



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**TERS İYONTOFOREZ YÖNTEMİ İLE
HOMOSİSTEİN MOLEKÜLÜNÜN GİRİŞİMSEL OLMAYAN
AMPEROMETRİK METOTLA TAYİN EDİLMESİ**

Doktora Tezi

Emel EREN

Danışman
Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ

SAMSUN
2021

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**



**TERS İYONTOFOREZ YÖNTEMİ İLE
HOMOSİSTEİN MOLEKÜLÜNÜN GİRİŞİMSEL OLMAYAN
AMPEROMETRİK METOTLA TAYİN EDİLMESİ**

Doktora Tezi

Emel EREN

Danışman
Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ

Bu tez çalışması MİR ARAŞTIRMA ve GELİŞTİRME A.Ş. tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Emel EREN tarafından, Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ danışmanlığında hazırlanan “Ters İyontoforez Yöntemi İle Homosistein Molekülünün Girişimsel Olmayan Amperometrik Metotla Tayin Edilmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 5.7.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Kamil IŞIK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Adem ASAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Murat YOLCU Giresun Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Osman ÇUBUK Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar’da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği’nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

05 /08 / 2021
Emel EREN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Ters İyontoforez Yöntemi İle Homosistein Molekülünün Girişimsel Olmayan Amperometrik Metotla Tayin Edilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 01.06.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

05 /08 / 2021
Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ

ÖZET

TERS İYONTOFOREZ YÖNTEMİ İLE HOMOSİSTEİN MOLEKÜLÜNÜN GİRİŞİMSSEL OLMAYAN AMPEROMETRİK METOTLA TAYİN EDİLMESİ

Emel Eren

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Doktora, Haziran/2021

Danışman: Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ

Homosistein, kronik kalp rahatsızlıklarında kandaki düzeyi önemli bir gösterge olan, anlık tayini ve izlenmesi önem arz eden bir aminoasittir. Tez çalışmasında, homosisteinin, ters iyontoforez tekniği uygulanarak ve non-invaziv olarak, doku sıvısı ile birlikte deri dışına alınması ve alınan bu sıvıda, amperometrik homosistein biyosensörü kullanılarak tayin edilmesine hizmet eden giyilebilir bir biyosensör sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla, tez çalışması üç aşamalı olarak yürütülmüş olup ilk aşamada, bir Screen Printed Karbon Elektrodun (SPCE) yüzeyi, kitosan, ferrosen ve karbon Nano Tüpün (CNT) belli oranlarını içeren bir karışımla modifiye edilmiştir. Bu yüzeye, D-aminoasit oksidaz enziminin gluteraldehit ile immobilizasyonu sağlanarak amperometrik homosistein biyosensör geliştirilmiş olup, kalibrasyon aralığı 3-100, tayin limiti (LOQ) 2,184 μM olarak tespit edilmiştir. Literatürdeki örneklerine göre performansı başarılı olup tek kullanım için uygundur. Amperometik homosistein biyosensörün doğruluk testi insan serum örneği kullanılarak yapılmış olup elde edilen veriler HPLC sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İkinci aşamada, deri yüzeyinden doku sıvısının dışarıya alınmasını simüle eden bir ters iyontoforez hücresi hazırlanmıştır. Ayırıcı membran olarak selüloz ester kullanılmıştır. Farklı homosistein konsantrasyonlarında, uygulanan akım yoğunluğu ve iyontoforez süresinin optimizasyonu yapılarak aralarındaki ilişki ortaya konulmuştur. Elde edilen verilerin literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Son aşamada, optimize edilen ters iyontoforez şartlarında, homosisteinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen ekstraktların amperometik homosistein biyosensörü kullanılarak damlatma yöntemiyle tayini gerçekleştirilmiştir. Vücuttaki homosisteini simüle eden 15-100 μM aralığında farklı konsantrasyona sahip standart çözeltilerin, 30 μM 'ın altındaki değerlerinden ekstrakte edilen homosistein miktarları biyosensörün tayin limitinin altında kaldığı için analiz edilememiştir. 30 μM 'dan daha yüksek konsantrasyona sahip standart çözeltilerinden elde edilen ekstraktlardaki homosisteinin ise, amperometik homosistein biyosensörün çalışma aralığına denk geldiği gözlenmiş ve başarı ile tayini gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ters iyontoforez, amperometrik homosistein biyosensör, amperometrik enzim biyosensör, homosistein, D-Aminosit enzim biyosensör

ABSTRACT

AN AMPEROMETRIC METHOD FOR NON-INVASIVE DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE MOLECULE BY REVERSE IONTOPHORESIS

Emel EREN

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Doctorate, June/2021

Supervisor: Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ

Homocysteine is an amino acid whose level in the blood is an important indicator in chronic heart diseases, and its instantaneous determination and monitoring are important. In this thesis study, it was aimed to develop a wearable non-invasive biosensor system that extracts homocysteine out of the skin with interstitial fluid via reverse iontophoresis technique and detects homocysteine in this interstitial fluid using an amperometric homocysteine biosensor.

For this purpose, the thesis study was carried out in three phases. In the first phase, the surface of an Screen Printed Carbon Electrode (SPCE) was modified with a blend containing certain proportions of chitosan, ferrocene and Carbon Nano Tube (CNT). On this surface, an amperometric homocysteine biosensor was developed by immobilizing the D-amino acid oxidase enzyme with glutaraldehyde. The calibration range was determined as 3-100 μM , limit of quantification (LOQ) 2.184 μM . Its performance was successful comparing with the examples in the literature, and it is suitable for single use. The accuracy test of the amperometric homocysteine biosensor was performed using a human serum sample, and the obtained biosensor data were compared with the HPLC results. In the second phase, a reverse iontophoresis cell was prepared that simulates the extraction of interstitial fluid from the skin surface. Cellulose ester was used as the separating membrane. At different homocysteine concentrations, the applied current density and the iontophoresis time were optimized and the relationship between them was revealed. It was observed that the obtained data was compatible with the literature. In the last stage, homocysteine was extracted under optimized reverse iontophoresis conditions and the obtained extracts were determined by drop method with amperometric homocysteine biosensor. Standard solutions with different concentrations in the range of 15-100 μM , simulating homocysteine in the body, was tested with the developed system. It was determined that the amounts extracted at values below 30 μM was below the LOQ value of the biosensor. It was observed that the extracts obtained from the standard solutions with a concentration higher than 30 μM were successfully determined by remaining above the LOQ level of the developed biosensor and corresponding to the working range.

Keywords: Reverse iontophore, amperometric homocysteine biosensor, amperometric enzyme biosensor, D-amino acid enzyme biosensors

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Alışlagelmişin dışında uzun bir zamana yayılarak tamamlanmış bir doktora çalışması oldu. Ancak değerli insanların değerli katkılarıyla bu tez çalışmasını nihayete erdirmek şükürler olsun nasip oldu. Doktora çalışmam boyunca, gösterdiği sabır, anlayış ve hoşgörü, hiçbir aşamada esirgemediği desteği, tecrübesi için değerli hocam Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ’a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarına olan katkıları dışında, iki değerli hocam olmak yanında bana aile sıcaklığını hissettiren değerli hocalarım Prof. Dr. Müberra ANDAÇ ve Prof. Dr. Ömer ANDAÇ’a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi bütün katkılarından dolayı MİR ARGE A.Ş. Yönetim Kurulu Başkanımız İbrahim MİRMAHMUTOĞULLARI’na, değerli büyüğüm Adil Mirmahmutoğulları’na, ve Doç.Dr. Zafer GEMİCİ’ye, edindiğim tecrübede katkısı büyük olan Dr. Mustafa DOĞU’ ya, yaklaşık 12 yıldır mensubu olmaktan onur duyduğum MİR ARGE ve bu ailenin üyesi her bir arkadaşşıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteklerinden dolayı Prof. Dr. İsmail TEKE’ye, Prof. Dr. Yücel ŞAHİN’e, Doç. Dr. Mehmet ŞENEL’e, Dr. Yıldız ULUDAĞ’a ve ayrıca bu alanla tanışmama vesile olan değerli hocam Dr. Orhan KİREMİTÇİ’ye teşekkür ederim.

Tez çalışması sırasında Canım Annem Semiha EREN, sonra da sevgili büyükbabam Avni SERARSLAN ebedi yurduna göç etti. Hayatımın şekillenmesine sağladığınız katkının karşılığı yok; Allah mekânınızı cennet etsin, ikinizi de çok özliyorum. Hayat neşesine hayran olduğum Sevgili Babam İsmail EREN’e, sevgili abim Ümit ve eşi Fatmanur’a, sevgili kız kardeşim Erbil ve eşi Tarık’a, sevgili kız kardeşim Ebru ve eşi Serdar’a “iyi ki benim kardeşlerim, benim ailem,” oldukları için teşekkür ederim.

Üzerimde emeği olan Hayrunnisa Ablam ve eşi Erdal Dayı’ma, hayatımda ayrı bir yeri olan ortaokul öğretmenin sevgili Tülin AYDIN Öğretmenime, ailemin bir parçası haline gelen Neslihan’a ve güzel annesi Nurten Teyzeme teşekkür ederim.

Hayat her yönü ile ayrı bir mücadele; bu mücadelede en çok ihmal ettiğim şeyin kendim olduğunu fark etmemi sağlayan Dr. Necip Çapraz’a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmamı, minik yeğenlerim Melih, Ali Ediz, Ferzan Faruk ve Neva’ya hediye ediyorum. Ömürleri kendi rotalarında hayırla şekillensin.

Haziran 2021, Samsun

Emel EREN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
1. GİRİŞ	1
1.1.Homosistein ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi	3
2. TEZ KONUSUYLA İLGİLİ KULLANILAN TEKNOLOJİLERİN GÜNCEL DEĞERLENDİRMESİ VE LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1.Giyilebilir “ <i>Wearable</i> ” Elektrokimyasal Sensör Teknolojisi	5
2.1.1. Giyilebilir Ter Sensörleri	7
2.1.2. Giyilebilir Tükürük Sensörleri	8
2.1.3. Giyilebilir Gözyaşı Sensörleri	8
2.1.4. Giyilebilir Hücreler Arası Sıvı Sensörü	8
2.2.Elektrokimyasal Sensör Teknoloji ve Biyosensörler	9
2.2.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Sınıflandırılması	9
2.2.2. Amperometri ve Amperometrik Enzim Biyosensörleri	13
2.2.3. Elektrokimyasal Aminoasit Biyosensör Geliştirilmesine Yönelik Literatür Özetleri	18
2.3.İyontoforez ve Ters İyontoforez Tekniği	22
2.3.1. İyontoforez Ortamı Olarak Derinin Yapısının İncelenmesi	23
2.3.2. Ters İyontoforezde Etkili Olan Taşınım Mekanizmaları	25
2.3.3. Ters İyontoforez Teknolojisi İle İlgili Literatür Özeti	28
2.3.4. <i>Glucowatch</i> Patent İncelemesi	34
2.4.Tezin Amacı ve Özgün Yönü	40
3. MATERYAL METOT	42
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Materyaller	42
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	43
3.3. Amperometrik Homosistein Biyosensörün Hazırlanması	44
3.4. İyontoforez Şartlarının Optimizasyonu	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Amperometrik Homosistein Biyosensör Protokolünün Oluşturulması	48
4.1.1. Biyosensörün KFCNT Karışımı Kaplama Kalınlığının Belirlenmesi	49
4.1.2. MWCNT ve SWCNT Seçimi	49
4.1.3. Gluter aldehit (GA) Oranı ve Kaplama Süresi	50
4.1.4. Enzim Kaplama	50

4.1.5. Denemelerde Kullanılan Elektrot Hazırlama Protokülü	51
4.2. Biyosensörün Performans Özellikleri	51
4.2.1. Amperometrik Homosistein Biyosensörün Kalibrasyon Grafiği ve Tayin Limiti	51
4.2.2. Tekrarlanabilirlik	53
4.2.3. Doğruluk ve Amperometrik Homosistein Biyosensörün Gerçek Numunelere Uygulanması	55
4.3. İyontoforez Çalışmaları	58
4.3.1. İyontoforez Elektrotların Hazırlanması	58
4.3.2. İyontoforez Hücresi	60
4.3.3. Ters İyontoforez Çalışmaları	61
4.4. Ters İyontoforez İle Elde Edilen Ekstraktların Geliştirilen Amperometrik Homosistein Biyosensör İle Tayin Edilmesi	68
4.5. Tartışma	70
4.5.1. Amperometrik Homosistein Biyosensörü	70
4.5.2. Ters İyontoforez Çalışmaları	79
4.5.3. Ters İyontoforez Yöntemi ile Ekstrakte Edilen Homosisteinin Amperometrik Enzim Biyosensör ile Tayini	81
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
6. KAYNAKÇA	85

SİMGELER ve KISALTMALAR

SİMGELER

Ag	Gümüş
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
Cl	Klor
Cl ⁻	Klorür İyonu
-COOH	Karboksil Grubu
e ⁻	Elektron
H ₂ O	Su Molekülü
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
Na ⁺	Sodyum İyonu
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	di-Sodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sodyum di-Hidrojen Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
-NH ₂	Amin Grubu
NH ₃	Amonyak
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
O ₂	Oksijen Molekülü
Pd	Paladyum
Pt	Platin
Rh	Podyum
Ru	Rutenyum
-SH	Tiyol Grubu
SiO ₂	Silisyum Dioksit

KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
μA	Mikro Amper
μM	Mikro Molar
AA	Aminoasit
AAOx	Aminoasit Oksidaz
AP	Alkalen Fosfataz
AuNP	Altın Nano-Partikül
BSS	Bağıl Standart Sapma
CE	Selüloz Ester
cm ²	Santimetrekare
CNT	Carbon Nano Tüp
CV	Siklik Voltomagram
DAA	D-Aminoasit
DAAOHRP	D-Aminoasit Oksidaz-Horse Radish Peroksidad
DAAOx	D-Aminoasit Oksidaz
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDC/Sulfo-NHS	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimide/N-hydroxisulfosuccinimide
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetikasit
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
GA	Gluteraldehit
GATA	Gülhane Askeri Tıp Akademisi

GOx	Glikoz oksidaz
Hcy	Homosistein
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HQ	Hydroquinone
HRP	Horseradish Peroksidaz
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KFCNT	Kitosan-Ferrosen-Karbon Nano-tüp Karışımı
KFCNTM	Kitosan-Ferrosen-Çok Katmanlı Karbon Nano Tüp Karışımı
KFCNTS	Kitosan-Ferrosen-Tek Katmanlı Karbon Nano-tüp Karışımı
KFCNTM-GA-AOx	Kitosan-Ferrosen-Çok Katmanlı Karbon Nano-tüp-Glutaraldehyt D-Aminoasit Oksidaz Enzimi Karışımı
LAA	L-Aminoasit
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
M	Molar
mA	Mili Amper
mg	Mili Gram
mL	Mili Litre
mV	Mili Volt
n	Örnek Sayısı
nm	Nano Metre
NP	Nanopartikül
NP	Nano Partikül
PBS	Fosfat Buffer Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PEG-DGE	Poly(ethylene glycol) diglycyl ether
PEO	poly-ethylene oxidase
R ²	Regrasyon Katsayısı
RSD	Relatif Standar Sapma
S/N	Sinyal /Gürültü oranı
SBdc	İki Fazlı Doğru Akım
SPCE	Screen Printed Carbone Elektrode
SPE	Screen Printed Elektrode
Tris-HCl	Hydroxymethyl Aminomethane-Hydrochloride
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Küresel ölçüde giyilebilir sensör teknolojisinin farklı sektörler bazında pazardaki dağılımı (Araganam vd, 2019)	2
Şekil 1.2.	Homosistein'in remetilasyon mekanizması (Gibson vd, 1963).....	4
Şekil 2.1.	Giyilebilir sensörlerin sınıflandırılması.....	6
Şekil 2.2.	Giyilebilir biyosensörler uygulamaları temsili gösterimi (Jin vd, 2020).....	7
Şekil 2.3.	Bir biyosensörün genel gösterimi (Pundir vd, 2018).....	9
Şekil 2.4.	Screen Printed Elektrot ve Bileşenleri (Counto vd, 2016).....	15
Şekil 2.5.	Deri tabakalarının gösterimi (Anonim, 2017)	24
Şekil 2.6.	Ters İyontoforezin deneysel bir kurguda gösterilen şematik diyagramı.	26
Şekil 2.7.	Glikoz ekstraksiyonu için "Ters İyontoforez" prosesi (Potts vd, 2002)	28
Şekil 2.8.	İyontoforetik difüzyon hücreleri (Leboulanger vd, 2004b)	29
Şekil 2.9.	İyontoforez sistemi (Connolly vd, 2002).....	30
Şekil 2.10.	İn vitro çalışmalar için kullanılan difüzyon hücreleri (Lee vd, 2010; Ching vd, 2014)	32
Şekil 2.11.	Ters iynotforez denemeleri için kullanılan sistemin bütünü (Liu vd, 2011) .	34
Şekil 2.12.	Glukonik asit ve hidrojen peroksit elde etmek için glukoz oksidazın katalizlendiği ve bir akımın oluşması ile sonuçlanan reaksiyonun gösterimi (Kim vd, 2004).....	38
Şekil 2.13.	Otomatik örnekleme sisteminin genişletilmiş resmi (Kim vd, 2004).	38
Şekil 2.14.	İki durumlu (bimodal) elektrot tasarımının bir uygulaması (Kim vd, 2004). .	39
Şekil 2.15.	Bir referans elektrot ve bir hidrojel kısım ile birleştirilerek kullanılabilen, çift durumlu elektrodun yan kesitinin gösterimi (Kim vd, 2004).	39
Şekil 3.1.	Dropsens screen printed elektrot (Anonymous, 2021).....	42
Şekil 3.2.	Çalışmalarda kullanılan ters iyontoforez düzeneği ve deney parametreleri ...	47
Şekil 4.1.	SPE yüzeyinde ferrosenin ve CNT'nin sinyal şiddetine etkisini gösteren siklik voltomogram.....	48
Şekil 4.2.	SPE yüzeyindeki sinyal şiddetine kaplama kalınlığının etkisini gösteren siklik voltaqram	49
Şekil 4.3.	SPE yüzeyindeki sinyal şiddetine MWCNT ve SWCNT etkisini gösteren siklik voltaqram.....	49
Şekil 4.4.	SPE yüzeyindeki sinyal şiddetine gluter aldehit oranının etkisini gösteren siklik voltaqram.....	50
Şekil 4.5.	Amperometirk Homosistein Biyosensörün, 3-100 µM Homosistein Konsantrasyonuna Karşı Verdiği Cevabın Ekran Görüntüsü.....	52
Şekil 4.6.	Amperometrik homosistein biyosensörün kalibrasyon grafiği	52
Şekil 4.7.	Amperometrik homosistein biyosensörün tekrarlanabilirliğini gösteren siklik voltaqram	53
Şekil 4.8.	Amperometrik homosistein biyosensörün 10 mM PBS'e karşı verdiği cevabın % olarak performansı	54

Şekil 4.9.	Amperometirk homosistein biyosensörün 1.,2.,3. kalibrasyon ölçümüne dair ekran görüntüsü	54
Şekil 4.10.	Amperometirk homosistien biyosensörün 1. ve 2. günkü kalibrasyon grafiklerinin karşılaştırılması; 3,125 -100 μ M Hcy, 10 mM PBS, pH:7,20 içerisinde.	55
Şekil 4.11.	Amperometirk homosistein biyosensörün 0,1 M PBS içindeki ve 0,1 M PBS + 1/3 oranında 4 μ M Hcy serum matrisi ortamındaki CV'lerinin karşılaştırılması	56
Şekil 4.12.	Amperometirk homosistien biyosensörün 0,1 M PBS (2/3) + 4 μ M Hcy(1/3) matrisi kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon grafiği ve gerçek numune ölçünü gösterien ekran görüntüsü.....	56
Şekil 4.13.	Gerçek numune homosistein tayini kalibrasyon grafiği.....	57
Şekil 4.14.	İyontoforez elektrotların hazırlanması- reaksiyon hücresi.....	58
Şekil 4.15.	Miktarı belirli bir akım uygulandığında, reaksiyonun gerçekleştiği hücre.....	59
Şekil 4.16.	İyontoforez elektrot hazırlanması reaksiyon hücresi; 90 dakika boyunca 314 μ A akım uygulaması	60
Şekil 4.17.	Deneyisel çalışmalarda kullanılmak üzere tasarlanmış ve kurulmuş ters-iyontoforez hücresi	61
Şekil 4.18.	0,1 mA /cm ² akım uygulanarak farklı sürelerde gerçekleştirilen ters iyontoforez işleminde elektrot ve membran deformasyon durumu.....	64
Şekil 4.19.	0,1 mA /cm ² akım uygulanarak farklı sürelerde gerçekleştirilen ters iyontoforez işleminde elektrot ve membran deformasyon durumu.....	65
Şekil 4.20.	Ters iyontoforez süresi ve farklı akım değerlerinde ekstrakte edilen homosistein ilişkisi	66
Şekil 4.21.	Farklı Homosistein Konsantrasyonlarında, Alt ve Üst Çözelti (-), Homosistein düzeyleri arasındaki ilişki	68
Şekil 4.22.	Amperometirk homosistein biyosensörü ile damlatma yöntemiyle homosistein tayini.....	68

TABLÖLER LİSTESİ

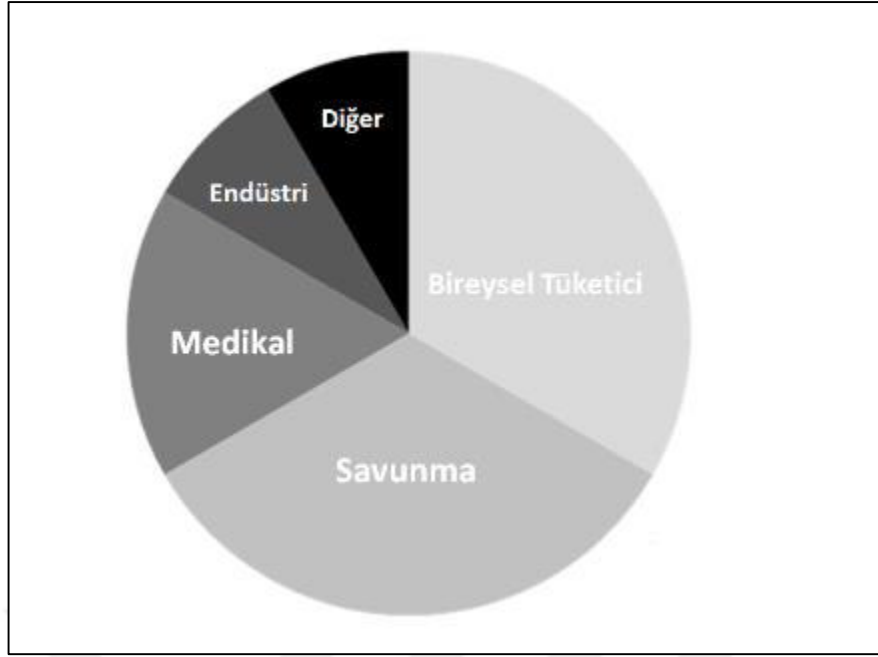
Tablo 2.1.	Biyosensör tasarımında kullanılan iletim sistemleri.....	11
Tablo 3.2.	Ters iyontoforez çalışmalarında kullanılacak olan Ag/AgCl elektrotların spesifikasyonları; literatürde belirtilen yöntem ve modifiye edilmiş yöntem (Lee vd, 2010).....	46
Tablo 4.1.	Amperometrik homosistein biyosensör hazırlama protokolü	51
Tablo 4.2.	Standart Sapmanın Hesaplanması	53
Tablo 4.3.	Amperometrik homosistein biyosensör ile serum örneklerindeki homosistein miktarının amperometrik olarak yapılan ölçüm sonuçları	57
Tablo 4.4.	Akım yoğunluğu ve süreye bağlı olarak iyontoforez elektrotların deformasyon durumunun gözlenmesi.....	62
Tablo 4.5.	HPLC testlerine yönelik gerekli bilgiler.....	63
Tablo 4.6.	Farklı iyontoforez sürelerinde, 0,1 mA / cm ² ve 0,2 mA/cm ² şartlarında elde edilen ekstraktların HPLC sonuçları	66
Tablo 4.7.	Akım yoğunluğu; 0,1 mA/cm ² , 15 dakika iyontoforez şartlarında elde edilen ekstraktların HPLC sonuçları	67
Tablo 4.8.	Ters iyontoforez şartları ve elde edilen ekstraktların hazırlanan biyosensörlerle ölçülmesi ile elde edilen veriler	68
Tablo 4.9.	SPE temeline dayanan ilaç sektörüne yönelik çalışılmış biyosensör çalışmaları (Counto vd, 2016).....	71
Tablo 4.10.	Geliştirilen amperometrik homosistein biyosensörün literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması	76

1. GİRİŞ

Biyosensör teknolojisinde, son zamanların en yeni ve önemli atılımlarından birisi, “*Wearable Biosensor Technology*” olarak adlandırılan “Giyilebilir Biyosensör” sistemleridir. Giyilebilir (*Weareble*) biyosensörlerin en dikkat çeken özellikleri, klasik medikal tanı sistemlerinin yerini alma potansiyeli taşımasıdır. Bilindiği üzere fizyolojik parametreler girişimsel (invasive = in vivo) ve girişimsel olmayan (non-invasive = in vitro) yöntemler olarak iki şekilde tayin edilmektedir. İnvaziv yöntemler bir enjektör yardımıyla vücuttan kan alınmasını gerektirir. Bu nedenle sürekli izlemeyi gerektiren diyabet hastalarında glikoz takibi, oksijen saturasyonu, sporcularda performansın izlenmesi gibi alanlarda yetersiz kalmaktadır. İnvaziv yöntemlerin bir diğer sakıncalı yönü, kan alma işleminin her zaman kontaminasyon riskine açık olmasıdır. Bunlara karşın, non-invaziv yöntemler, insan ya da hayvandan, deriyi delerek enjektör ile kan almayı gerektirmeksizin acısız bir şekilde ter, gözyaşı, tükürük ve doku sıvısını kullanarak ilgili analitin tayininin yapılmasına imkân sağlayabilir (Mathew vd, 2021).

