensors for biomolecules: a review. *Analytical Chimica Acta*. Vol 887. 17-37

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa ÖZKAN
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 07.08.1989
Yabancı Dili : İngilizce
Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Kanuni Lisesi (2006)

Üniversite : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2012)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2012 – Haziran 2016)

Bilimsel Çalışmalar

Yayınlar

1. Burak Derkuş, Mustafa Özkan, Kaan Cebesoy Emregül, Emel Emregül, **Single frequency analysis for clinical immunosensor design**, RSC Advances 6 (1), 281-289

Bildiriler

1. Alginate and Alginate - Titanium Dioxide Nanocomposite as Electrode Materials for Anti-Myelin Basic Protein Immunosensing (10th Nanoscience and Nanotechnology Conference, NanoTR10, 2014 – Poster sunumu)
2. Developement of Polyethylene Glycol Functionalized Carbon Nanotube Based Anti Myelin Basic Protein Immunosensor (BioMED 2015 – Poster sunumu)