Giyilebilir biyosensör uygulamalarının amacı, hastane ortamındaki hasta bakımının, evde yürütülen kişisel sağlık hizmetine dönüştürülmesi ve aynı zamanda bu hizmetin maliyetinin ve süresinin düşürülmesidir. Diğer taraftan giyilebilir biyosensör (biyo-izleme) teknolojisi, vücudun fizyolojik durumu ile ilgili anlık (real-time) bilgi alınmasını sağlayarak, sağlıklı yaşam tarzının benimsenmesinde ve kişisel farkındalık oluşmasında önemli bir rol oynar. Günümüzde giyilebilir sensörler daha çok fiziksel aktivitelerin takibi için kullanılmaktadır. Zira vücudun kimyasal dinamikleri ile ilgili moleküler düzeydeki bilgilerin yakalanmasında/izlenmesinde kullanılabilmesi için daha fazla araştırma ve geliştirme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır (Parlak vd, 2020; Wang vd, 2020)

Giyilebilir cihazların hayatın içinde yaygın uygulama alanı bulmasında, bilişim teknolojilerindeki gelişmeler kadar sensör teknolojisindeki ilerlemelerin de payı büyüktür. Özellikle spor ve sağlık alanında kullanıcı dostu yeni tasarımlar hayatın içinde yerini almış durumdadır. 2019 yılında, yayımlanan bir pazar araştırması raporuna göre (Araganam vd, 2019) giyilebilir sensör teknolojisinin pazardaki dağılımı Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Küresel ölçüde giyilebilir sensör teknolojisinin farklı sektörler bazında pazardaki dağılımı (Araganam vd, 2019)

Grafikte, “bireysel tüketici” alanındaki artış göze çarpsa da savunma ve medikal alanındaki giyilebilir teknolojilerin varlığının azımsanmayacak düzeyde olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, fiziksel aktivitelerin takip edilmesinde kullanılan sensör sistemlerinin, vücudun kimyasal özelliklerinin izlenmesinde kullanılanlara karşı rüştünü ispatlamış olması grafikteki farkın bir başka temel nedeni olarak da belirtilebilir. Vücudun kimyasal özelliklerini izlemek için geliştirilen biyosensörlerin, düşük analit konsantrasyonlarına cevap verebilme, mekanik dayanıklılık, düşük örnek hacimlerinde ölçüm alabilme, sensörün biyo-uyumluluğu gibi ana problemleri çözmesi gerekmektedir. Bu dazboğaz noktalara rağmen, in vitro şartlarda yapılan test/tanı sistemlerine alternatif olarak gözyaşı, ter, doku sıvısı ve tükürükte ilgili analiti tayin etmek için yapılan *non-invasive* çalışmalar her geçen gün hızla artarak devam etmektedir.

Bu tez çalışması, giyilebilir biyosensör teknolojisine hizmet edecek bir araştırmayı hedef almış, girişimsel olmayan yöntemleri kullanarak, doku sıvısı esaslı giyilebilir bir amperometrik homosistein biyosensörle, homosisteinin tayini için kurgulanmış ve çalışılmıştır.

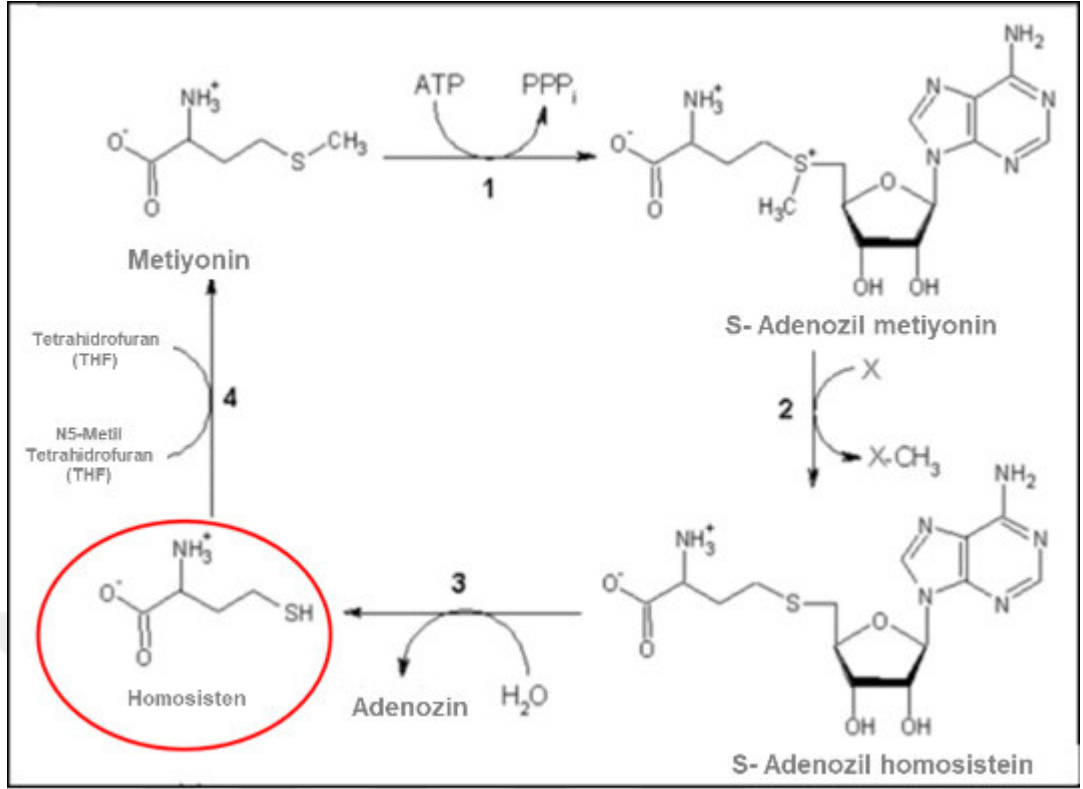
1.1. Homosistein ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Hastalıklar ve yüksek homosistein seviyeleri arasındaki ilişki, ilk olarak 1962 yılında Carson ve Neil tarafından bulunmuştur.

Plazma homosistein düzeyi, popülasyonlar arasında farklılık göstermesine rağmen, sağlıklı bir bireyde, 5-16 μM aralığındadır. Homosisteinin konsantrasyonu, 16 μM değerinin üstüne çıktığında, hiper homosisteinemia olarak adlandırılmakta olup üç aşamalı olarak tanımlanmaktadır; hafif düzey; 16-30 μM , orta düzey; 30-100 μM , ve şiddetli; >100 μM 'dır. Plazmadaki homosistein düzeyi, 500 μM seviyesine çıktığında ise bu durum homosisteinemia olarak adlandırılmaktadır (Zhang vd, 2006).

Homosistein düzeyi; metabolizmadaki genetik bozukluklar, kronik hastalıklar, vitamin ve beslenme eksiklikleri, kişisel özellikler (yaş, cinsiyet vb.) ve bazı ilaçlardan etkilenmektedir. Homosistein düzeyi özellikle yaşla birlikte artış göstermekte olup erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir. Artmış plazma homosistein düzeyi hiperhomosisteinemiye ve dolayısıyla homosisteinüriye neden olmaktadır. Vücutta homosistein düzeylerindeki bu artış erken yaşlarda gelişen ve hayatı tehdit edecek derecede önemli olabilen damar tıkanıklıklarına (beyin, kalp-koroner ve periferik) yol açmaktadır. Bu noktada dikkat çekilen önemli bir durum, hafif düzeylerdeki bir homosistein artışının bile damarlardaki tıkalı mekanizmaları uyandırabilmesidir. Bu nedenle birçok hastalık için risk faktörü olan plazma homosistein miktarının belirlenmesi, sağlık açısından büyük önem taşımaktadır (Carson vd, 1963; Anonim, 2018).

Homosistein, protein yapısında olmayan sülfürlü bir aminoasit olup transsülfürasyon veya remetilasyon yollarından birini kullanarak metabolize olur. Bu aminoasit, diyetle alınan ve endojen proteinlerden sentezlenen esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin metil grubu alınmış bir türevidir. Remetilasyon yoluyla metabolize olma mekanizması Şekil 1.2' de verilmiştir (Gibson vd, 1963).



Şekil 1.2. Homosistein'in remetilasyon mekanizması (Gibson vd, 1963)

Plazma homosistein düzeyi, ağırlıklı olarak Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ya da enzim immünoassay yöntemleri kullanılarak tayin edilmektedir. Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde yapılan bir çalışmada (Ozkan vd, 2003) homosistein düzeylerinin diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile arasındaki ilişkisinin araştırılması ve plazma homosistein konsantrasyonlarının, floresans detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile tayin edilmesi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisinde rutin olarak kullanılabilen bir test olarak kurulması planlanmış ve yapılan çalışmada bu amaca yönelik faaliyetler yürütülmüştür. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan başka bir çalışmada ise (Sekban vd, 2007) kan örnekleri, ön koldan standart kan alma işlemlerine uygun olarak Etilendiamin tetra asetat (EDTA) içeren tüplere alınmış ve yöntemin gerektirdiği santrifüjleme işlemlerine tabi tutularak plazmalar ayrılmıştır. Bu örneklerde plazma homosistein düzeyleri floresan polarizasyon immünoassay yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

2. TEZ KONUSUYLA İLGİLİ KULLANILAN TEKNOLOJİLERİN GÜNCEL DEĞERLENDİRMESİ VE LİTERATÜR ÖZETİ

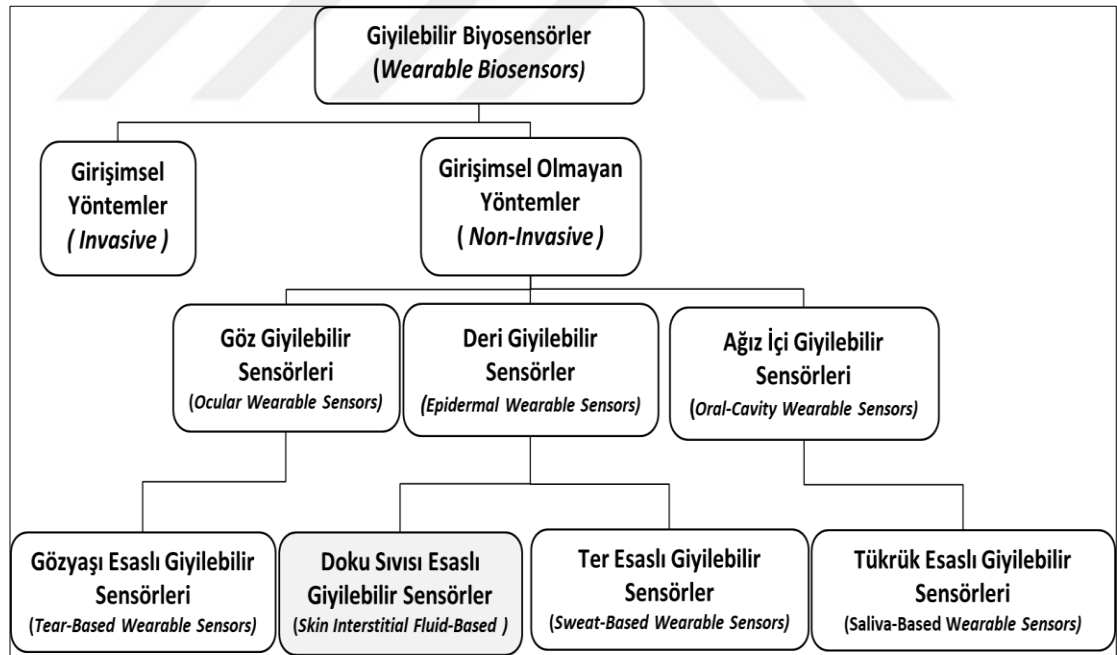
Tez çalışmasına temel teşkil eden literatür bilgileri, “Giyilebilir Biyosensör Teknolojisi”, Biyosensör Teknolojisi” ve “Ters İyontoforez Teknolojisi” olarak üç ana başlıkta toplanarak incelenmiştir. Literatür örnekleri de her bölümün kendi içerisinde sunulmuştur.

2.1. Giyilebilir “Wearable” Elektrokimyasal Sensör Teknolojisi

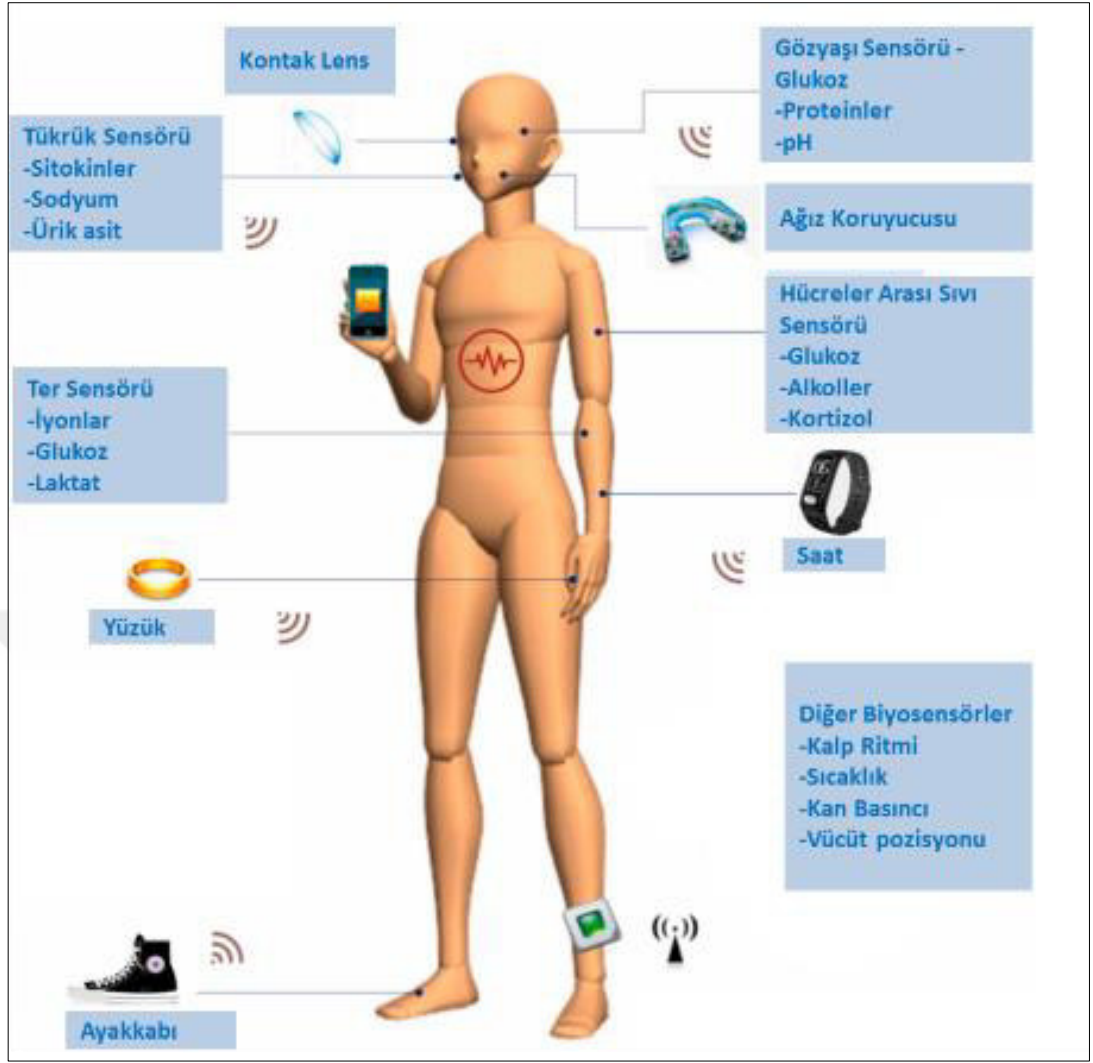
Kimyasal sensörler ve biyosensörler, sağlık sektöründe, kompleks, pahalı ve büyük analitik cihazlara alternatif olarak yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu cihazların birçoğu özellikle son yıllarda optik, piezoelektrik ve elektrokimyasal transduser sistemleri ile birlikte kullanılarak insan sağlığı açısından önemli olan birçok analitin tayini için geliştirilmektedir. Bunlar içerisinde elektrokimyasal sensörler, yüksek performansları, taşınabilirlik, basit ve ucuz olmalarından dolayı klinik tanıda yaygın bir role sahiptir. Elektrokimyasal ölçüm teknolojisinin sürekli gelişiyor olması metabolitlerin ve elektrolitlerin tayini için ACCU-CHECK (Şeker hastalarında kullanılan şeker ölçüm stripleri-elektrokimyasal sensör) (Roche Diagnostic, Inc.), iSAT (Abbott, Inc.), ve “Laktat Scout” (Sports Resource Group nc.) gibi ticari el-tipi analizörlerin de geliştirilmesini sağlamıştır. Bununla beraber bu sistemlerin çoğu, ilgili tayinin yapılması için kan örneğinin alınmasını gerektirmektedir. Bu sistemlerin kan almayı gerektiren doğası, özellikle yeni doğan, yaşlı ve kandan korkan hastalardaki uygulamalar için büyük problem teşkil etmektedir. Ayrıca bu sistemlerin kan almayı gerektirmesi, analitin sürekli olarak izlenmesinin özel bir öneme sahip olduğu farklı biyomedikal uygulamaları için de kısıtlayıcı bir durumdur. Örneğin, şeker hastalığı takibinde, glikozun düzenli izlenmesi bir zorunluluktur. Benzer şekilde, biyolojik bir sıvıda (kandan, terden vb. bir matristen ekstrakte edilmiş olan) patojenlerin anlık (real-time) tayin edilmesi, olası hastalık başlangıcı hakkında kişiyi uyarabilir. Bahsedilen bu konularda, hastalık teşhisinin sık periyotlarda kan alma yoluyla yapılması, anlık takip için uygun bir teknik değildir. Buna alternatif olarak, sürekli izlemeyi gerektiren durumlarda girişimsel olmayan (*non-invaziv*) giyilebilir (*Wearable*)” sensörlerin kullanılabilirliği günümüzde dikkat çeken bir alan olarak kendini göstermektedir. Google gibi büyük

küresel şirketler ve NoviSense, OrSense, Electrozyme gibi birçok küçük şirketin, yeni yeni giyilebilir girişimsel olmayan elektrokimyasal sensör alanına girmesiyle, bu alanın, yeni inovatif cihazlar ile önümüzdeki yıllarda tüketici pazarında hızlı bir şekilde büyümesi beklenmektedir. Girişimsel olmayan bu cihazlar, gözde katekolaminler ve antioksidanların izlenmesi, tükürükte kortizol ve patojenlerin izlenmesi, terde ve hücreler arası sıvıda aminoasit, kalsiyum ve patojenlerin izlemesi için kullanılabilir. Giyilebilir birkaç kimyasal sensörün birleştirilmesiyle, girişimsel olmayan çoklu-analit izleme sistemleri de sağlanabilir. Ayrıca, giyilebilir kimyasal ve fiziksel sensörler “bluetooth” cihazları ile birleştirilerek, verinin kablosuz olarak kullanıcının telefon ya da bilgisayarına transferi sağlanabilir (Bandodkar ve Wang, 2014).

Giyilebilir sensörlerin bir sınıflandırması Şekil 2.1’de, bu sensörlerin vücut ile entegrasyonunu ise Şekil 2.2’de verilmiştir (Jin vd, 2020). Giyilebilir girişimsel olmayan elektrokimyasal sensörler, gözyaşı, ter, hücreler arası sıvı ve tükürükte hedef analiti tayin etmek için kullanılabilir.



Şekil 2.1. Giyilebilir sensörlerin sınıflandırılması



Şekil 2.2. Giyilebilir biyosensörler uygulamaları temsili gösterimi (Jin vd, 2020).

2.1.1. Giyilebilir Ter Sensörleri

İnsan teri, insan sağlığının durumu ile ilgili birçok bilgi içermekte olup girişimsel olmayan kimyasal sensörler için mükemmel bir biyolojik sıvıdır. Örneğin terdeki sodyum, laktat, amonyum ve kalsiyum seviyeleri, sırasıyla kistik fibrosis, fiziksel stres, osteoporoz ve kemik minerallerinin eksikliği ve elektrolit dengesizliği için bir göstergedir. Belirtilen bu analitlerin anlık tayini, optimum fiziksel denge için son derece önemli bir durumdur. Teri izlemek için kullanılan girişimsel olmayan elektrokimyasal sensörler temel olarak iki tipe ayrılabilir. Birincisi kumaş/esnek plastik tabanlı, ikincisi de yeni ortaya konulan epidermal temelli sensörlerdir (Jin vd, 2020).

2.1.2. Giyilebilir Tükürük Sensörleri

Tükürük, kanda bulunan bir çok bileşeni, içeriğinde barındıran kompleks bir biyolojik sıvıdır. Bu sayede, siyalokimya (tükürük örneklerini inceleyen bilim dalı), insan vücudunun duyuşal, hormonal, besinsel ve metabolik durumu hakkında girişimsel olmayan mükemmel bir alternatif sunar. Tükürük ayrıca, kana göre kolay ulaşılabilir ve analiz için daha az ön hazırlık gerektirir. Tükürüğün bu avantajları, taşınabilir in-vitro teşhis aygıtlarının geliştirilmesi için araştırmacıların dikkatine çekmektedir. Tükürükte giyilebilir teknolojiye örnek olan ilk uygulama, bir takma diş içerisine sensörün entegre edilmesiyle gerçekleşmiştir (Jin vd, 2020).

2.1.3. Giyilebilir Gözyaşı Sensörleri

Gözyaşı, girişimsel olmayan tekniğe uygun bir materyal olup kanda bulunan birçok protein gözyaşında da mevcuttur. Özellikle kanın ve gözyaşının glikoz düzeyi korelasyon gösterdiğinden gözyaşı, şeker hastalığı takibinde kullanılabilir. Gözdeki aminoasit ve benzeri bileşen analizleri için laboratuvar ölçekli tanı sistemleri mevcuttur. Ancak toplanan gözyaşının buharlaşması, laboratuvara ulaştırılması ve gözün hassas bir organ olması, örnek toplama konusunda bir takım kısıtlamalar getirmektedir. Dolayısıyla gözyaşındaki analizler için girişimsel olmayan sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde uzaktan algılama sistemlerinin ve giyilebilir sensörlerin birleştirilmesiyle bu alandaki kısıtlamaların önüne geçilebileceği öngörülmektedir (Jin vd, 2020).

2.1.4. Giyilebilir Hücreler Arası Sıvı Sensörü

Hücreler arası sıvıdan, girişimsel olmayan ve sürekli bir şekilde birçok yaşamsal bilgi elde edilebilir. Son 30 yılda araştırmacılar, kalıtsal metabolik hastalıkların, organ yetmezliği ve ilaç etkinliğinin girişimsel olmayan tanısında hücreler arası sıvıdan faydalanmaktadır. Bununla beraber bu alandaki aktivitelerin çoğu, etkili diyabet yönetimi ile bağlantılı olan girişimsel olmayan glukoz sensörler üzerine odaklanmıştır. Hücreler arası sıvı ve kandaki glikoz arasındaki doğrusal ilişki, glikozun girişimsel olmayan şekilde izlenmesi için birçok akademik ve endüstriyel araştırmacıyı optik, ısı ve elektrokimyasal temelli cihazların geliştirilmesi konusuna yöneltmiştir. Bunlardan, ters iyontoforez yoluyla elektrokimyasal bir biyosensör kullanarak glikozun izlenmesi, tanımlanan en yaygın tekniktir. Bu teknik, ticari bir giyilebilir girişimsel olmayan elektrokimyasal glikoz izleme cihazı olan

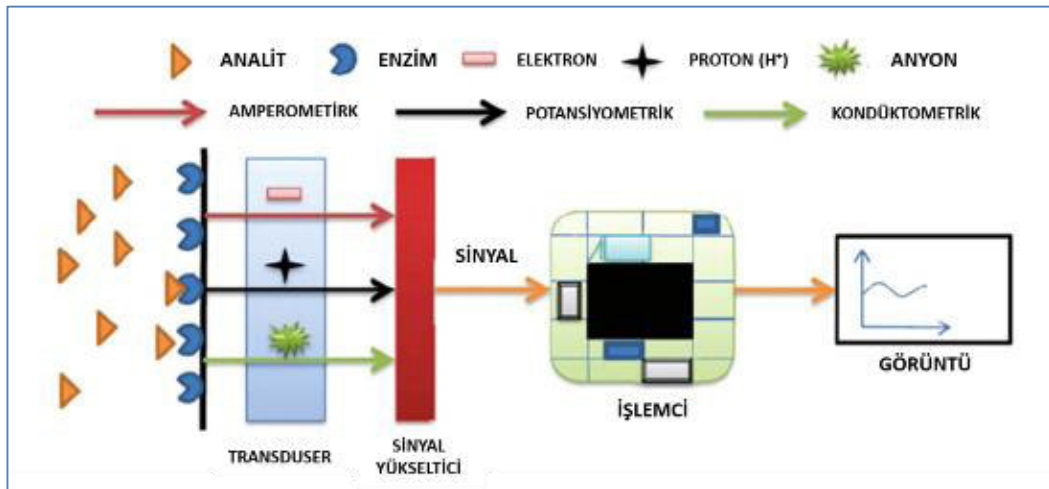
“GlucoWatch®Automatic Glucose Biographer Manufacturer (Cygnus, Inc.)” un geliştirilmesini sağlamıştır. Bununla beraber, cihazı kullanan hastaların derilerinde tahriş olduğunu bildirmesi üzerine oluşan endişe, cihazın pazardan geri çekilmesine neden olmuştur. Diğer giyilebilir girişimsel olmayan empedans spektroskopisi temelli glikoz sensör, (Pendra, Pentragon Medical Ltd.) veya optik (C8 Medisensors, C8 MediSensors, Inc.) transduserler de benzer kadere sahip olup başarılı bir şekilde henüz ticarileşememiştir. Bu gibi gelişmeler, sürekli, girişimsel olmayan glikoz sensör ile ilgili teknik zorlukları ve bu kritik problemlere uygun çözümlerin bulunması gerekliliğini vurgulamaktadır (Jin vd, 2020).

2.2. Elektrokimyasal Sensör Teknoloji ve Biyosensörler

IUPAC’a göre (Thevenot vd, 1999) elektrokimyasal biyosensör, elektrokimyasal bir transduser ile direkt olarak birleştirilmiş olan biyokimyasal bir reseptör kullanılarak, analitik bilgileri spesifik olarak kantitatif ya da yarı kantitatif bir şekilde sunabilen, herhangi başka bir sistemden bağımsız cihaz olarak tanımlanmıştır. Teknolojinin gelişim süreci boyunca ucuz, basit ve hızlı kullanılan analitik cihazlara ihtiyaç duyulmasının bir sonucu olarak biyokimyasal sensörler, çevre, klinik, tarım, gıda ve savunma amaçlı uygulamalarda farklı analitlerin, kalitatif ve kantitatif tayini için önemini koruyan ve gelişimini sürdüren bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır (Andreescu ve Sadik, 2004).

2.2.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Biyosensörler, bir biyoreseptör ve bir transduser sisteminden oluşmaktadır. Biyosensörün genel bir yapısı Şekil.2.3’de (Pundir vd, 2018) sunulmuştur.



Şekil 2.3. Bir biyosensörün genel gösterimi (Pundir vd, 2018)

2.2.1.1.Biyoreseptörler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyoreseptörler, biyosensör teknolojisinde spesifikliğin anahtarı olup analitlerin ilgili kısımlarının sensöre bağlanmasından sorumludur. Kullanılan çok sayıda farklı analit kadar farklı biyoreseptör mevcut olup antikor/antijen, enzimler, nükleik asitler/DNA, hücresel yapılar/hücreler olmak üzere sınıflandırılabilir. En yaygın kullanılan biyoreseptörler enzimler ve antikorlardır. Biyosensörler, biyoreseptör türüne göre, biyokatalitik ve biyoafinite esaslı olmak üzere iki şekilde gruplandırılabilir.

Biyokatalitik esaslı biyosensörler, biyosensörün biyolojik ortamında bulunan makro moleküller tarafından katalizlenen bir reaksiyonun izlenmesi esasına dayanır. Böylece sensör yüzeyinde bulunan biyokatalizör sayesinde substratın sürekli bir tüketimi sağlanır. En yaygın kullanılan biyokatalitik biyoreseptörler aşağıda verilmiştir;

- a. Enzimler (mono veya multi): en yaygın kullanılan ve en iyi bilinen tanıma (recognition) sistemleridir.
- b. Bütün hücreler (bakteri, fungi, ökaryotik hücreler gibi mikroorganizmalar) veya hücre organelleri ya da partiküller (mitokondri, hücre duvarı)
- c. Dokular (hayvan veya insan doku parçaları)

Biyosensörler üzerine yapılan ilk çalışmalardan bu yana, biyolojik matrislerde en çok kullanılan, üzerinde en çok çalışılan ve en iyi bilinen biyosensörler, biyokatalitik esaslıdır (Vo- Dihn ve Cullum, 2000; Thevenot vd, 1999)

Biyoafinite esaslı biyosensörler, biyosensörün biyolojik yapısında bulunan makro-moleküller ile analitin etkileşimi esasına dayanır. Genellikle bir dengeye ulaşılır ve böylece analit, kendisiyle kompleks oluşturan immobilize materyal tarafından daha fazla tüketilemez. Biyoafinite esaslı biyosensörlerde en çok kullanılan biyoreseptörler; antikorlar/antijenler ve reseptör hücrelerdir. Biyoreseptör olarak antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörler “immünosensör” olarak da adlandırılır. Antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörlerde, reseptör tabakaya immobilize edilmiş spesifik bir antikora, antijenin (analit) bağlanmasıyla immuno kimyasal bir reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyon son derece spesifik bir reaksiyon olup genellikle bağlanma ve afinite sabiti çok büyük olduğundan, bu gibi sistemler ya tersinir değildir (tek kullanımlık biyosensörler) ya da gerekli tampon çözeltiler kullanılarak kompleksin çözünmesi yoluyla sistemin tekrar kullanımı sağlanabilir.

2.2.1.2. Transduserler

Transduserler, biyoaktif tabakada meydana gelen reaksiyonu elektriksel bir sinyale çeviren fiziksel bir elementtir. Transduser yüzeyi, reseptör immobilizasyonu için uygun olmalıdır. İdealde, transduser yalnız başına, analiti izlemek için yeterli değildir, fakat reaktant konsantrasyonunun azalması veya ürün oluşumu gibi biyokimyasal olayları algılar. Potansiyel değişimi, elektron transferi, ışığın ürün veya reaktant tarafından yayılması veya absorbe edilmesi, sıcaklık veya kütle değişimi gibi olaylar transduser tarafından belirlenebilir. Tablo 2.1.'de transduserlerin prensipleri ve biyosensör yapımında kullanılan uygun sinyal çıktıları özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Biyosensör tasarımıda kullanılan iletim sistemleri

Transduser	Sinyal çıkışı
Elektrokimyasal	
Amperometri	Akım
Potansiyometri	Voltaaj
Kondüktometrik/impedimetrik	İletkenlik/İmpedans
Optik	
Kolorimetrik	Renk
Lüminesans	Işık şiddeti
Floresans	Işık şiddeti
Yüzey plazmon rezonans	Işık şiddeti
Kalorimetrik	
Termistör (sıcaklık duyarlı sensör)	Sıcaklık
Kütle	
Piezoelektrik	Frekans değişimi
Quartz kristal mikrobals	Frekans değişim
Manyetik	
Paramanyetizm	Manyetik alan

Elektrokimyasal biyosensörler, potansiyometrik, amperometrik ve kondüktometrik olarak sınıflandırılabilir;

- Potansiyometrik biyosensörlerde, elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlamaktadır. pH veya tek değerli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon veya katyonlara duyarlı iyon seçici elektrotlar potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörlerdir.

- Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrotunda yükseltgenen ya da indirgenen elektro aktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot, referans elektrot olarak iş görür. İlgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde akım yoğunluklarından yararlanılır.
- Kondüktometrik biyosensörlerde; elektriksel alanın varlığında bir çözeltide elektrik yükü, iyonlar tarafından taşınır. Çözeltinin iletkenliği çözeltideki tüm iyonik türlerin katkısıyla oluşur. Birçok enzim reaksiyonu, örneğin ürenin parçalanması gibi, mikro elektrotlar kullanılarak kondüktometrik veya impedimetrik olarak izlenebilir.

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan aygıtlardır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan enzim sensörleri, absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde iş görür.

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimi belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensörün seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Termal biyosensörlerin (kalorimetrik) temel ilkesi, bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunun belirlenmesidir. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır (Thevenot vd, 1999; Hou, 2005; Pundir vd, 2018).

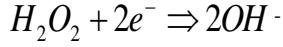
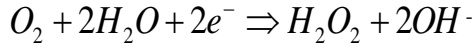
2.2.2. Amperometri ve Amperometrik Enzim Biyosensörleri

Elektrokimyasal biyosensörler, aminoasitlerin izlenmesinde, en hassas cihazlar olarak dikkat çekmektedir. Tez çalışmasının konusu olması yönüyle de, amperometri tekniği ve amperometrik olarak çalışan enzim biyosensörü bu başlık altında daha detaylı incelenmiştir. Bir biyosensörün geliştirilmesinde, transduser sistemindeki çeşitlilik kadar, spesifik sinyalin istenilen doğruluk ve şiddette elde edilmesini sağlayan; elektrot sistemleri, elektrotun yüzeyinin geliştirilmesi ve yüzeyin spesifik hale getirilmesi için kullanılan nano-malzeme, polimerler, karbon nonatüp gibi materyallerin seçimi de son derece önemlidir.

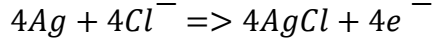
Amperometri, belirli bir elektro-aktif türün, sabit olarak uygulanan bir potansiyelde inert bir metal elektrotla indirgenmesini veya yükseltgenmesini sağlayan spesifik bir elektrokimyasal tekniktir. Belirli elektro-aktif türler, bir metal elektrotla indirgendiğinde veya yükseltgendiğinde (redoks reaksiyonları), elektronlar çalışma elektrotundan analite, ya da elektrottan analite geçiş yapmaktadır. Ayrıca amperometrik biyosensörler, kondüktometrik ve potansiyometrik biyosensörlerle karşılaştırıldığında, yüksek duyarlılık, hızlı ve ucuz olma gibi avantajlara sahiptir.

Amperometrik sistemler, bir elektrota, ikinci bir elektrota karşı (karşıt elektrot) sabit potansiyel uygulanıyorken, bu elektrotta bir elektro-aktif bileşenin indirgenmesi veya yükseltgenmesiyle oluşan akımın ölçülmesi temeline dayanır. Tipik bir örnek, bir elektrot yüzeyine immobilize edilen glikoz oksidaz enzimiyle, üretilen (hidrojen peroksit) ya da tüketilen (oksijen) türlerin elektrokimyasal tayinini yapmak için kullanılan glikoz biyosensördür. “Horseradish” peroksidaz (HRP), oksidoredüktaz veya alkalin fosfataz (AP) gibi elektrokimyasal aktif maddeler, amperometrik biyosensörlerde işaretleyici olarak kullanılabilir (Martin, 2001). Bir elektrokimyasal reaksiyonda birçok analit (protein) redoks çifti olarak davranmadığından direkt duyarlılık için mevcut olan yalnız birkaç uygulama vardır. Bu yüzden, elektrokimyasal olarak aktif olan işaretleyicilerin (direkt olarak ya da bir enzim reaksiyonu ile olan) elektrot duyarlılığı için, analitin elektrokimyasal reaksiyonuna ihtiyaç vardır. Oksijen ve H_2O_2 elektrotlar en popüler olanlarıdır. İlk olarak 1956’da Clark tarafından tanımlanan bir oksijen elektrot, -0.7 V’da polarize olmuş olan, elektrolit bulunan bir çemberle, duyarlı Pt katodun ve bir Ag/AgCl referans elektrotun birleştirilmesinden oluşmuştur. Gaz geçirgen çember, O_2 geçirgen bir membranla çevrilidir.

Muhtemel katodik reaksiyonlar aşağıdaki gibidir (Luppa vd, 2001);

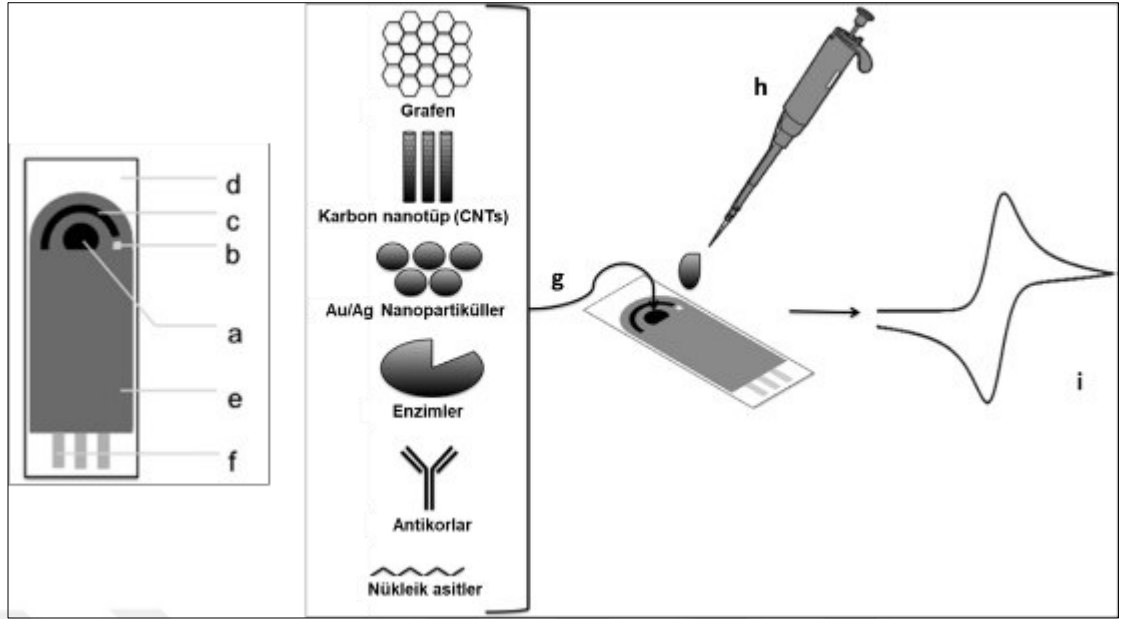


Anodik reaksiyonlar;



Bütün biyosensörler içerisinde üzerinde en çok çalışılan amperometrik glikoz sensördür. Benzer olarak amperometrik yaklaşım, hastalıkların belirlenmesi ve teşhisi için antijenlerin ve nükleik asitlerin tayininde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Amperometrik iletimin muhtemel sınırlaması, bazen yanlış okumalara sebep olabilen elektro aktif bileşenlerden kaynaklanan girişim etkileridir. Bununla beraber, bu problemler, farklı polimerlerle kaplı elektrotların kullanılmasıyla büyük oranda bertaraf edilebilir (Parkinson ve Pejic, 2005).

Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan elektrotlar genellikle teflon gibi bir malzemenin içine, bir bağlantı teliyle yerleştirilmiş olan inert bir malzemeden yapılmış çubuğa preslenerek tutturulmuş küçük iletken disklerdir. İletken disk şeklindeki bu malzeme, platin ya da altın gibi inert bir malzeme, prolitik ya da camsi karbon, kalay oksit ya da indiyum oksit gibi bir yarı iletken veya bir cıva filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Cıva elektrotları, elektrokimyasal ölçümlerde en yaygın kullanılan elektrotlardır (Skoog vd, 2004). Son zamanlarda, özellikle 1990 yılından sonra, dikkat çeken elektrot materyali olarak *Screen Printed Elektrot* (SPE) mikro-elektronik sensör teknolojisine adapte olmaya başlamıştır. Seri üretime uygun olması, mükemmel stabilite sağlaması, yüksek tekrarlanabilirlik gibi üstünlüklerinden öte, hassas bir şekilde yüzey kaplama imkânı sunması bu teknolojinin yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Şekil 2.4’de görüldüğü gibi bir SPE, (a) bir çalışma elektrotu, (b), bir referans elektrot, (c) bir karşıt elektrot (d) inert bir katı kase, (e) inert bir yalıtım tabakası ve belirtilen üç elektrot ile bağlantılı iletken yolları içermektedir. SPE’ler genellikle 3x1x0,05 cm boyutlarında üretilebilirken 20-100 µM, mikro hacimli örneklerle çalışma imkânı sunabilmektedir. 3’lü elektrot sisteminin kompakt bir sistem olarak sunulması, küçük boyutlarda seri bir şekilde üretilebilir ve küçük hacimlerle çalışılabilir olması, SPE’lere birçok bileşen ve sistemle entegre çalışmasında üstün bir özellik ve işlevsellik sağlamaktadır.



Şekil 2.4. Screen Printed Elektrot ve Bileşenleri (Counto vd, 2016).

SPE’lerin çalışma elektrotu bölgesinin bir çok farklı nanopartikülle ve birçok materyalle (grafen, karbon nano-tüp, altın ve gümüş nano partikül) modifiye edilmeye uygun olması, sağladığı avantajların bir başka yönüdür. Bu sayede, elektrokimyasal ölçümlerde sık kullanılan (klasik camı karbon elektrotlarda yaşanan biriktirme ve polarizasyondan dolayı gerekli olan) ön şartlandırma işlemine gerek kalmadan mükemmel bir analiz ortamı sağlanmaktadır.

Karbon malzemeler, kolay yenilenebilir yüzey, düşük akım değerleri, geniş potansiyel aralığı gibi özelliklerinden dolayı SPE’lerin yapımında en çok tercih edilen malzemelerdir. Bunun yanında nispeten ucuz, kimyasal olarak inert ve çok yönlü olmalarından dolayı da kullanıldığı sisteme birçok avantaj sağlar. Karbon temelli SPE’ler (SPCE), herhangi bir modifikasyona ihtiyaç duymaksızın “*bare form*” uygulamalarda kullanılabilirken, grafen, grafit veya karbon nanotüpler ile modifiye edilerek de kullanılabilir. Sunulan bu tez çalışmasında da, bir SPCE elektrot, karbon nano tüp (CNT) ile modifiye edilerek kullanılmıştır (Counto vd, 2016). Diğer taraftan, piyasada, hem modifiye edilmemiş, hem de belirtilen türlerle modifiye edilerek satılan SPE’ler mevcut olup, ihtiyaca uygun olarak temin edilebilmektedir (Anonymous, 2021).

Nanopartiküller (NP’ler), biyosensörlerin analitik performansını geliştirmek için güçlü ve yaygın bir uygulama malzemesi olarak ortaya çıkmıştır. Çapları, 1-100 nm olduğundan, bu nanopartiküller, hızlı tanı testleri için amaçlanan biyosensörlerin

geliştirilmesinde ve tasarımında yeni ve büyük bir yapısal edinim sağlamıştır. Nano seviyedeki malzemeler, sadece elektrokimyasal reaksiyonları iletirmek için elektrot yüzeyine enzimlerin doğrudan bağlanmasını sağlamakla kalmayıp, biyo-tanıma olayının sinyal gücünü arttırmak için de yeni imkânlar sunmaktadır. Nano-partiküller, yüksek mekanik mukavemet, oksijen iyonu iletkenliği, biyo-uyumluluk ve biyolojik aktivitelerdeki muhafazası gibi benzersiz özelliklerinden dolayı da ilgi çekmektedir. Ayrıca, NP'ler, elektron transferinde bir artış ve enzimin yükleneceği elektro aktif yüzey alanının arttırılmasını da sağlamaktadırlar. Nano-partiküllerin bu özellikleri, biyosensörlerin, biyo-uyumlu, seçici, doğru ve minyatürizasyona uygunluk açısından gelişmiş bir performansla üretilmesini sağlamaktadır. Altın nano-partiküller (AuNPs), Karbon Nano Tüpler (CNT), karbon nano-fiberler, manyetik nano-partiküller, ve kuantum dotlar gibi farklı türdeki nano-malzemeler, biyosensörlerin seçicilik ve doğruluklarına önemli derecede katkı sağlayan benzersiz fiziksel, kimyasal, mekanik, manyetik ve optik özelliklerinden dolayı biyosensörlere uygulanabilmektedir. İlk olarak 1991'de ortaya çıkan, CNT'ler, güçlü elektro-katalitik aktivite ve minimum yüzey kirliliği sağlama kabiliyetlerinden dolayı, elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılabilmektedir (Pundir vd, 2018). Karbonun bir allotropu olan grafenin (grafitin tek bir tabakası) silindirik olarak rulolanmasıyla oluşan karbon nano tüpler, karbonun bir diğer allotropu olup tek katmanlı "*Single-Wall CNT = SWCNT*" ve çok katmanlı "*Multi-Wall CNT = MWCNT*" olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Karbon nano tüplerin geniş yüzey alanları, bu nano-malzemeye yüksek bir elektrik, kimyasal ve mekanik özellik kazandırarak elektrokimyasal sensörler için son derece ilgi çeken malzeme olarak kendini gösterir.

SPE'lerin yüzeyi, belirtilen bu nano malzemeler yanında, elektrokimyasal sistemlerin seçiciliği sağlayan polimerler, şift bazları, biyo moleküller gibi geniş yelpazedeki substratların modifikasyonu için de imkân sağlar. Çalışma elektrotu yüzeyine bir biyomolekülün immobilizasyonu durumunda, biyosensörün analit olarak spesifik olan kısmı, sistemin algılama elemanı olarak görev yapar. Yukarıda da belirtilen birçok enzimin, antikorun, nükleik asidin, SPE ile birlikte kullanılmasıyla enzim sensörler, immünosensörler ve genosensörler elde edilir. Bu biyo moleküller SPE yüzeyine, adsorpsiyon, hapsetme, mikrokapsülleme (fiziksel

bağlama yöntemleri) ,çapraz bağlanma ve kovalent bağlama (kimyasal bağ yöntemleri) gibi farklı yöntemlerle tutturulabilir (Counto vd, 2016).

Bir biyo molekül olarak enzim ele alınacak olursa, enzimin yüzeye tutturulmasında, fiziksel adsorpsiyon, kapsüllere, hapsetme yöntemleri kolay olmakla birlikte, elektrot yüzeyiyle enzim arasındaki bağlanma nispeten zayıf olup enzim kaçaklarına da neden olmaktadır. Kimyasal yöntemler nispeten zordur ancak elektrot yüzeyi ve enzim arasında kovalent bağlanma gerçekleştiğinden, fiziksel yöntemlere göre daha yüksek bir enzim immobilizasyonu sağlanabilir. Kitin türeviden olan kitosan [(1→4) -2 amino-deoksi-β-D-glukan] lineer bir hidrofilik polisakkarid olup biyo uyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve toksik olmayan yapısından dolayı mükemmel bir film tabakası oluşturur. Böylece biyosensörlerin geliştirilmesinde tercih edilen önemli bir biyopolimer olarak rol alır. Ayrıca kitosan, yapısında bol miktarda bulunan -NH₂ ve -OH gruplarından dolayı bir modifikasyon bileşeni olarak da kullanılmakta, bütün bu karakteristik özelliklerinden dolayı da kovalent enzim immobilizasyonunda yüzey bileşeni olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber, kitosanın düşük iletkenliği, elektronik sinyallerin transdusere iletiminde, problem oluşturabilmekte, bu da bileşiminde kitosan kullanılan biyosensörlerin performansını düşürebilmektedir (Susanto vd, 2013)

Enzim biyosensörlerin geliştirilmesinde, elektrot ve enzimin aktif bölgesi arasında, daha hızlı bir elektron transferini tetikleme özelliğine sahip olduğu bilinen ferrosen, mükemmel elektrokimyasal davranışından dolayı enzim biyosensörlerde en çok kullanılan organometalik bir bileşiktir. Ferrosen iki adet siklopentadienil grubunun oluşturduğu bir bileşik olup, bu bileşikte demir, +2 yükseltgenme basamağında bulunur (Fan vd, 2012). “Ferrosen → Ferrisin⁺” tersinir redox davranışı sayesinde, yüksek elektron sunma kapasitesine sahip mükemmel bir elektron mediatörü olup, hızlı elektron taşıma oranı ve iki aşamalı redox stabilitesi diğer önemli elektrokimyasal özellikleridir. Bu özelliklerinden dolayı, ferrosen yüksek duyarlılıktaki biyosensörlerin geliştirilmesinde tercih edilmektedir (Li vd, 2019).

2.2.3. Elektrokimyasal Aminoasit Biyosensör Geliştirilmesine Yönelik Literatür Özetleri

Sun vd (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, glikoz tayinine yönelik amperometrik bir biyosensörün geliştirilmesi ve geliştirilen biyosensörün iyontoforez işlemi için de kullanılması hedeflenmiştir. Çalışmada, çok katmanlı karbon nano tüp (MWCNT), screen printed elektot (SPE) ve glikoz oksidaz (GOD) birlikte kullanılarak amperometrik glikoz biyosensör geliştirilmiştir. MWCTN'nin, GOD ve transduser yüzeyi arasındaki elektron transferinin daha hızlı olması ve enzimin epoksi karışımının içerisine daha iyi dahil olması için kullanıldığı belirtilmiştir. Sonuçlar bu biyosensörün, iyi bir duyarlılık ($4\mu\text{A}/\text{mM}$) ve glikoz tayininde 500 mV 'de (Ag/AgCl 'ye karşı) mükemmel bir lineer çalışma aralığına ($R^2 = 0.999$; $0-4\text{ mM}$) sahip olduğunu göstermiştir. Biyosensörün cevap zamanı 25 saniye olarak belirtilmiştir. İlâveten, geliştirilen bu biyosensör ters iyontoforez tekniği ile birlikte kullanılmıştır. Geliştirilen iyontoforez sisteminde kullanılan belli derişimdeki glikoz konsantrasyonuyla, biyosensörün verdiği cevap arasında lineer ilişki ($R^2=0.986$) bulunmuştur.

Sarkar vd, (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, L ve D-amino asitlerin genel tayini amacına yönelik L ve D-aminoasit oksidaz enzimiyle entegre edilmiş bir screen printed amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Çalışma elektrotunun, hidrojen peroksitin yükseltgenmesini kolaylaştırmak için rodonize edilmiş karbon içerdiği belirtilmiştir. Geliştirilen biyosensör, L ve D-prolin dışındaki, yaygın 20 adet L-aminoasitin tümüne ve bütün D-aminoasitlere cevap vermekte, L-lösin, L-glisin, L-fenilalanin için lineer cevaplar sunmaktadır. Geliştirilen D-aminoasit biyosensör, $0,47-2,5\text{ mM}$ lineer çalışma aralığına sahip olup tayin limiti $0,47\text{ mM}$ olarak belirtilmiştir. Biyosensör, tekrar kullanılabilir özellikte olup 56 günlük test periyodunda stabilite göstermektedir.

Weislo vd, (2007) tarafından yapılan çalışmada, D-aminoasitlerin tayini için Prusya mavisini ve nasyon katmanları ile modifiye edilmiş screen printed amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör, $50-200\text{ }\mu\text{M}$ lineer çalışma aralığına sahip olup tayin limiti $30\text{ }\mu\text{M}$ olarak belirtilmiştir. Enzimin enantiyo seçiciliği sayesinde, meyve suyu ve süt örneklerinde D-alanin ve diğer birkaç D-aminoaside karşı seçici yanıtlar alınmıştır.

Pundir vd, (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, aminoasitlerin tayini için farklı enzim esaslı elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensörlerde, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve kovalent gibi birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmalarla, enzim immobilizasyonundaki enzim aktivitesi kaybı, stabilitenin korunması, raf ömrü gibi birçok problem çözüme kavuşturulmuştur. Yapılan çalışmada, grafit elektrot, hidroksietil selüloz, amber enzimiksiran gibi çeşitli destek materyali esasına dayalı elektrokimyasal D-aminoasit biyosensörlerin performans özellikleri karşılaştırılmıştır. Özetle bu biyosensörlerin optimum şartlarda; 40-900 sn içinde, pH: 6,5 -9,5 ve 25-44 °C' sıcaklık aralığında, en düşük $0,8 \times 10^4 \mu\text{M}$ – en yüksek $1,46 \times 10^4 \mu\text{M}$ tayin limitine sahip, 0,3 -1250 μM D-aminoasit konsantrasyonu aralığında ve 3-120 gün periyodunda bir stabilite ile çalıştığı ortaya konmuştur.

Lata ve Pundir (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, bir nikel hekzasiyanoferrat polipirol film, iki aşamalı olarak elektrokimyasal bir yöntem ile sentezlenmiştir. Camı karbon elektrot yüzeyine biriktirilen bu film üzerine D-aminoasit oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yüksek duyarlılıkta amperometrik D-aminoasit biyosensör geliştirilmiştir. Bu elektrot, taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Biyosensör, 0,01 M Tris-HCl tampon çözelti içerisinde, 30°C'de ve pH:7.0'de ve 50 mV s^{-1} uygulandığı şartlarda 1s içinde optimum cevap sergilemiştir. Biyosensör, 20 – 500 μM geniş lineer aralıkta ve D- aminoasit için 1,5 μM (S/N = 3) tayin limitinde performans sergilemiştir. Geliştirilen enzim elektrot, iki ay boyunca 50 test için kullanılmıştır.

Moreno-Guzmán vd (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, aminoasitlerin bakteri örneklerinde tayin edilmesine yönelik geliştirilmiş bir bi-enzimatik biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, amperometri tekniği, screen printed karbon elektrot (SPCE), karbon nano tüp (CNT) ve D-aminoasit oksidaz enziminin bir arada kullanıldığı için detaylı incelenmiştir.

Bu çalışmada, bu yöntemlere alternatif olabilecek, ilgili biyolojik örnek içerisindeki toplam D-aminoasit içeriğini belirlemeye yönelik taşınabilir, hızlı ve güvenilir bir bi-enzimatik biyosensörün geliştirilmesi tanımlanmıştır. Biyosensörün geliştirilmesinde, D-amino asit oksidaz ve HRP enzimleri, MWCNT ve Altın Nano-Partikül (AuNP) ile modifiye edilmiş olan SPCE yüzeyine birlikte immobilize edilmiştir. Çalışmada ayrıca, 0,1 M Fosfat tamponu kullanıldığı belirtilmiştir.

Elektrot olarak, Dropsens Screen Printed Karbon Elektrot (SPCE) (4mm çap), gümüş referans elektrot, karbon karşıt elektrot kullanılmıştır.

Bi-enzim sensörün hazırlanmasında, 10 L (0,5 mg /1,5 mL, %3'lk NH₄OH zeltisi) MWCNT yzeeye damlatılarak SPCE'nin yüzeyi modifiye edilmiş ve kurutulmuştur. Sonrasında yüzey, 10 L, 100 mM EDC/Sulfo-NHS zeltisi ile 30 dakika boyunca muamele edilerek, karboksilik grupların aktivasyonu sağlanmıştır. Yüzey, MES (2-(N-morfolin) etansülfonik asit) tamponu (0,025 M, pH:5.00) ile yıkandıktan sonra, AuNP'nin 10 L'si elektrot yüzeyine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Sonra, HRP (4mg/mL) ve D-aminoasit oksidaz (DAAO) (0,25 mg/mL) karışımının 10 L'si elektrot yüzeyine damlatılmış ve 60 dakika boyunca kurutulmuştur.

Farklı karışım ve konsantrasyondaki aminoasitler, 0,05 M, pH:7.00 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. 5 L, 1mM HQ eklendikten sonra, amperometrik olarak ölçümün alınması için, SPCE yüzeyine, 45L damlatılarak, -0,2V'de ölçüm alınmıştır. DAA'lerin tayinine yönelik bi-enzimatik bir biyosensörün geliştirilmesi için, SPCE yüzeyine HRP ve DAAO enziminin immobilizasyonu farklı kimyasallar ve nano-malzemeler kullanılarak (7 farklı strateji) değerlendirilmiştir;

1. DAAO –HRP'nin SPCE yüzeyine fiziksel adsorpsiyonu
2. Öncelikle AuNP'nin SPCE yüzeyine kaplanması ve sonrasında bu yzeeye DAAO-HRP'nin fiziksel adsorpsiyonu
3. SPCE yüzeyinin MWCNT ile modifiye edildikten sonra yzeeye DAAO-HRP'nin fiziksel adsorpsiyonu
4. MWCNT/SPCE yüzeyinde karboksilik grupların aktive edilmesi sonrasında, DAAO-HRP'nin bu yzeeye kovalent bağlanması
5. AuNP/MWCNT/SPCE yüzeyine, DAAO-HRP'nin fiziksel adsorpsiyonu
6. SPCE yüzeyine, AuNP/MWCNT kaplandıktan sonra DAAO-HRP'nin kovalent bağlanması ve devamında karboksil grupların aktivasyonu
7. MWCNT'nin yzeeye kaplandıktan sonra, DAAO-HRP'nin kovalent bağlanması ve AuNP'nin yzeeye kaplanması ve karboksil grupların aktivasyonu

Yukarıdaki her bir durumda, iki enzimin de spesifik aktivitesi, 1 mM D-valin eklenerek değerlendirilmiş ve D-valinin olmadığı ortamdan elde edilen sinyal ile karşılaştırılmıştır. MWCNT ve AuNP ile modifiye edilen elektrotlardan elde edilen

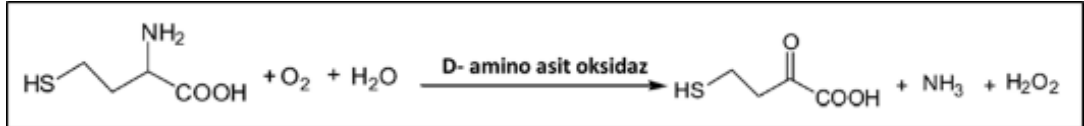
akımın şiddeti en yüksektir (strateji 5, 6, 7). En büyük yoğunluktaki akım değeri, MWCNT/SPCE yüzeyinde karboksilik gruplarının aktive edilmesinden sonra yüzeye AuNP'nin yüklendiği (strateji 7) olan elektrotta gözlenmiştir. Opsiyonların tamamının çalışılması sonrasında, optimum elektrot bileşenini oluşturmak amacıyla, enzim konsantrasyonu, pH aktivasyonu, mediatör şartları ve elektrokimyasal tayin şartlarını kapsayan, optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak, her iki enzim konsantrasyonu çalışılmıştır. DAAO enzim konsantrasyonu, 1 mg/mL'de sabit tutulurken, farklı HRP konsantrasyonları çalışılmıştır. 4mg/mL yüksek HRP konsantrasyonu olduğunda, sinyal artmıştır. Daha sonra, 4 mg/mL sabit HRP konsantrasyonu kullanıldığında, 0,25 mg/mL'ye kadar daha büyük sinyal üreten DAAO'nin konsantrasyonu, bir plato oluşturmuştur. Sonuç olarak 4 mg/mL HRP ve 0,25 mg/mL DAAO ileri denemler için seçilmiştir. İkinci olarak, kullanılan biyoenzimatik biyosensör konfigürasyonunda, katalitik HRP enzimi yükseltgenme bölgesi ve nano-malzeme ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyi arasındaki elektriksel iletişimi sağlamak için, bir elektrokimyasal mediatöre ihtiyaç duyulmuştur. HQ konsantrasyonunun etkisi, 1 mM D-valin kullanılarak, 0-2 mM aralığında çalışılmıştır. Katodik akım, 1 mM'a kadar yüksek HQ konsantrasyonunda artmış ve bu değerler ileri deneylerde kullanılmıştır. pH:5,00 -8,00 arasındaki değerlerde, 0,05 M fosfat tampon kullanılarak, karşılaştırma çalışması yapılmıştır. Akım sinyalleri, pH: 7,00'a kadar olan değerde, neredeyse bir plato eğrisine ulaşıldığı yerde artmıştır. pH: 7,0 değeri, yeterli sinyal elde edildiği için ve HQ'nun yüksek pH değerlerinde kolaylıkla yükseltgenme durumundan sakınmak için uygun değer olarak seçilmiştir. Biyosensörün optimizasyonu için, bir sonraki adımda, amperometrik ölçümler için potansiyel uygulamaları, 0,05 M fosfat tampon içerisine 1 mM valin ve 1mM HQ eklenerek, 0 ile -0,3 V arasındaki potansiyel aralığında çalışılmıştır; Sinyal, en büyük negatif potansiyel için sabit tutulan -0,2 V'ye kadar artmıştır. Ayrıca, hidrodinamik voltogramlar, 0,0 - (-) 0,3 V aralığında, SPCE/MWCNT-AuNP elektrotlar için kaydedildiğinde, 1 mM H₂O₂ için -0,3 V değerine kadar herhangi bir sinyal elde edilememiştir.

Optimize edilen çalışma şartları altında, D-valin için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. 0,020 -2,0 mM aralığında çok iyi bir doğrusallık ($R^2 = 0,994$) elde edilmiştir. Ayrıca, $(4,9 - 0,2) \times 10^2$ nA/mM duyarlılık ve tayin limiti (18 μ M) başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Tayin limiti, 3 sb/m kriterine göre hesaplanmıştır.

Bi-enzimatik biyosensörün stabilitesi test edilmiş, biyosensörün stabilitesi, 8. günün sonunda sinyalde %14'lük bir azalma olmakla birlikte, 5. güne kadar, kontrol limitleri içerisinde korunmuştur. Geliştirilen bu bi-enzimatik biyosensör, çok iyi bir karakteristik sağladığından, bakterilerde, gerçek biyolojik örneklerle alakalı DAA içeriğinin analiz edilmesinde kullanılmış, bakteri kültürlerindeki DAA içeriğinin 1 mM civarında olduğu tayin edilebilmiştir.

Zhang vd (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, insan kanında homosisteinin izlenmesi için düşük maliyetli ve basit bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu biyosensör, bir oksijen elektrot ve D-aminoasit oksidaz enziminin yumurta kabuğu membranına immobilize edilmesi ile yapılmıştır. Enzim miktarı, gluter aldehit konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, sıcaklık gibi parametrelerin biyosensör cevabına olan etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ölçüm metodu, çözeltide, çözünmüş oksijen seviyesindeki azalmanın izlenmesi esasına dayanmaktadır. Doğrusal çalışma aralığı 0.05 – 1,5 mM ve tayin limiti 30 µM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör, 1 dakikadan daha kısa bir cevap zamanına, iyi bir tekrarlanabilirliğe (n = 6, bağıl standart sapma = 2, %38) ve uzun süreli stabiliteye (2 aydan sonra duyarlılık seviyesi; % 85) sahiptir.

Böyle bir biyosensör sisteminde, homosistein molekülünün aminoasit oksidaz tarafından enzimatik oksidasyonu aşağıda belirtildiği şekildedir.



2.3. İyontoforez ve Ters İyontoforez Tekniği

İyontoforez tekniği deriye küçük ve tanımlı bir akımın uygulanmasını gerektirmektedir. Elektrik akımı kullanılarak deri üzerinden ilaç salınımı sağlamakta kullanılan İyontoforez tekniği ilk olarak 1747 tarihinde Pivati (Gazelius, 1999) tarafından tanımlanmış, ancak teknolojinin temel mekanizmaları Leduc tarafından 1900'li yıllarda (Leboulanger vd, 2004a) açık bir şekilde ortaya konulabilmiştir. Günümüzde tıp alanında özellikle deri yüzeyinden ilaç salınımı konusunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu teknolojinin, ilaç salınımı gibi uygulama alanlarına ait sistemleri ancak son 10 yıl içerisinde pazarda yer alabilmiştir.

İyontoforez yöntemi ile deri üzerinden deri altına istenilen maddeler gönderilebildiği gibi, deri altından da (hücreler arası sıvısı) kandaki bileşenlerin

elektrik akımı yardımı ile deri dışına çıkarılması sağlanabilmektedir. Bu şekilde uygulanan metot ise “ters iyontoforez” olarak tanımlanmaktadır. Ters iyontoforez yönteminde, uygulanan akım ile deri dışına ekstrakte olması istenen bileşen hareketi arasında lineer bir ilişkinin olması beklenmektedir (Değim vd, 2003)

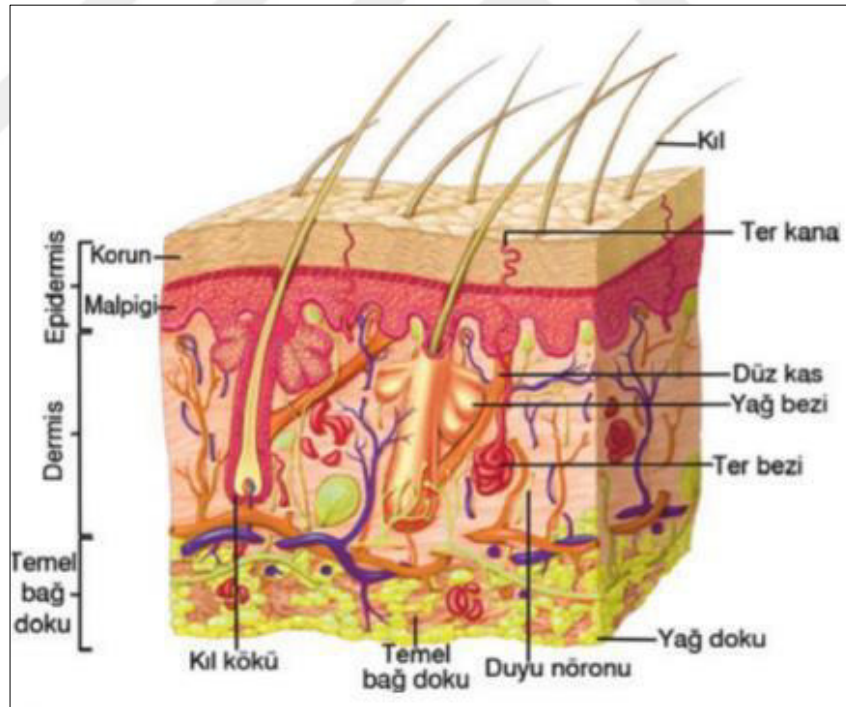
Ters iyontoforez yoluyla deriden herhangi bir maddenin (yükü veya nötral türler) girişimsel olmayan (non-invaziv) bir şekilde alınarak ekstrakte edilmesi ve ekstrakte edilen bu türlerin tayin edilmesi, disiplinler arası (malzeme teknolojileri, elektrokimya, biyosensör teknolojisi, klinik kimya, elektronik vb.) bir bilgi birikimi gerektirmektedir. Literatürde, glikozun ve ürenin ters iyontoforez uygulanarak deri dışına alınmasına yönelik çalışmalar çoğunluktadır. Yapılan bir çalışmada, kandaki glikoz ters iyontoforez yöntemi ile deri dışına alınarak buradaki miktarı tespit edilmiş ve aynı zamanda bu teknik ticari bir ürün haline getirilerek diyabet hastalığının teşhisinde kullanılmıştır. Ters iyontoforez yönteminin kullanıldığı sistemlerden birisi *GlucoWatch®* cihazı olup diyabet hastalığının izlenmesinde kullanılmaktadır (Sieg vd, 2004; Sieg vd, 2003). Bu sistemde kandaki glikoz, ters iyontoforez yöntemi ile deri dışına alınarak miktarı tespit edilmiştir.

2.3.1. İyontoforez Ortamı Olarak Derinin Yapısının İncelenmesi

Deriden moleküler taşınımın istenilen seviyede yapılabilmesi, derinin yapısal özellikleri ile yakından ilgilidir (Şekil 2.5.). Deri, derialtı (hiopdermis), dermis ve epidermis olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Derialtı (hiopdermis) tabakası, büyük miktarda yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşmaktadır. Kollajenler yoluyla derinin esnekliğini sağlamaktadır. Dermis tabakası, deri altı tabakasına göre nispeten daha az yağ hücresi içermekte olup ana bileşeni kollajen ve kalınlığı 1-4 mm arasında değişmektedir. Epidermis tabakası, derinin en dış tabakası olup kan damarı ve lenfatik sistem içermez. Bulunduğu bölgeye göre kalınlığı 150-180 µm arasında değişmektedir. Morfolojik ve hücre fonksiyonları dikkate alınarak beş farklı tabakaya ayrılmıştır (Anonim,2017).

- **Bazal Tabaka (*Stratum Germinativum*):** Epidermisin en derin tabakası olup diğer tabakalara göre daha hızlı bölünebilen ve çoğalabilen hücreleri (şekilleri yuvarlak ve yumurta şeklinde) içerir. Bu hücreler deri yüzeyine doğru ilerleyerek diğer tabakaları oluşturacak şekilde yer değiştirir.

- *Diken, Sivri Uç Tabakası (Stratum Spinosum)*: Bazal tabaka hücreleri, bu tabakaya çıktıkça, şekilleri daha da yuvarlak hale gelir. Bu tabakadaki hücreler komşu hücreler ile bağlantı yapıları olarak görev almaktır.
- *Granüler Tabaka (Stratum Granulosum)*: Bu tabaka canlı epiderminin en dış tabakasıdır. Bu tabakada üç ila beş hücre kalınlığında düzleşmiş hücreler bulunur. Bu haliyle hidrofilik maddelerin difüzyonu için önemli bir bariyer değildir.
- *Stratum Lucidum*: Bu tabaka sadece derinin çok kalın olduğu ayak tabanı ve avuç içi gibi bölgelerde bulunur.
- *Boynuzsu Tabaka (Stratum korneum)*: Epiderminin en dış tabakası olup kalınlığı 6-15 μm aralığındadır. Bu tabaka, 15-25 kat ölü, yassılaştırmış ve tamamen keratinize olmuş olan korneositleri içerir ve bu korneositler, keratinositlerden oluşmuştur. Stratum korneumun % 40'ı protein ve bunun da % 80'i fibröz (lifsi) protein olan keratindir (40.000-68.000 dalton boyutlarında α -heliks polipeptit yapısında bir molekül).



Şekil 2.5. Deri tabakalarının gösterimi (Anonim, 2017)

Boynuzsu tabaka deriden geçişlerde ana bariyer tabakası olarak gösterilmektedir. Bu ölü tabaka, maddelerin deriden geçişlerinde meydana gelen difüzyonu sınırlayıcı etki göstermektedir. Bu tabaka, bu geçişlerde hidrofobik bir

membran gibi davranır. Boynuzsu tabakanın olmadığı epidermis tabakasının çok düşük bir bariyer özelliği olduğu saptanmıştır.

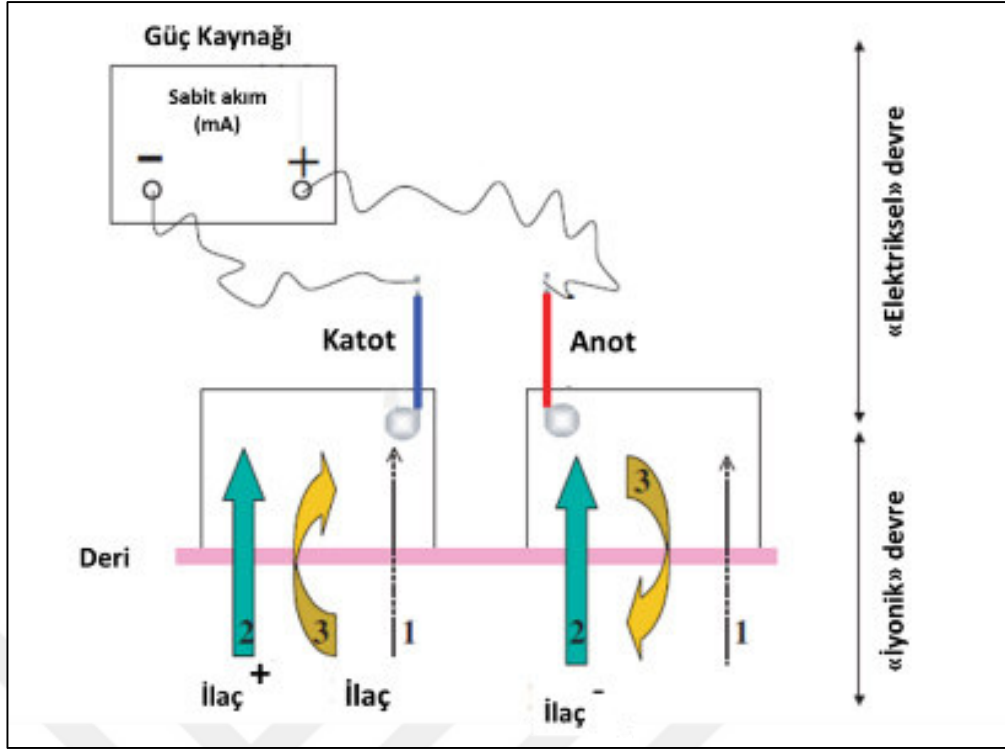
2.3.2. Ters İyontoforezde Etkili Olan Taşınım Mekanizmaları

Deri, fizyolojik pH da negatif yüklüdür (Potts vd, 2002; Connolly vd, 2002; Leboulanger vd, 2004b). Derinin bu özelliği iyontoforez ve ters iyontoforez gibi teknikler kullanılarak çeşitli maddelerin deri altına ve deri dışına taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. İyontoforez tekniklerinin uygulanmasında etkin olan taşınım mekanizmalarının iyi anlaşılması, giyilebilir cihaz ve sensör geliştirme teknolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır. Ters iyontoforez, derialtı tabaka içerisinden deri yüzeyine, çözünen moleküllerin ekstraksiyonuna imkân veren bir sistemdir. Deriden moleküllerin ekstraksiyon mekanizması, elektro-göç, elektro-osmoz ve bunların her ikisini birden de içerebilmektedir.

Deriden moleküllerin ekstraksiyonu, yüklü türlerin, ters işaretli olan elektrotlara elektro-göçü ve polar, nötral moleküllerin katoda olan elektroosmoz mekanizmaları sayesinde olmaktadır.

2.3.2.1. Elektro-göç

İyontoforez işleminde, sabit bir akım uygulanır. Bu sayede oluşan elektron akışı, deri boyunca bir iyon akışına (flux) dönüştürülür. Şekil-2.6’ da bir güç kaynağı, sistemin elektriksel devre kısmında, elektronların göçü için bir manyetik alan oluşturur. Benzer şekilde iyonik devre kısmında ise, bu manyetik alan iyon akışının oluşturulması sağlamaktadır. Devrenin elektriksel kısmı boyunca akan elektronların miktarı, deri boyunca akan iyonik yüklerin miktarıyla tam olarak dengelenir. Bir diğer ifadeyle, deri boyunca akan mevcut iyonik yüklerin toplamı, güç kaynağından gönderilen elektronların sayısına eşit olmalıdır. Sonuç olarak yük taşımada yer alan bütün iyonlar arasında, bir “rekabet” vardır. Şekil 2.6’ da görüldüğü gibi, güç kaynağı, anoda ve katoda akım gönderir. Katyonik ve nötral maddeler, elektro-göç, elektro-osmoz ve pasif difüzyon (genel olarak ihmal edilebilir düzeyde) yoluyla katoda doğru sürüklenir (Şekil 2.6’ de bu mekanizmalar sırasıyla 2, 3 ve 1 numaralı olarak gösterilmiştir). Anyonik türler, iletici çözücü akışına (3) karşı koymaya çalışarak, elektro-göç (2) yoluyla anot haznesine doğru çekilirler. Pasif difüzyon (1) yine ihmal edilebilir düzeydedir.



Şekil 2.6. Ters İyontoforezin deneysel bir kurguda gösterilen şematik diyagramı.

İyontoforez işlemi yoluyla gerçekleşen ekstraksiyon, iyontoforez zamanı, ilgili iyonların taşınım numarası ve yükü, akım yoğunluğu gibi parametreler ile belirlenir. Akım yoğunluğu (I), direkt ve kolay bir şekilde güç kaynağı yoluyla kontrol edilebilir. Fakat, akım yoğunluğu in vivo (canlı) amaçlı pratik uygulamalar için sınırlı olup $0,5 \text{ mA/cm}^2$ 'den daha fazla olamaz. Her bir ekstraksiyon periyodunun süresi, tayin için gerekli olan yeterli analit miktarının sağlanabilmesine yetecek kadar uzun olmalıdır. Bununla birlikte vücutta klinik olarak önemli bir değişiklik meydana getirebilecek kadar da uzun olmamalıdır. Her halükarda, ters iyontoforezin, örnekleme periyodu boyunca, vücutta sadece ortalama bir analit seviyesinin tahmini sağlayabileceği bilinmelidir (Leboulanger vd, 2004a).

Taşınım numarası, deri boyunca yüklerin taşınmasına katkı sağlayan diğer iyonlara da bağlı olduğundan, teorik olarak tahmin edilmesi zordur. Bir membran boyunca bir elektrik alan oluşturulduğunda iyonlar, yüklerinin zorladığı doğrultuda göç edecektir. Bir iyonun göç hızı, iyonun fizikokimyasal özellikleri ve geçtiği ortamın özellikleri sayesinde belirlenebilmektedir. Aslında taşınım numarası, deri boyunca yükün taşınmasına katılan belirli bir iyonun ulaşılabilen miktarına yani konsantrasyona bağlıdır.

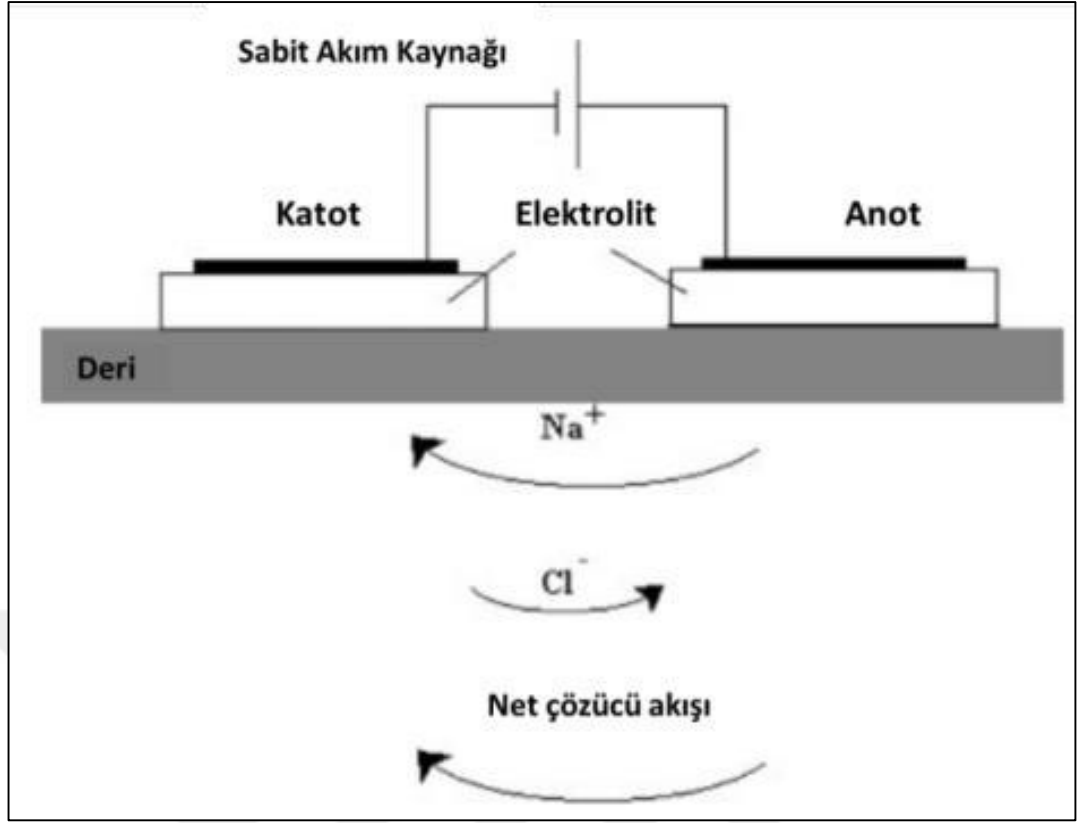
Elektro-göç işleminde, analitin sadece iyonize formu ekstrakte edilebilir ve bu ilgili pKa değerine bağlıdır. Benzer şekilde, proteinlere bağlı olan analitler için deri boyunca yük transferinin gerçekleşmesine sadece serbest gruplar yeterince katkı sağlayabilmektedir. Bir iyon, küçük, tam yüklü, yüksek konsantrasyonda ve yeterince protein bağlı değil ise, ana yük taşıyıcı olarak işlev gösterebilir.

2.3.2.2.Elektro-osmoz

Fizyolojik pH'da deri negatif yüklüdür ve katyonlar için seçici geçirgendir. Bu tip bir membran boyunca bir elektrik alan uygulandığında, anot içerisinde, katot yönünde tetiklenen bir elektro-osmotik çözücü akışı meydana gelir. Çözücünün bu akışı, nötral ve özellikle polar moleküllerin taşınmasını arttıran çözünmüş maddeleri de yanı sıra taşır. Elektro-osmoz bu şekilde katyonların taşınmasını güçlendirmektedir. Akım yoğunluğu, pH ve iyonik şiddet, elektro-osmoz modüle eden elektrot formülasyon parametreleridir. Derinin her iki alanında pH'ının değişiminden dolayı, membran üzerindeki yük ve bu sayede derinin seçici-geçirgenliği değişebilir.

Elektrotransportta her iki mekanizma da, uygulanan akıma bağlıdır. Bir iyonun boyutu arttığında, onun mobilitesi düşmekte ve elektro-göç daha zayıf kalmaktadır. Diğer bir ifadeyle küçük mobil iyonlar için elektro-göç temel mekanizma niteliğindedir. Nötral ve polar maddeler için, elektrotlar yoluyla elektro-göçün mümkün olmadığı durumlarda, elektro-osmoz daha baskındır. Katyonlar için bunun anlamı, artan moleküler boyut ile, elektro-göç yerine elektro-osmozun daha baskın hale gelmesidir (Leboulanger vd, 2004a).

Elektro-osmoz mekanizmasını daha iyi anlamak için glikozun ters iyontoforez ile deri dışına alınması örnek verilebilir; glikoz yüksüz bir molekül olduğundan, deri dışına taşınımı elektro-osmoz yoluyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.7). Deri, önceden de belirtildiği gibi fizyolojik pH' da negatif yük taşır ve bunun bir sonucu olarak deri boyunca taşınan yüklü türlerin büyük bir kısmı Na⁺ iyonudur.



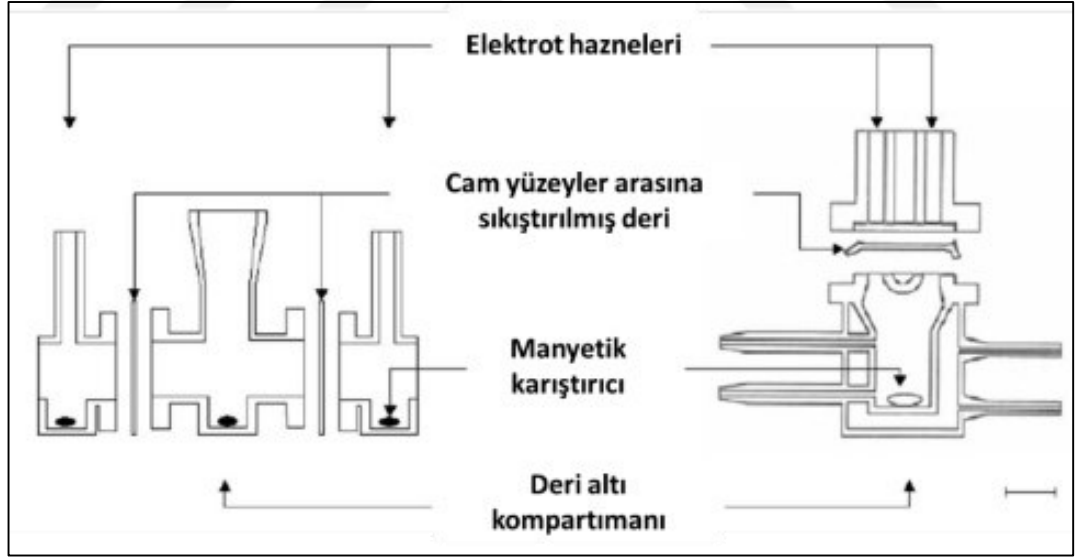
Şekil 2.7. Glikoz ekstraksiyonu için “Ters İyontoforez” prosesi (Potts vd, 2002)

Sodyum iyonlarının bu göçü, iletken bir çözücü akışı üretir. Bu çözücü akışı, glikoz gibi yüklü olmayan türlerin iyontoforezin gerçekleştiği sistemde katoda doğru taşınmasını sağlamaktadır (Potts vd, 2002).

2.3.3. Ters İyontoforez Teknolojisi İle İlgili Literatür Özeti

Bir ters iyontoforez/sensör cihazında yüklü olmayan moleküller çözücü akışından dolayı deriden, elektro-osmoz yoluyla ekstrakte edilebilir. Bunun yanı sıra ekstrakte olan bu moleküller, deriden sensör yüzeyine difüzyon mekanizmaları yoluyla da ulaşır. Bu difüzyon, uygun bir iletken hidrojel (hem iyontoforez elektrotlardan akım geçişi hem de deri ile teması sağlayan) içerisinde meydana gelmelidir. Bu sistemin bir cihaz formunda kullanılması durumunda (Glucowatch cihazı gibi), ters iyontoforez şartları altında, sensörün hidrojel içerisindeki davranışının karakterize edilmesini gerektirmektedir. Bu en iyi şekilde, in vivo (canlı) şartlarda deneme yapılmadan önce, in vitro (cansız) şartlarda bir model sistem üzerinde gerçekleştirilebilir. Literatürde, in vitro ortam şartlarında ters iyontoforezin optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının yapılabilmesine yönelik oldukça fazla çalışma mevcuttur. Bu amaca yönelik tasarlanan difüzyon

hücreleri (her he kadar tamamen ters iyontoforez tekniğine uygun olmasa da) daha çok deriden ilaç salınımı çalışmalarında kullanılan “Franz Tipi” difüzyon hücrelerinden esinlenerek tasarlanmıştır. Bir Franz Tipi difüzyon hücresi basit olarak, bir donör ve bir reseptör bölmesinden meydana gelmekte ve bu iki bölüm birbirinden bir membran ile ayrılmaktadır. Reseptör fazda bulunan maddenin konsantrasyonu (yani analit) membrandan difüze olan madde miktarının ölçülmesi yoluyla belirlenir. Franz tipi düfüzyon hücreleri dikey ya da yatay olarak, ya da her iki durumu içeren şekilde tasarlanabilir. Leboulanger vd, (2004b) tarafından yapılan çalışmada, in vitro denemelerde hem dikey difüzyon hücresinin hem de üç bölmeli yatay hücrenin kullanılabileceği, dikey hücrenin, tek bir deri altı konsantrasyonundaki denemelerde kullanıldığı, üçlü yanal hücrenin ise, deri altı bölmesi ve elektrot haznelerindeki çözeltilerin sık sık değiştirilmesini gerektiren denemelerde kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, uygun bir güç kaynağı kullanılarak iyontoforez elektrotları olarak Ag/AgCl elektrotlarının kullanıldığı da belirtilmiştir. Şekil 2.8’ de, bir anti-epileptik ilaç olan “fenitoinin derialtı tabakadaki konsantrasyonunun izlenmesine yönelik ters iyontoforez çalışmalarının yapılabilmesi için tasarlanmış dikey ve yanal difüzyon hücreleri verilmiştir.



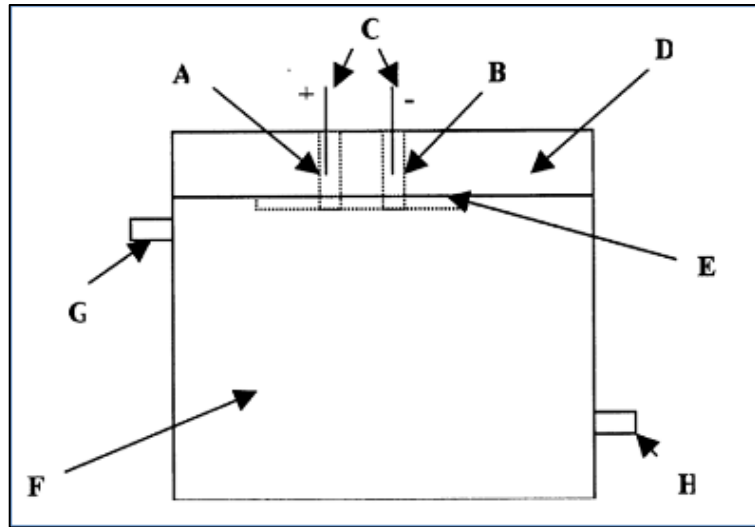
Şekil 2.8. İyontoforetik difüzyon hücreleri (Leboulanger vd, 2004b)

Şekil 2.8.’de sağ tarafta, yan yana üç bölmeli hücre (sol taraftaki) 1 cm² etkin deri yüzey alanına sahiptir. Deri altı bölmenin hacmi 3,5 mL ve bunların elektrot hazneleri 1,5 mL hacme sahiptir. Soldaki dikey hücre, 0,8 cm² etkin deri yüzey

alanına sahip olup deri altı bölmesinin hacmi 6,5 mL'dir. Elektrot haznelerinin hacmi ise 1 mL olacak şekilde tasarlanmıştır.

İn vitro sistemlerde cihazların ya da iyontoforez işlemine ait etkilerin test edilmesinde halihazırda insan ve hayvan dokuları kullanılmaya devam edilmektedir (Connolly vd, 2002). Bu durum, ters iyontoforez tekniğini kullanarak ve non-invaziv olarak hastaların izlenmesine yönelik sensör ve cihaz geliştirme çalışmalarında iki büyük problemi de beraberinde getirmektedir. Bu problemlerden ilki, bu gibi dokulara erişim problemidir. Birçok ülkede etik ve güvenlik nedenlerinden dolayı bu dokulara ulaşım sınırlıdır. İkincisi, yeni bir sensör ve ekstraksiyon sisteminin geliştirilmesi aşamasında, hayvan veya insan dokusu kullanılarak yapılan ters iyontoforez sürecinde, derideki maddelerin girişim yapması söz konusu olabilir. İn vitro denemelerde hayvan ve insan derisinin kullanılması durumunda dikkate alınması gereken bir diğer nokta, söz konusu derinin ölü hücrelerden dolayı, in vivo şartlardaki davranışını tamamiyle sergileyememe ihtimalidir.

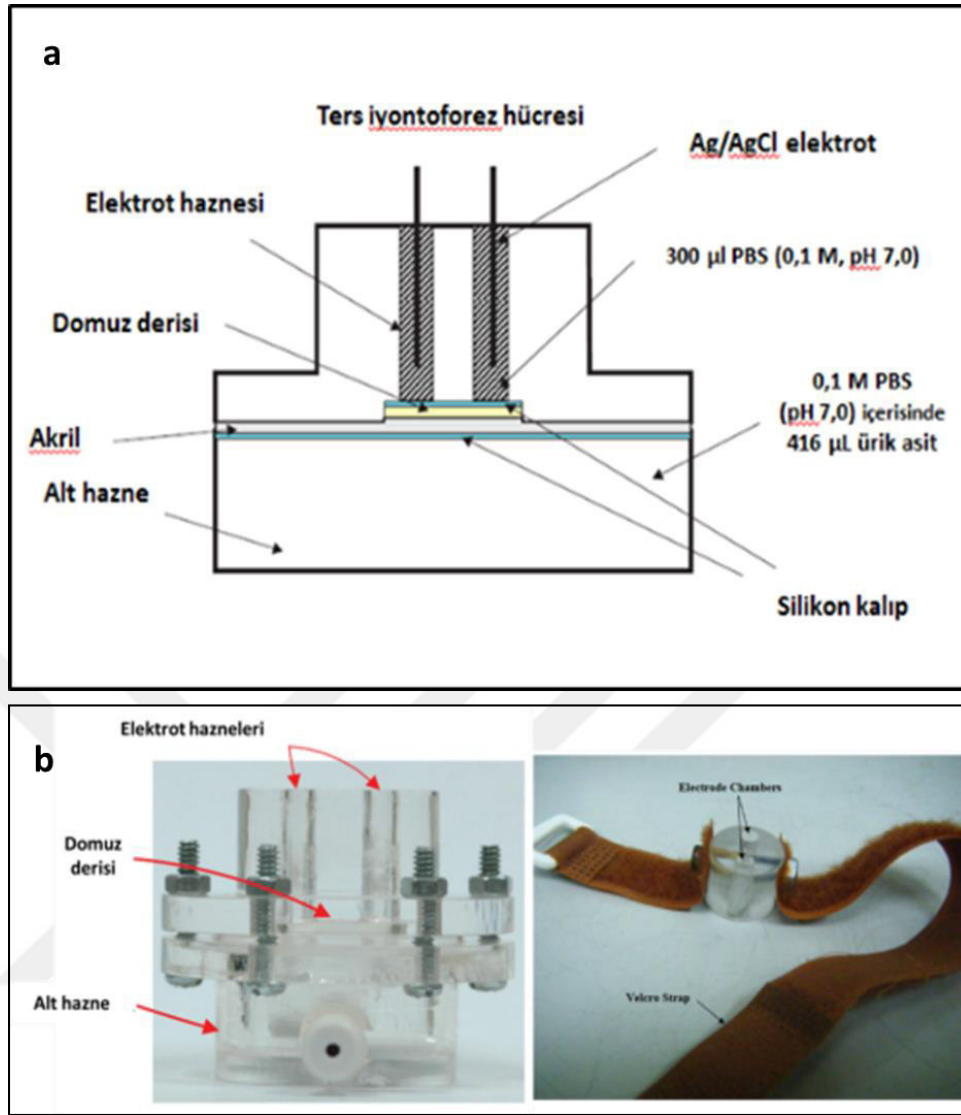
Connolly vd (2002) tarafından yapılan bir çalışmada yukarıda belirtilen durumlar dikkate alınarak ters iyontoforez çalışmaları için sensör geliştirmesine ve test edilmesine uygun bir iyontoforez sistemi, insan ve hayvan derisi yerine polimer bir membran kullanılarak geliştirilmiştir. Çalışmada membran olarak, selüloz ester (CE: cellulose ester) kullanılmıştır. Bu membranın, pH:7.0'de negatif bir yük sergileyebilme ve nano-gözenekli olma, derinin in vivo (canlı) şartlarda sergilediği elektriksel iletkenlik özelliklerini sergileyebilme gibi, derinin bazı anahtar özellikleri ile benzeşim göstermesinden dolayı seçildiği belirtilmiştir.



Şekil 2.9. İyontoforez sistemi (Connolly vd, 2002)

Yapılan bu çalışmada Şekil 2.9' da gösterilen iyontoforez hücreyle glikozun ve laktat'ın ters iyontoforez ile ekstraksiyonu çalışılmıştır. Şekil 2.9.'da, A; Anot haznesi, B; Katot haznesi (her iki hazne de 5 mm çapa ve 20 mm derinliğe sahip, olup birbirine olan mesafesi 4 mm'dir), C; elektrotlar, D; dış çapı 50 mm olan üst yarı hücre (A ve B hücreleri tarafından delinmiş), E; Seperatör (2 mm kalınlığında), F; alt hücre (22,7 mL test çözeltisi kapasitesine sahip) G ve H; iç ve dış girişler olarak tanımlanmıştır. İyontoforez sistemi, polimetilmetakrilat malzemeden yapılmış olup, alt ve üst olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Alt bölümde bulunan sıvı, deri altındaki doku sıvısını temsil etmektedir. A ve B hazneleri, iyontoforez cihazında deri ile temas eden toplama hazneleri olarak rol oynamaktadır. Selüloz ester (Cellulose Ester (CE), alt bölmenin üzerine yerleştirilen bir ayırıcı kasnağın üzerinde durmaktadır. Burada selüloz ester deri görevi görmektedir. Difüzyon hücresinin membran ile birleştirilmesi sağlandıktan sonra, alt bölüme giriş portu yoluyla çözelti doldurulmaktadır. Çalışmada, iyontoforez deneylerinin, alt hücrede, HEPES (2-[4-2-hidroksi etil)-1 –piperazin] etan sülfonik asit tamponu) (133 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM HEPES) ve 5 mM glikoz ya da 10 mM sodyum laktat varlığında tampon çözelti içerisinde gerçekleştirildiği, anot ve katot haznelerinin, her bir iyontoforez işleminde 300 µL HEPES/NaCl ile doldurulduğu bildirilmiştir. Ters iyontoforez işleminin 70 µA'lık bir akım altında, 15-90 dakikalık periyotlarda gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Bu iyontoforez hücresi temel alınarak literatürde, farklı moleküllerin ters iyontoforez ile ekstraksiyonuna yönelik birçok çalışma sunulmuştur;

Lee vd (2010), Ching vd (2014), Leboulanger vd, (2004b) tarafından yapılan çalışmalarda, Şekil 2.10.a ve Şekil 2.10.b'de görülen sistem, ürik asidin ters iyontoforez yöntemiyle ekstrakte edilmesinde kullanılmıştır. Ayırıcı membran olarak domuz derisi (kalınlığı 250 µm) kullanılmış olup etkin yüzey alanı 0,2 cm²'dir. İki iyontoforez haznesi arasındaki mesafe 11 mm olarak tasarlanmıştır. Sistemde 0,3 mA/cm² akım yoğunluğu, Ag/AgCl iyontoforez elektrotlar kullanılarak uygulanmıştır.



Şekil 2.10. İn vitro çalışmalar için kullanılan difüzyon hücreleri (Lee vd, 2010; Ching vd, 2014)

Benzer şekilde bu difüzyon hücresi, Ching vd (2011b) tarafından yapılan çalışmada homosistein ve üre molekülünün birlikte ekstraksiyonu için, yine Ching vd (2012)'nin bir başka çalışmasında, ters iyontoforez ve elektroporasyon (hücreleri veya dokuları kısa süreli yüksek güçte bir elektriksel alan uygulayarak, hücre zarında DNA'nın geçebileceği nanometre boyutunda geçici gözenekler açılması mantığına dayanan gen aktarımı işlemi) tekniğini birlikte kullanarak çoklu biyo belirteçlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle ayırıcı membran olarak domuz derisi kullanılmıştır. İyontoforez elektrot olarak genellikle Ag/AgCl kullanılmış olup, bunlar bir gümüş tel üzerine AgCl kaplanması ile hazırlanmıştır.

Ching vd (2011b)'nin Vücut dışında yapılan bu çalışmanın çalışmasında, homosisteinin deri yüzeyinden non-invaziv olarak ekstrakte edilip edilemediğinin

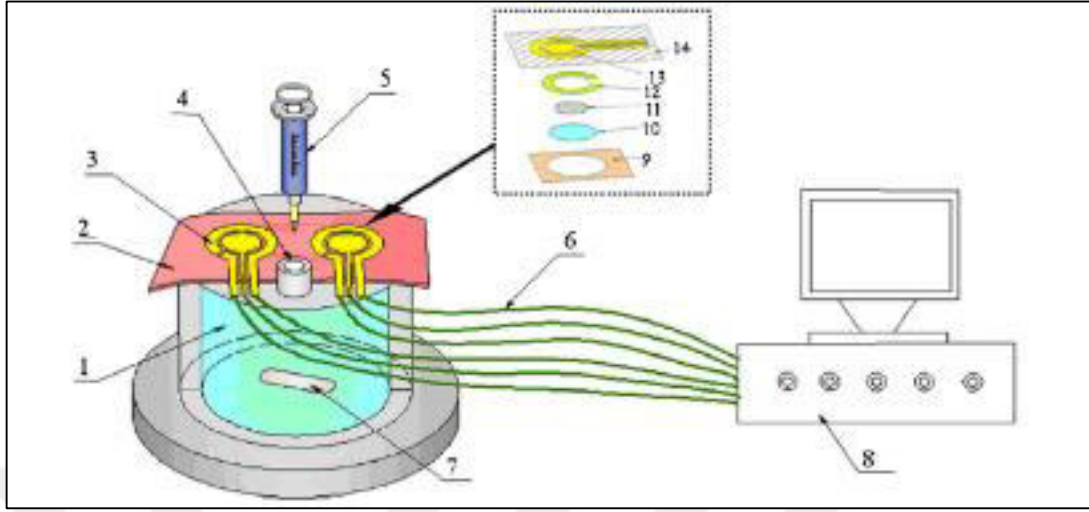
belirlenmesi ve hem de homosistein ve ürenin eş zamanlı iyontoforez şartları incelenmesidir. Bütün denemelerde domuz derisiyle birleştirilmiş bir difüzyon hücresi kullanılmıştır. Difüzyon hücresine, bir Ag/AgCl elektrot vasıtasıyla, 12 dakika boyunca, bir doğru akım ve farklı simetride iki-fazlı doğru akım (SBdc) uygulanmıştır. Bu doğru akım ve farklı simetride iki-fazlı doğru akım $0,3 \text{ mA /cm}^2$ akım yoğunluğuna sahiptir. Farklı simetride iki-fazlı doğru akım (SBdc) 15, 30, 60 ve 180 saniye olmak üzere 4 farklı faza da uygulanmış ve bunun sonucunda homosistein, ters iyontoforez yöntemi ile deri yüzeyinden ekstrakte edilebilmiştir. Bu çalışma, homosisteinin ve ürenin eş zamanlı olarak ekstrakte edildiği optimum mod, 60 saniye faz süresine sahip olan farklı simetride iki-fazlı doğru akım (SBdc)'ın kullanıldığı şartlar olup bu, faz süresine bağlı olarak ters iyontoforez yöntemi ile homosisteinin ve ürenin eş zamanlı ekstraksiyonunun mümkün olduğunu desteklemektedir.

Ters iyontoforez yöntemiyle elde edilen analitlerin analizi için çeşitli elektrotlar ve biyosensörler kullanılmıştır. Literatürde “screen printed” elektrotların hem bir biyosensör hem de iyontoforez elektrotu olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. (Liu vd, 2011; Ching vd, 2010).

Liu vd, (2011) tarafından yapılan bir çalışmada “screen printed” elektrotlar hem iyontoforez elektrotları hem de ters iyontoforez ile ekstrakte edilen glikozun amperometrik tayin edilmesi için bir çalışma elektrotu (biyosensör) olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada in vitro şartlarda iyontoforez denemeleri için üç bölmeli dikey difüzyon hücresi kullanılmış ve sistemin tamamı Şekil 2.11'da gösterilmiş olup 1; alt hazne, 2; çıplak fare derisi, 3; biyosensör, 4; giriş, 5; mikropipet, 6; iletim kabloları, 7; manyetik karıştırıcı, 8; elektrokimyasal çalışma istasyonu, 9; izole tabaka, 10; hidrojel membran, 11; Os-kompleks mediatör film, 12; Ag/AgCl tabakası, 13; Au (altın) tabaka, 14; PC kalıp tabakayı göstermektedir.

Bu sistemde elektrot hazneleri, derinin yüzeyinde biyosensör üzerine yerleştirilmiştir. Bu bir hidrojel membran vasıtası ile sağlanmıştır. Bu hidrojel membran, ekstrakte edilen glikozun toplama haznesi görevi gördüğü kadar, bir biyosensör elektroliti olarak da görev almıştır. Hidrojel membran, çıplak fare derisinin epidermis tabakası üzerine sıkıca, bir “screen printed” biyosensör kullanılarak sabitlenmiştir. Amperometrik transduser, ince plastik film kalıp ile bir polikarbonat substrat üzerine Au'ın (altın) püskürtülmesiyle üretilen geleneksel üçlü

elektrot kullanılarak yapılmıştır. Ag/AgCl pastası, kalıp olarak paslanmaz çelik kullanılarak karşıt elektrot ve referans elektrotun yüzeyine baskılanmıştır.



Şekil 2.11. Ters iyontoforez denemeleri için kullanılan sistemin bütünü (Liu vd, 2011)

Ag/AgCl tabakası 120 °C’de 5 dakika kurutulmuştur. Transduser, sonra hidrofiliklik ve elektroaktivitenin yeterli bir şekilde gelişmesi için elektro-aktivasyon metodu yoluyla, ön muameleye tabi tutulmuştur. 2 µL Os-kompleks HRP (horseradish peroksidaz) ve PEG-DGE (poli (etilen glikol diglasiyal eter) içeren mediatör çözeltisi, çalışma elektrotu alanına eklenmiş ve gece boyu kurutulmuştur. PEO’yu (poli (etilen oksidaz) optimum oranda içeren PEO sulu çözelti, hidrojel membran hazırlamak için reaksiyon alanına eklenmiş ve biyosensör 4 °C’de saklanmıştır. Şekil 2.11’de görüldüğü gibi bir çift biyosensör, elektrokimyasal çalışma bölgesine bağlanmış ve sonra, sırasıyla anodik ve katodik elektrot olarak görev gören Ag/AgCl elektrotlar aracılığıyla, ters iyontoforez devresini tamamlamak için 0,5 mA/cm² sabit bir akım uygulanmış ve iyontoforez işlemine 20 dakika boyunca devam edilmiştir. Bu çalışmada çıplak fare derisi, insan derisine benzer şekilde fizyolojik pH’da negatif yüklü ve katyonlar için seçici-geçirgen olduğu için tercih edilmiştir.

2.3.4. Gluowatch Patent İncelemesi

Sieg vd (2003), Sieg vd (2004) tarafından yapılan iki çalışmada, Ters İyontoforez yönteminin Ticari *GlucoWatch Biographer* cihazında kullanım şartları incelenmiştir. Bu çalışmalarda, Ters iyontoforez yönteminin diabetik gliseminin, uzun saatler boyunca her 10 dakikada bir ölçümünü sağlayan ticari bir “GlucoWatch

Biographer” cihazında, non-invaziv olarak deriden glikozu ekstrakte etmek için kullanılabildiği ancak, cihazın, her kullanımda klasik yöntemle elde edilen bir kan örneği ile kalibre edilmesi gerekliliği bildirilmiştir. Yapılan iki çalışmanın da amacı, invaziv (acılı) olan bu adımın bertaraf edilmesi için yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi üzerine çalışmaların yapılması olarak belirtilmiştir. GlucoWatch ile ilgili literatürde çok sayıda makale olmasıyla birlikte patent çalışmaları da mevcuttur; bu patentlerden bir tanesi incelenerek ayrıntıları aşağıda sunulmuştur;

Kim vd (2004) tarafından yapılmış olan bu buluş, bir biyolojik sıvıda hedef analitin konsantrasyonunun izlenmesinde kullanılabilecek bir biyosensör, daha da önemlisi, deri yüzeyinden ekstrakte edilen bir veya daha fazla analitin konsantrasyonunun ölçülmesiyle ilgilidir. Bu buluş ayrıca, uzun zaman alan süreçlerde (1-24 saat veya daha fazla) biyolojik bir sistemden bir veya daha fazla analitin deri yüzeyinden sürekli ekstraksiyonu için bir elektrot sistemi ile ilgilidir. Bu buluş, deri yüzeyinden ekstrakte edilen bir analitin konsantrasyonunun ölçülmesi ya da tayini için etkili bir örnekleme sistemi sunar. Bu buluş ayrıca, bir biyolojik sıvı ortamında bulunan hedef analitin konsantrasyonunu belirlemek için yüksek duyarlılıkta bir biyosensör ile birleştirilen bir otomatik örnekleme sistemi sağlayarak daha önceki buluşlardan üstün olarak, bir izleme tekniğini ve cihazının geliştirilmesini temsil eder. Örnekleme sistemi, deri yüzeyi yoluyla bir hedef analitin küçük miktarlarını ekstrakte eder ve sonrasında hedef analitin konsantrasyonunu belirler. Örnekleme, biyolojik bir sistemden bir hedef analitin, milimolar seviyesinin de altında (sub-mM) ekstrakte edilmesi durumunda, bunun bile miktar tayininin yapılmasına izin verecek şekilde sürekli bir biçimde gerçekleştirilir.

Örnekleme sisteminin girişimsel olmayan doğası, hastaların bu sistemi kabul etme oranını arttırmaktadır. Özellikle bu bağlamda kandaki glikozun izlemesiyle, gün içerisinde kandaki glikoz ölçümünün sık sık alınmasıyla, daha iyi bir glisemi kontrolü başarılabılır. Girişimsel olmayan örnekleme sisteminin kullanılması, daha sık ölçümün alınması oranının arttırılmasına yardımcı olur. İlaveten, anlık örnekleme sistemi yoluyla sağlanan otomatik örnekleme, özellikle uzun süreli izlemeler yapıldığında (24 saat ve daha fazla), daha önce tanımlanan bu tür cihazlarla tayin edilemeyen değişken durumun (gün içerisinde glikoz miktarının değişkenlik göstermesi) izlenmesinde kullanılabılır.

Bu buluşun genel amaçlarından birisi, biyolojik sıvılarda bulunan analitin deri yüzeyinden sürekli ekstraksiyonu için otomatik bir sistem sağlamaktır. Buluşun bir önemli uygulaması, deri yüzeyinden yapılan ekstraksiyon, ters iyontoforez veya elektro ozmos kullanılarak gerçekleştirilebilir olmasıdır. Bu uygulama, bir veya daha fazla toplama haznesinin, deneğin derisi ile temas halinde olmasını gerektirir. Tipik bir toplama haznesi, iletken bir ortam içerir ve hazne ile deneğin derisi arasında akım ya da elektrik potansiyeli sağlamak için örnek ile temas halindedir. Ayrıca bir biyosensör, bir ya da daha fazla hazne ile temas halindedir ve hazne içerisinde bulunan hedef analitin konsantrasyonunun belirlenmesini ya da algılanmasını sağlar. Örneklemesi sistemi yoluyla elde edilen hedef analitin miktarını belirlemek için kullanılan biyosensör, geleneksel elektrokimyasal tayin yoluyla (genel olarak mM aralığında) konsantrasyonun da altındaki bir miktarı [ters iyontoforez ile ekstrakte edilmiş olan konsantrasyon, örn. sub-mM (sub-mM", 1 mM'dan daha düşük konsantrasyonu ifade etmektedir)] güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlemek durumundadır. Bu buluşun önemli uygulamalarından biri, biyosensör, bir platin-grup metal (örneğin, Pt, Pd, Ru ve Rh) içeren bir elektrot içerir. Biyosensör elektrot, hidrojen peroksit sağlamak üzere, ilgili analit ile spesifik reaksiyon veren bir enzim tarafından üretilen, hidrojen peroksidi tayin etmek için kullanılır. Otomatik örneklemesi sistemi, uzun süreli olarak (1-24 saat veya daha fazlası) sürekli ve periyodik örneklemesi sağlamak için kullanıldığında, biyosensör elektrot düşük başlangıç akıma sahip olmalıdır ve en azından 1-24 saatlik işlem sırasında kararlı olmalıdır.

Buluşun bir diğer genel amaçlarından bir diğeri ise, biyolojik bir sistemde bulunan hedef analitin konsantrasyonunu izlemek için, iyonik olarak iletken bir ortam içeren hazneler ve hidrojen peroksit üretmek için analit ile reaksiyon verebilen enzim içeren bir örneklemesi sistemi sağlamaktır.

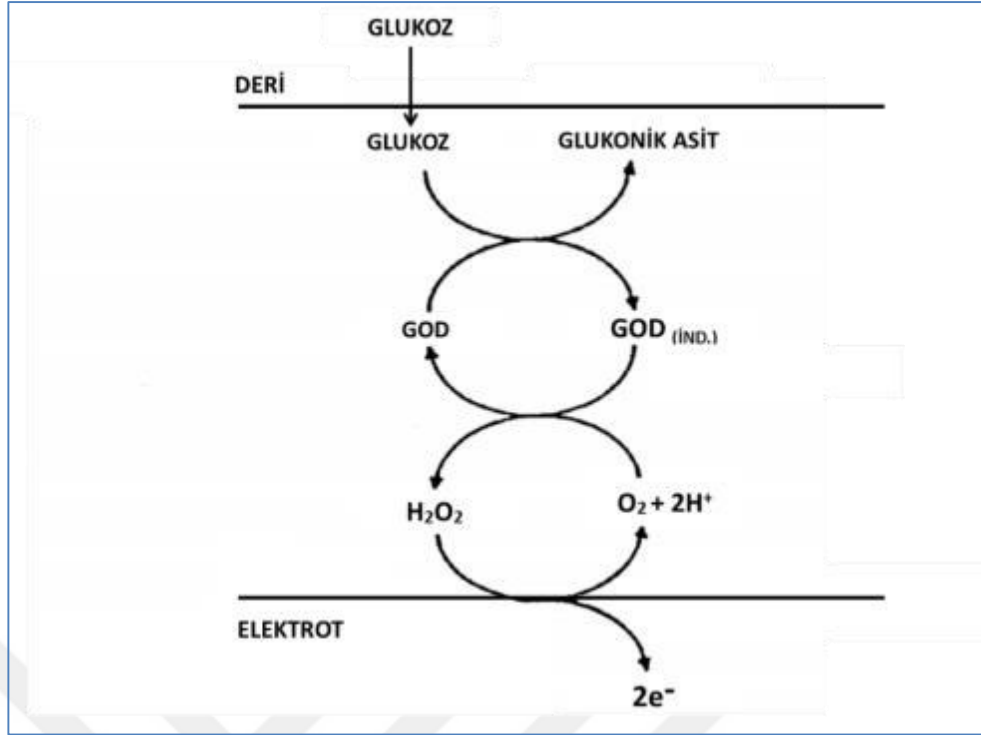
Bu buluş, deri yüzeyi metodu (Transdermal Metot) yoluyla bir analitin küçük miktarlarda örneklenmesi için bir metot ve aparat sunar. Bu metot ve aparat, bir biyolojik sistemde bulunan hedef analitin miktarını belirlemek için kullanılır. Bu örneklemesi sürekli bir şekilde gerçekleşir ve miktar belirleme hedef analit konsantrasyonu mili molardan daha düşük olduğu durumda bile mümkündür. Deri yüzeyinden ekstraksiyon bir elektrokimyasal akım veya ultrasonik radyasyon uygulanarak gerçekleşir. Elektrik akımı veya ultrasonik radyasyon, glikozun çok

küçük miktarlarının denekten bir toplama haznesine ekstrakte edilmesi için kullanılır. Toplama haznesi, biyosensör ile temas halindedir. Daha da önemlisi, bir veya daha fazla toplama haznesi, deneğin doku yüzeyine, temas halinde olacak şekilde yerleştirilir. Ayrıca, toplama haznesi, ters iyontoforez ekstraksiyonu için akım üreten elektrot ile temas halindedir.

Toplama kabı, sıvı ya da sıvı ortam içeren iyonik olarak iletken bir ortamdan oluşur. İletken ortam, tercihen, yüksek iyonik iletkenlik üretmek için yeterli miktarda iyonik maddeler içeren bir hidrojeldir. Hidrojel, birbirine bağlantılı hücrelerden oluşan, su ile birleştiğinde jel formunda olan (çözünebilen) katı bir maddeden oluşmaktadır ve bu jelatin gibi doğal bir madde olabilir (Jelatin, bağlar, tendonlar ve derinin kaynatılması yoluyla içinde bulunan kollajen proteininin hidrolizinden meydana gelir). Bununla beraber, materyalin jel formu ya da çözünebilen katı form için polimer bir materyal daha çok tercih edilebilir (poli etilen oksit, polivinil alkol, poliakrilik asit ve bunlarla ilgili kopolimerler ve polivinil prolidin içeren). Polimer materyaller ağırlıkça %5' den fazla %40' dan daha az, tercihen kullanılabilir. Nemlendirici eklendiğinde bu aralık % 8 ila %12 olarak, nemlendirici eklenmediğinde %15-%20 aralığında tercih edilebilir. Hidrojel içerisine, sınırlama olmaksızın, elektrolit (tuz vb.), tampon, nemlendirici, biyo asit, koruyucu, enzim stabilizatörü ve yapıştırıcı gibi ilave materyaller eklenebilir.

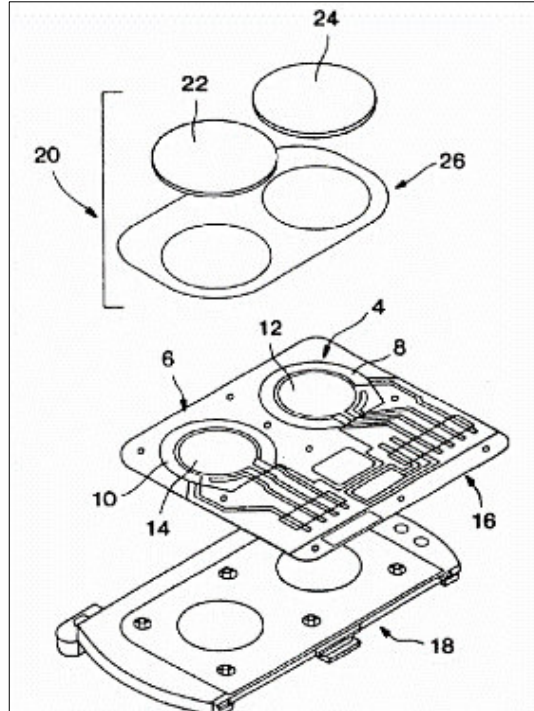
Buluştaki sunulan örnekleme sistemi çok düşük gürültü seviyelerinde çalıştırılmak zorunda olduğundan toplama haznesi, bulaş yapan ya da elektrokimyasal olarak yeterli duyarlılıkta bileşen içermeyen, iyonik olarak iletken bir ortam içermelidir. Böylece, yukarıda tanımlanan tercih edilen hidrojel bileşeni, makul bir materyal seçimi yapılarak formüle edilir.

Analitin tayinini kolaylaştırmak için, bir enzim, bir veya daha fazla toplama haznesinin içine atılır (gömülür). Enzim, ekstrakte edilen analiti (burada glikoz) katalizler. Burada uygun enzim, glikozun, glikonik asit ve hidrojen peroksit katalizlendiği glikoz oksidazdır. Bu biyosensörde, elektrot üzerinde hidrojen peroksitin tayininde, (cihaza giren glikozun miktarı ile ilişkili olarak ve tayin edilebilen bir akım oluşturarak) her hidrojen peroksit molekülü başına iki elektron üretilir (Şekil 2.12). Glikoz oksidaz (GOx), ticari olarak kolayca ulaşılabilir ve katalitik davranışı çok iyi bilinen bir enzimdir. Bununla beraber, diğer enzimler de kullanılabilir.



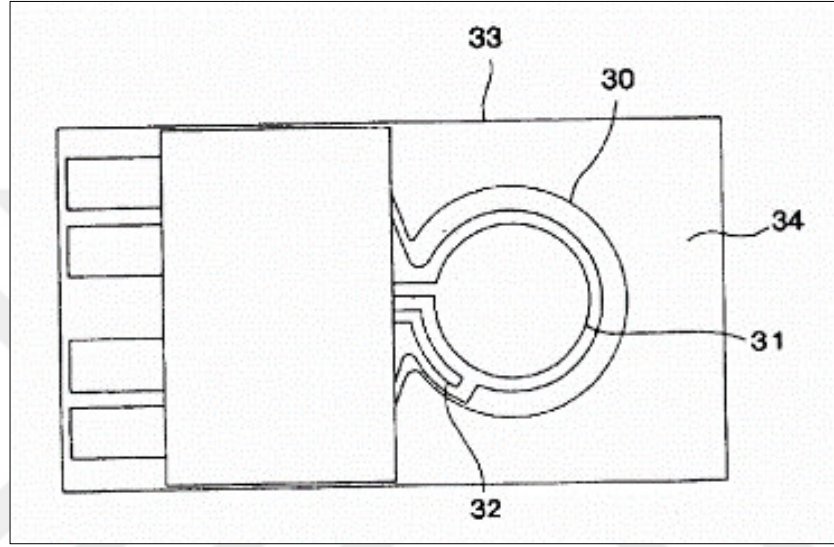
Şekil 2.12. Glukonik asit ve hidrojen peroksit elde etmek için glukoz oksidazın katalizlendiği ve bir akımın oluşması ile sonuçlanan reaksiyonun gösterimi (Kim vd, 2004)

Söz konusu patentte, ilgili buluşu anlatan Şekil 2.13, Şekil 2.14 ve Şekil 2.15 aşağıda verilmiştir.



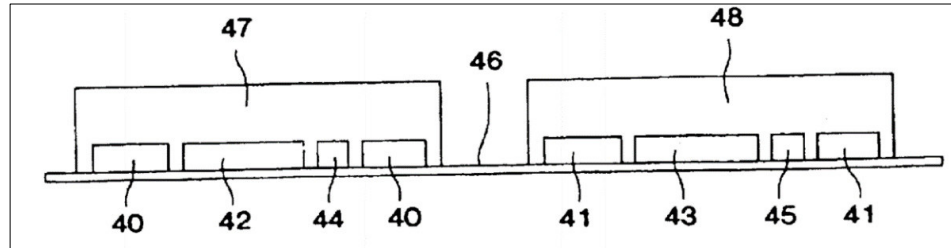
Şekil 2.13. Otomatik örnekleme sisteminin genişletilmiş resmi (Kim vd, 2004).

Örnekleme sistemi bileşenleri, her biri dairesel elektroforetik elektrota sahip olan sırasıyla 8 ve 10 ile gösterilen ve bir biyosensörü (12 ve 14) çevreleyen iki biyosensör/iyontoforetik elektrot alanı içerir (4 ve 6). Elektrot alanları (4 ve 6), bir sensör tablası içerisine yerleştirilmiş olan polimerik bir substrat (16) üzerine basılmıştır. Elektrot alanları üzerine yerleştirilmiş olan toplama haznesi alanı (20), toplama haznesi alanının olduğu yerde bir jel tutucu ile (26) tutturulmuş olan iki hidrojel dolgu (22 ve 24) içerir.



Şekil 2.14. İki durumlu (bimodal) elektrot tasarımının bir uygulaması (Kim vd, 2004).

Şekil, (33) genel olarak elektrot grubunun şematik ve genel görünümünü ifade eder. (30) çift durumlu elektrodu ifade eder ve örneğin bu, bir Ag/AgCl iyontoforetik/karşıt elektrot olabilir. Algılama ve çalışma elektrodu (örneğin platinden yapılmış olan) şekilde (31) ile ifade edilmiştir. Referans elektrot şekilde (32) ile ifade edilen kısımdır ve bu bir Ag/AgCl elektrot olabilir. Bileşenler uygun bir madde üzerine monte edilmiştir (34). Bu örnekteki gibi bir çalışma elektrodunun alanı, 1.35 cm^2 'dir.



Şekil 2.15. Bir referans elektrot ve bir hidrojel kısım ile birleştirilerek kullanılabilen, çift durumlu elektrodun yan kesitinin gösterimi (Kim vd, 2004).

Şekildeki bileşenler, çift durumlu elektrot (40 ve 41) ile, algılama elektrotları (42 ve 43) ile, referans elektrotlar (44 ve 45) ile, bir substrat 46 ile, ve hidrojel petler (47 ve 48) olarak gösterilmektedir.

2.4. Tezin Amacı ve Özgün Yönü

Homosisteinin, metiyonin metabolizması sırasında oluşan ve sülfür içeren bir aminoasittir. Bu tez çalışmasında, homosisteinin, ters iyontoforez tekniğini kullanarak non-invaziv bir şekilde, doku sıvısı ile birlikte deri dışına alınması, alınan bu sıvıda, amperometrik bir enzim biyosensör kullanılarak tayin edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen verilerin, kol saati şeklinde anlık veri alınmasına müsaade eden bir sistemin kurgulanmasına temel teşkil etmesi amaçlanmaktadır.

Tez çalışmasında her ne kadar homosistein ile çalışılmış olsa da, tez kapsamında geliştirilen sistemin doku sıvısı ile deri dışına taşınabilen ve bir biyosensör ile ölçülebilir nitelikteki parametrelere uygulanabilir olması öngörülmektedir. Bu sayede universal bir sistemin geliştirmesi tez çalışmasının özgün yönünün başında gelmektedir.

Tez çalışmasında homosisteinin tercih edilmesinin kritik bir önemi vardır. Homosistein, ilgili olduğu hastalıkların tanısında henüz rutinde tayin edilen bir parametre olmamakla birlikte kalp krizi ataklarında önemli bir gösterge olduğu konusundaki iddiaları gün geçtikçe artmaktadır (Anonim, 2018; Ching vd, 2011b). Bu bakış açısı ile kardiyovasküler hastalıkların tanısında homosisteinin acısız, hızlı ve kompakt bir cihazla tayin edilmesi ve en basit şekli ile hastanelerin acil servislerine göğüs ağrısı tanısı ile gelen hastalarda hızlı karar verme noktasında alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmesi öngörülebilir. Homosistein molekülünün ters iyontoforez yöntemi ile deri dışına alınmasına yönelik çalışmalar literatürde mevcut olup üre ve glikoz molekülleri üzerine yapılan çalışmalar kadar yaygın değildir; homosisteinin ters iyontoforez yöntemi kullanılarak deri dışına alınması ve buna ilave olarak amperometrik bir homosistein biyosensörü ile tayin edilmesi bu teze özgü bir çalışma olacaktır. Nitekim belirtilen literatürlerden, Ching vd, (2011b) tarafından yapılan çalışmada, ekstrakte edilen homosistenin miktarının, Bio-Rad 680 marka model olan bir mikro plak okuyucu ile kolorimetrik olarak tayin edildiği, Connolly vd, (2002)'de tarafından yapılan çalışmada ise klinik kitler kullanılarak tayin edildiği belirtilmiştir. Tez çalışmasında, homosisteinin ters iyontoforez yöntemi ile deri dışına alınmasına ait optimizasyon şartlarının

geliştirilmesi ve aynı zamanda amperometrik homosistein biyosensörü geliştirilerek terz iyontoforez ekstraksiyonundan elde edilen analitin bu biyosensörle tayin edilmesi bu tez çalışmasına özgü olacaktır.

Tez çalışması birden fazla çalışma alanını birleştiren konsept bir çalışmadır; homosistein molekülünün hücrel sıvıdan akımın etkisiyle deri dışına alınması, elektrokimya, non-invaziv teknikler, non-invaziv tekniklerin canlı vücutunda uygulanmasına yönelik tekniklerin kullanılmasını gerektirir.

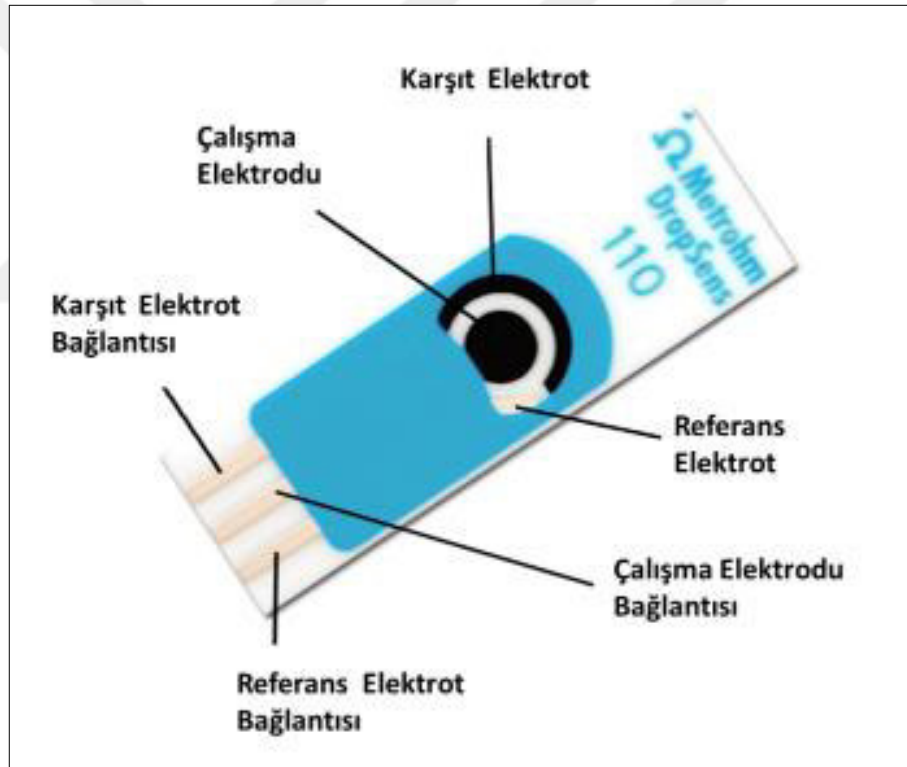
Deri dışına alınan sıvının ölçüm teknikleri bir diğer teknoloji alanıdır; ilgili parametreye bağlı olarak geliştirilmiş klasik ölçüm yöntemleri mevcuttur. Ancak ekstrakte edilen materyalin miktarının düşük olması alternatif tekniklerin geliştirilmesini gerektirmektedir. Biyosensör teknolojisi hızlı ve yerinde analizler için en uygun alternatif yöntemdir.

Biyosensörün geliştirilmesinde, son yıllarda yaygın bir kullanım alanına sahip SPCE elektrot kullanılmıştır. SPCE elektrot yüzeyi Kitosan + Karbon Nanotüp birlikte kullanılarak geliştirilen matris ile modifiye edilmiştir. Modifiye SPCE elektrotların enzim biyosensör geliştirilmesinde kullanımı ile literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu tez çalışması, bu alandaki çalışmalara da katkı sağlayacak sonuçlar ortaya koyacaktır.

3. MATERİYAL METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Materyaller

D-Aminoasit Okdisaz Enzimi kullanarak geliştirilen amperometrik homosistein biyosensörün yüzey modifikasyonun izlenmesinde, GAMRY600 potansiyostat/golvanostat cihazının Siklik Voltametri (CV) modülü kullanıldı. Biyosensör hazırlandıktan sonra kalibrasyon aralığının belirlenmesine yönelik ölçümler de aynı cihazın Kronoamperometri modülü kullanılarak yapıldı. Biyosensör geliştirme çalışmalarında, çalışma elektrotu; karbon (4 mm çap), karşıt elektrot; karbon, referans elektrot; karbon, elektrik bağlantı noktaları; gümüş, boyutlar; L33 x W10 x H 0,5 olan Dropsens-110, Screen Printed Karbon Elektrot (SPCE) kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Dropsens screen printed elektrot (Anonymous, 2021)

Benzer şekilde, iyontoforez elektrotlar, GAMRY600 potansiyostat/golvanostat cihazı ve bu cihazın Kronoamperometri modülü kullanılarak hazırlandı. Ters iyontoforez denemeleri de yine aynı cihazda aynı modül kullanılarak yapıldı.

Çözeltilerin pH ayarlama işleminde Thermoscientific, Orion 3 Star Marka pH metre kullanıldı. Kimyasal maddeler, Kern, PFB 1200-2 marka Hassas terazi

kullanılarak tartıldı. Çözeltilerin karıştırılmasında ve iyontoforez işlemimde, Hanna, HI190M Marka Manyetik Karıştırıcı kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan standart çözeltiler, Millipore, Direct-Q cihazından üretilen deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Düşük miktartlı çözeltilerin karıştırılmasında VORTEX, VG3 marka tüp karıştırıcı kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Çalışmalarda, Homosistein; Sigma, DL-Homosisteine H4628-1G, D-Aminoasit Oksidaz Enzimi; Sigma, A6222-200UN, Kitosan; Fluka-50494-25G, Ferrosen; Fluka-26260-250G, Gluter aldehit; Sigma-Aldrich, G5882-50ML, MWCNT ve SWCNT; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, HCl, NaOH, Asetik Asit Merck firmasından temin edilerek kullanıldı.

Kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

- **0,1 M Fosfat Tampon (PBS) (pH:7,40) Çözeltisi;** 0,08 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlandı ve pH'sı 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak pH:7.40 değerine ayarlandı.
- **0,01 M Fosfat Tampon Çözeltisi PBS (pH:7,40) çözeltisi;** 0,008 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,002 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlandı ve pH'sı 0,1 M HCl pH:7.40 değerine ayarlandı.
- **0,05 M Asetik Asit, pH:5,0:** 0,285 mL asetik asit alındı, üzerine yaklaşık 80 mL deiyonize su eklendi. pH'sı 0,25 M NaOH kullanılarak (15 mL harcandı) pH: 5.0'a ayarlandı ve çözelti 100 mL'ye tamamlanarak pH'sı tekrar kontrol edildi.
- **%0,1 'lik (W/V) Kitosan (0,05 M Asetik Asit İçerisinde pH:5);** 0,001 g kitosan /1 mL (asetik asit) oranını sağlayan oranlarda hazırlandı ve ortalama 5 saat manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında çözünmesi sağladıktan sonra kullanıldı.
- **%0,1'lik (W/V) Kitosan +10 mg/mL Ferrosen (KF):** Hazırlanan %0,1'lik kitosan çözeltisinin 1 mL'sinde 10 mg olacak şekilde ferrosen eklendi. Ancak kitosan çözeltisi içerisinde ferrosenin çok az çözündüğü gözlemlendi. Ferrosenin çözünürlüğünü artırmak için, 10 mg ferrosen için 100 μL metanol içerisinde çözöldükten sonra kitosan çözeltisine eklendi. Kitosan+ferrosen karışımı, vorteks üzerinde ortalama 15 saat karıştırıldıktan sonra denemelerde kullanıldı.

- **%0,1'lik (W/V) Kitosan +10 mg/mL Ferrosen+ MWCNT (5 mg/mL) (KFMWCNT):** “%0,1'lik Kitosan +10 mg/mL Ferrosen” çözeltisi, 30 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı ve üzerine 5 mg CNT/1 mL oranını sağlayacak miktarda CNT ilave edildi. Bu karışım 15 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra denemelerde kullanılacak olan karışım hazırlanmış oldu. SWCNT ve MWCNT için aynı işlemler yapıldı.
- **%0,25'lik Gluter aldehit:** 250 µL gluteraldehid alındı ve üzeri deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. Benzer şekilde, % 0,05 ve %2,5 oranlarında da hazırlanarak deneylerde kullanıldı.
- **5 mg/mL (D-Aminoasit Oksidaz Enzim / 10 mM PBS, pH:7.40):** Belirtilen orana uygun olacak şekilde enzim tartılarak PBS çözeltisi içerisinde çözüldü. Kullanılmadığı durumda buzdolabında +4°C'de saklandı.
- **Farklı Konsantrasyonlarda Homosistein (Hcy) Çözeltisi:** Denemelerde, ihtiyaca göre, 3-100 µM konsantrasyon aralığında, 10 mM PBS, pH:7,40 içerisinde çözülerek hazırlandı ve kullanıldı.

3.3. Amperometrik Homosistein Biyosensörün Hazırlanması

Amperometrik homosistein biyosensörün hazırlanmasında, SPE elektrot yüzeyinin elektrokimyasal olarak aktif hale getirilmesi için ferrosen kullanıldı, yapılan ilk denemelerde, biyosensör kombinasyonu için tatmin edici şiddette sinyal elde edilemediği için bileşime karbon nanotüp de dâhil edildi. Yapılan çalışmalarda, MWCNT kullanıldı. SPE'nin yüzey modifikasyonunda bir biyopolimer olan kitosan, çapraz bağlayıcı olarak ise gluter aldehit kullanıldı. Bu malzemelerin kullanıldığı bir biyosensörün hazırlanmasında aşağıda belirtilen adım sıra izlendi. Yüzey modifikasyonunun her aşamada yüzeyin CV'leri (Siklik Voltamogram) alınarak ilerlendi.

KFMWCNT (%0,1'lik Kitosan +10 mg/mL Ferrosen + MWCNT (5mg/mL)) oranında hazırlanan karışım, 15 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı ve SPCE'in çalışma elektrotu bölgesine 5µL damlatılarak oda şartlarında yüzeyin kuruması için beklendi (30 dakika). Ardından, elektrotların her birisinin 10 mM PBS, pH:7,40 ve 0,1 M PBS, pH:7,40 çözeltisine karşı CV'leri alındı. CV'lerin incelenmesi sonunda, yüzeydeki akım değerleri istenilen düzeyde olan elektrotlar, bir sonraki adım olan gluter aldehit kaplanması aşamasında kullanıldı. Bu aşamada elektrot yüzeyine, % 0,25 ve % 0,125 oranında gluter aldehitten 5µL damlatılarak

denemeler yapıldı ve 1 saat oda sıcaklığında kuruması için bekletildi (KFMWCNT-GA%0,25). 1 saatin sonunda saf su ile elektrot yüzeyi yıkandı. Elektrotun CV'leri, 10 mM PBS, pH:7,40 ve 0,1 M PBS, pH:7,40 çözeltisinden elektrot yüzeyine damlatılarak alındı. CV'lerinin incelenmesi sonunda, yüzeydeki akım değerleri beklenen düzeyde olan elektrotlar bir sonraki adımda, enzim kaplama aşamasında kullanıldı. Bu aşamada, 5 mg/mL konsantrasyonda D-Aminoasit oksidaz enzimi çözeltisinden elektrotların yüzeyine, 5 µL damlatıldı (KFMWCNT-GA%0,125-AOx) ve buzdolabında (+8°C), 3 saat bekletildi. 3 saatin sonunda elektrot yüzeyleri, immobilize olmayan enzimin uzaklaştırılması saf su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra, elektrotların yüzeyine 10 mM PBS, pH:7,40 ve 0,1 M PBS, pH:7,40 damlatılarak her bir elektrotun CV'si alındı.

CV'lerin incelenmesi sonunda, yüzeydeki akım değerleri beklenen düzeyde olan elektrotlar performans testlerinde, iyontoforez çözeltilerinin ölçümlerinde ve gerçek numune kan serumu analizlerinde kullanıldı.

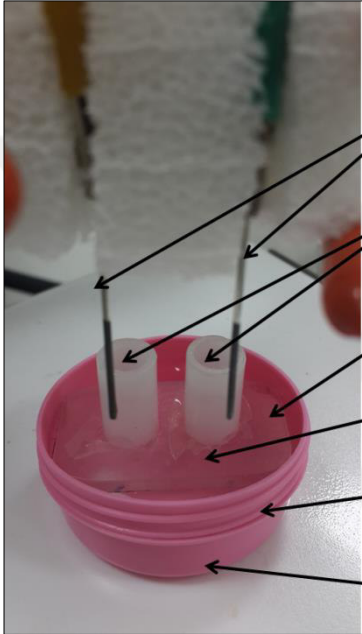
3.4. İyontoforez Şartlarının Optimizasyonu

Ters iyontoforez çalışmalarında kullanılacak olan iyontoforez elektrotlar, Lee vd (2010) tarafından yapılan çalışmadaki metoda uygun olarak, 314 µA akım altında, 90 dakika boyunca kaplama yapılarak hazırlandı. Ancak bu elektrotların da yine ters iyontoforez çalışmalarında kullanıldığında bozulmaya uğradığı gözlemlendi. Bu sorun bir elektrotun kaplama süresinin 90 dakika yerine ters iyontoforezde kullanılacak elektrotların hazırlanmana yönelik modifiye bir prosedürle çalışılarak kaplama süresi olarak 30 dakika kullanılarak aşıldı. Her iki yöntemin parametreleri Tablo 3.2.'de karşılaştırmalı olarak sunuldu. Tez kapsamındaki denemelerde modifiye edilmiş olan prosedür kullanılarak hazırlanan iyontoforez elektrotlar kullanıldı.

Tablo 3.2'de verilen modifiye yöntem kullanılarak hazırlanan elektrotların, ters iyontoforez işlemine tabi tutulmasıyla birlikte, hangi süre ve akım yoğunluğunda bozulma olma durumunun belirlenmesine yönelik bir deneysel çalışma yapıldı. Bu çalışmada çözelti olarak sadece 10 mM PBS, pH:7:40 kullanıldı, denemelerde homosistein kullanılmadı. Bu çalışmada kullanılan ters iyontoforez düzeneği ve deney planı Şekil 3.2 'de sunuldu.

Tablo 3.2. Ters iyontoforez çalışmalarında kullanılacak olan Ag/AgCl elektrotların spesifikasyonları; literatürde belirtilen yöntem ve modifiye edilmiş yöntem (Lee vd, 2010)

Yöntem Parametre Tanımı	Literatürde Belirtilenler	Tez Çalışması-Laboratuvarda Kullanılan Modifiye Yöntem
Kullanılan Cihaz bilgisi	<i>Veri sunulmamış</i>	Gamry600-Potansiyostat cihazı; Cronoamperometry modülü
Gümüş tel	1 mm, %99, Aldrich Chemical Company Inc. Milwaukee, WI	1 mm; %99, Sultanahmet/İstanbul, Yılmaz Ocak
Elektrot boyu	40 mm	40 mm
Kaplama boyu (<i>çözeltiye daldırılan kısım</i>)	25 mm	15 mm
Karşıit elektrot	<i>Platin Katot</i>	<i>Platin Katot</i>
Kaplama çözeltisi	0,1 M HCl	0,1 M HCl
Kaplama çözeltisi miktarı	Veri sunulmamış	20 mL
Kaplama süresi	90 dakika	30 dakika
Uygulanan Akım	314 μ A	314 μ A
Alan Başına uygulanan akım miktarı	<i>Veri sunulmamış</i>	<i>Hesaplanmadı</i>
Azot gazından geçirme	<i>Veri sunulmamış</i>	20 -30 dakika

	İyontoforez üst hücrenin çapı	1 cm
	İyontoforez üst hücresinin taban alanı (πr^2)	0,785 cm ²
	İyontoforez üst hücresinin boyu	2 cm
	İyontoforez üst hücresinde kullanılan çözelti/çöz hacmi	10 mM PBS, pH:7:40/ 0,3 mL
	İyontoforez alt hücresinde kullanılan çözelti/çöz hacmi	10 mM PBS, pH:7:40/ 20 mL
	Ayrıcı Membran	Selüloz ester
	Uygulanan Akım	0,1mA /cm ²
	İyontoforez süresi	5 dakika
		10 dakika
		15 dakika

Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan ters iyontoforez düzeneği ve deney parametreleri

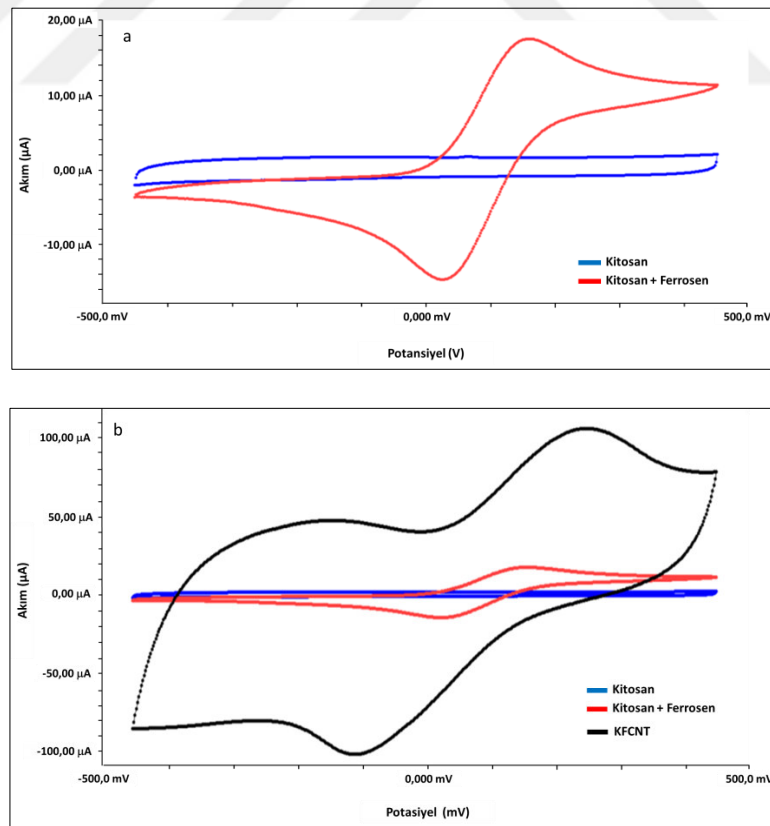
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Amperometrik Homosistein Biyosensör Protokolünün Oluşturulması

Yapılan ilk denemelerde, SPCE yüzeyine kitosan ve ferrosen karışımı kaplanarak, devamında enzim kaplama yapılarak ölçümler alındı. Ancak bu şekilde hazırlanan biyosensörden elde edilen cevapların, sinyal/gürültü oranının düşük olmasından dolayı, elektrot yüzeyinin karbon nano tüp kullanılarak modifiye edilmesi ve sinyal şiddetinin artırılması denendi. Şekil 4.1.a'da yüzeyde sadece Kitosan ve Kitosan + Ferrosen karışımı kaplıyken alınan CV'leri sunuldu. CV ölçümleri SPE yüzeyine, 0,01 M PBS çözeltisi damlatılarak alındı.

Bölüm 4.1'deki CV'ler, İntial E (V): -0,45, Final E (V): +0,45, Scan Rate (mV/s): 100, Max Current: 10 mA şartlarında gerçekleştirildi.

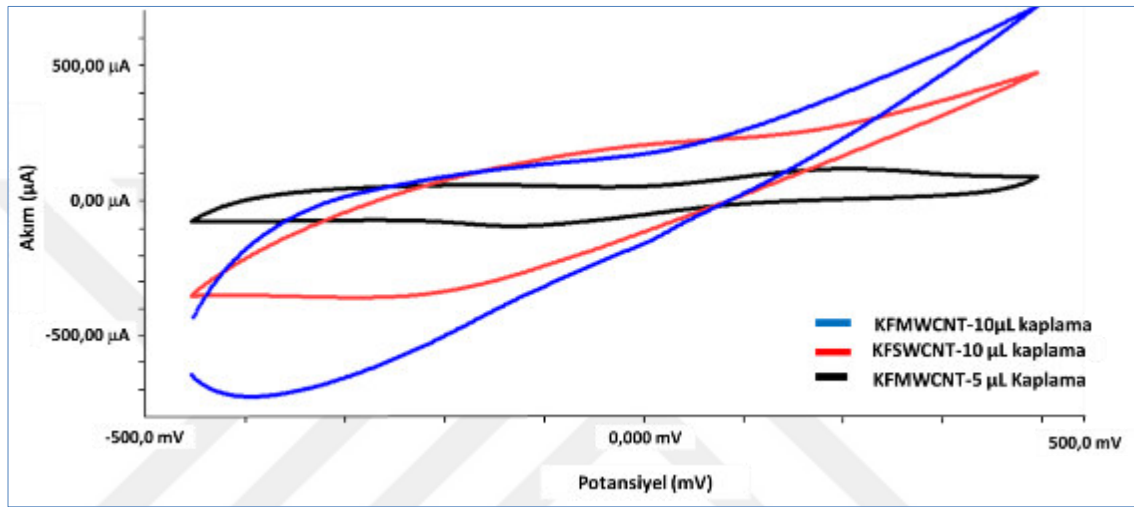
Şekil 4.1.b' de görüldüğü üzere SPE yüzeyine, KFCNT kokteyli kaplanarak elde edilen biyosensörün yine aynı şartlardaki siklik voltamogramı görülmekte olup sinyal şiddetinin arttırdığı gözlemlendi. Bu nedenle tez çalışmadaki biyosensörler, CNT katkılı bir kokteyl ile yüzeyleri modifiye edilmiş SPCE'ler kullanılarak hazırlandı.



Şekil 4.1. SPE yüzeyinde ferrosenin ve CNT'nin sinyal şiddetine etkisini gösteren siklik voltomogram

4.1.1. Biyosensörün KFCNT Karışımı Kaplama Kalınlığının Belirlenmesi

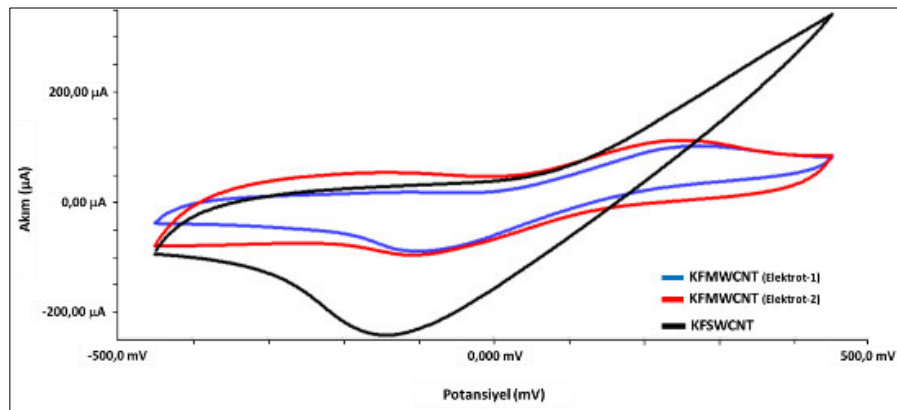
Kaplama kalınlığının belirlenmesi için yüzeye KFMWCNT, KFSWCNT karışımından 10 μL damlatılarak kurutuldu. Yüzeyin sinyal vermediği gözlemlendi. KFMWCNT kokteylinden 5 μL ve 10 μL damlatılarak oda sıcaklığında en az 30 dakika kuruması beklendi. Kaplama miktarının her çözelti için 5 μL 'den daha fazla olmaması gerektiği belirlendi. Daha fazla miktarda madde ile kaplandığında yüzeyde indirgenme-yükseltgenme piki gözlemlenmedi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SPE yüzeyindeki sinyal şiddetine kaplama kalınlığının etkisini gösteren siklik voltagram

4.1.2. MWCNT ve SWCNT Seçimi

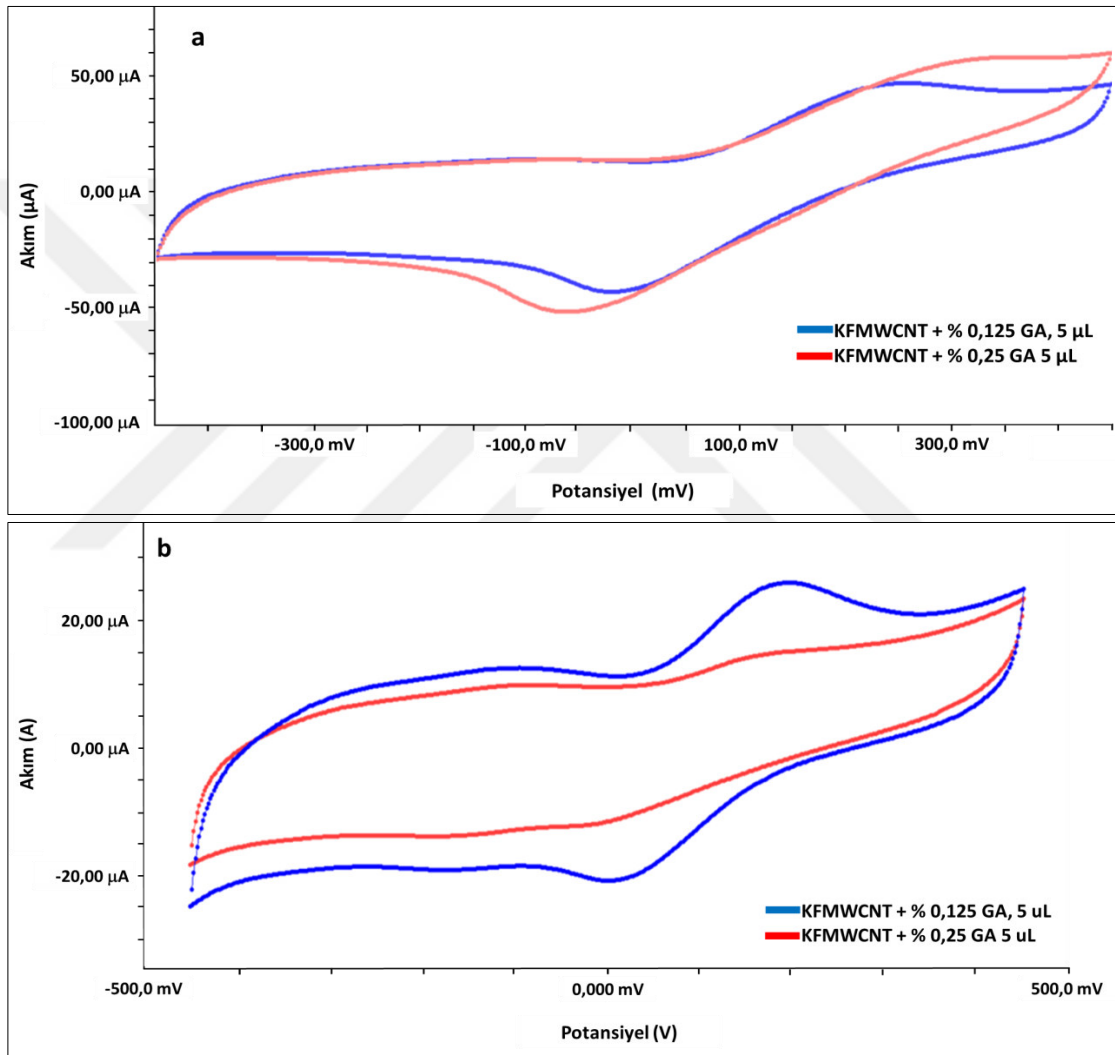
Denemelerde tekli (SWCNT) çoklu (MWCNT) tabakalı olmak üzere 2 farklı karbon nano tüp kullanıldı. Aşağıdaki grafikte (Şekil 4.3), yüzeyin KFMWCNT ve KFSWCNT ile kaplanmış yüzeylerin CV'leri sunuldu. Bu denemeden sonra çalışmalara MWCNT ile devam edildi.



Şekil 4.3. SPE yüzeyindeki sinyal şiddetine MWCNT ve SWCNT etkisini gösteren siklik voltagram

4.1.3. Gluter aldehit (GA) Oranı ve Kaplama Süresi

Gluter aldehit (GA) ile yapılan denemelerde , %0,125 ve %0,25 olmak üzere iki farklı oran denendi. Her iki oran da 5 μ L olarak yüzeye uygulandı. Hazırlanan iki farklı seri (ilk seri Şekil 4.4.a, ikinci seri Şekil 4.4.b) SPE ile alınan ölçümlerde, %0,125 oranında GA ile kaplı yüzeyin indirgenme ve yükseltgenme pikinin daha belirgin olduğu gözlemlendi. Bu nedenle nihai biyosensör hazırlama protokolünde %0,125 GA oranı kullanıldı.



Şekil 4.4. SPE yüzeyindeki sinyal şiddetine gluter aldehit oranının etkisini gösteren siklik voltagram

4.1.4. Enzim Kaplama

Enzim kaplama oranı malzemenin pahalı ve temininin zor olması nedeniyle değiştirilmeyerek ve başka oran denemesi yapılmaksızın literatürdeki bilgiler referans alınarak 5 mg/mL oranında kullanıldı. Enzim kaplanan yüzeyin de CV'si alındı. Pozitif

alandan elde edilen en yüksek noktaya denk gelen potansiyel değeri, homosistein miktarının belirlendiği kronoamperometri modülünde “step voltage-1” değeri olarak kullanıldı.

4.1.5. Denemelerde Kullanılan Elektrot Hazırlama Protokolü

Yapılan denemeler ve elde edilen sonuçlar neticesinde, biyosensörün performans testlerinin yapılması, gerçek örneklerde homosistein miktarının belirlenmesi ve ters iyontoforez yoluyla elde edilen standart ekstrat çözeltilerinde homosistein düzeyinin belirlenmesinde Tablo 4.1’de sunulan protokole uygun olarak hazırlanmış ve yukarıda belirtilen adım sırası kullanılarak hazırlanmış olan modifiye SPE temelli D-aminoasit oksidaz enzim biyosensör kullanıldı. Sinyal attırıcı olarak karbon nano-tüp kullanıldı. CNT’nin denenen her iki türünden MWCNT’in daha iyi sonuç verdiği gözlemlendi. Kaplama kalınlığı 5 µL’den daha fazla olduğunda yüzeyden sinyal alınamadığı gözlemlendi.

Tablo 4.1. Amperometrik homosistein biyosensör hazırlama protokolü

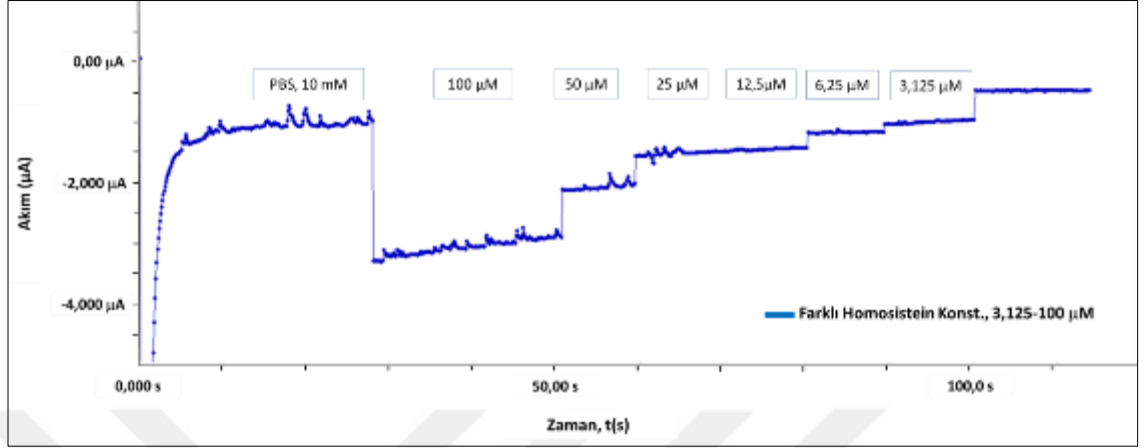
1	SPE Elektrot	Karbon (4 mm çap), Karşıt elektrot: Karbon, Referans Elektrot: Karbon, Elektrik bağlantı noktaları: Gümüş, Boyutları: L33 x W10 x H0.5
2	Kokteyl; KFCNT-M	(W/W) %40 Kitosan+1 + %40 Ferrosen+ %20 CNTM harmanı, 16 saat boyunca karıştırma (kitosan ayrıca en az 4 saat karıştırma oda ısısında). Her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.
3	Harmanın kaplama miktarı	5 µL yüzeye, damlatma tekniği, 30 dakika oda ısısında kurutma (çözücülerin uçurulması)
4	GA (Guteraldehit)	%0,125, oranında, 5µL yüzeye, 30 dakika oda ısısında kurutma ((çözücülerin uçurulması)
5	Enzim	5 mg/mL 0,1 mM PBS pH:7.20, 5 µL damlat, 3 saat buzdolabında +4 derecede.
6	Elektrot saklama koşulları	Kullanılmadığında buzdolabında saklanmalı.

4.2. Biyosensörün Performans Özellikleri

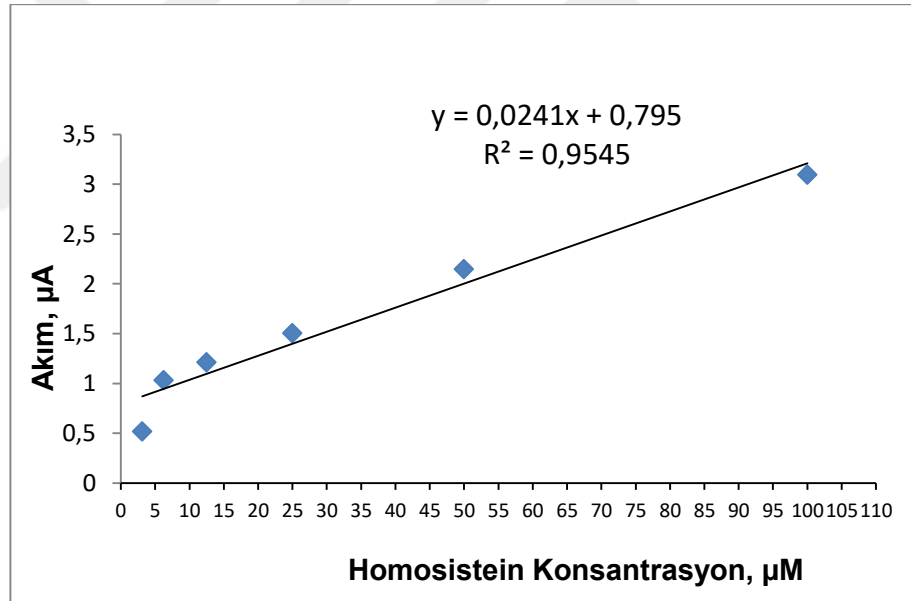
4.2.1. Amperometrik Homosistien Biyosensörün Kalibrasyon Grafiği ve Tayin Limiti

Amperometrik homosistein biyosensörün kalibrasyon grafiği, Kronoamperometri modülünde, 3,125 µM -100 µM konsantrasyon aralığında 10 mM PBS pH:7,40

içerisinde hazırlanmış olan homosistein standart çözeltilerine karşı alındı. Alınan ölçümün ekran görüntüsü Şekil 4.5’de, bu verilerden elde edilen kalibrasyon grafiği de Şekil 4.6’de sunuldu.



Şekil 4.5. Amperometrik Homosistein Biyosensörün, 3-100 µM Homosistein Konsantrasyonuna Karşı Verdiği Cevabın Ekran Görüntüsü



Şekil 4.6. Amperometrik homosistein biyosensörün kalibrasyon grafiği

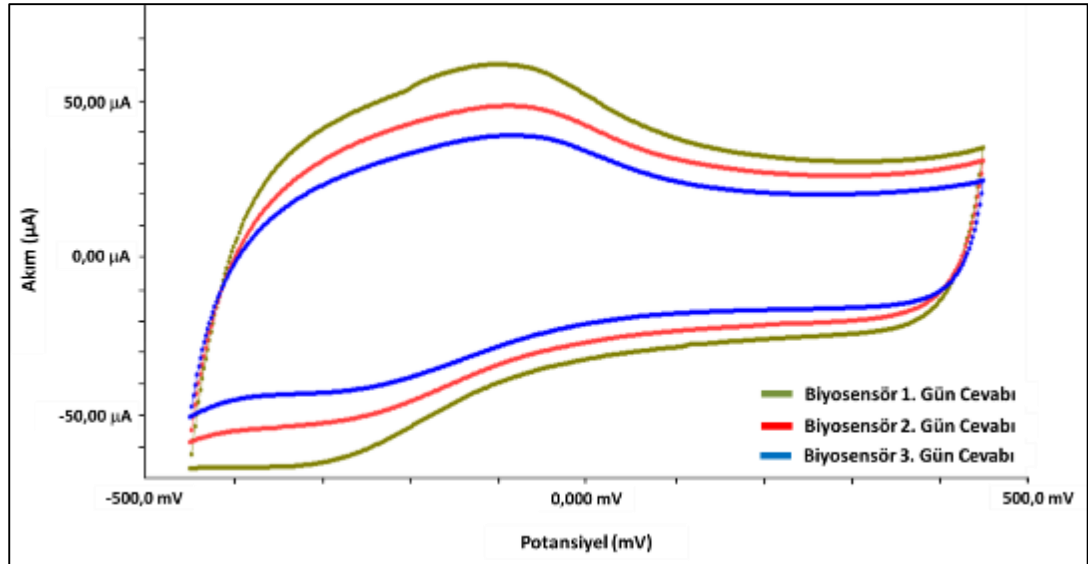
Bu grafik dikkate alınarak elde edilen LOD değeri (3xStandart Sapma); 0,655 µM, LOQ değeri (10xStandart Sapma); 2,184 µM olarak hesaplandı. Grafiğin standart sapması excel’de (Tablo 4.2) hesaplandı.

Tablo 4.2. Standart Sapmanın Hesaplanması

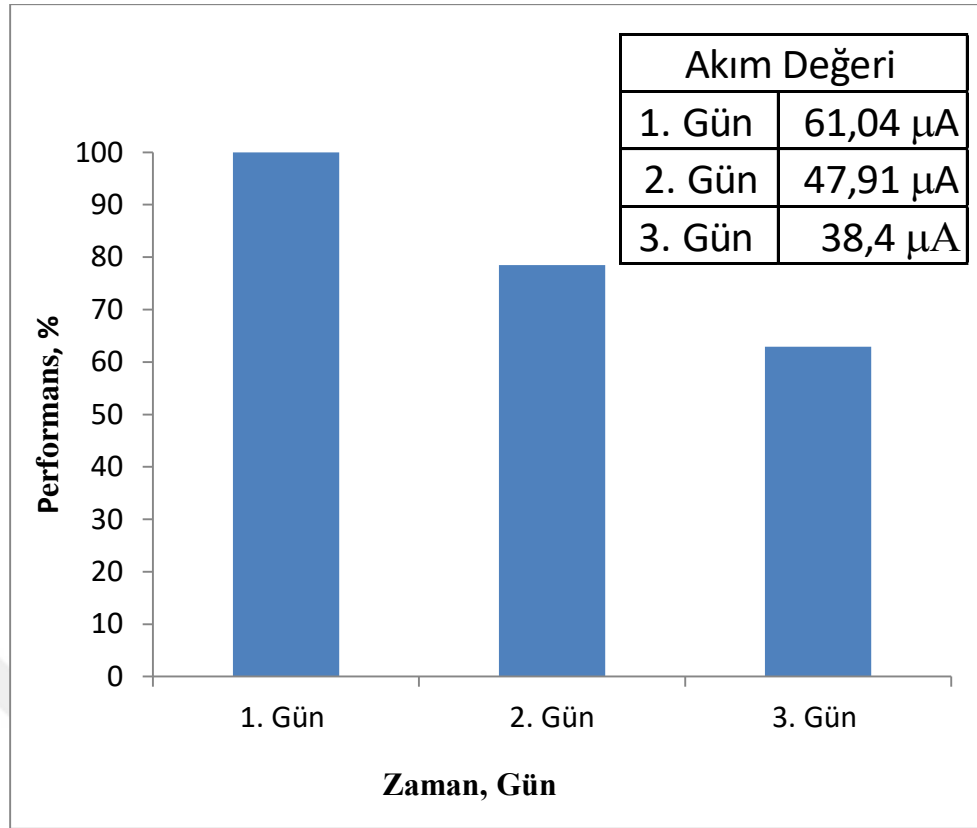
ÖZET ÇIKIŞI									
Regresyon İstatistikleri									
Çoklu R	0,976980784								
R Kare	0,954491453								
Ayarlı R Kare	0,943114316								
Standart Hata	0,218383913								
Gözlem	6								
ANOVA									
	df	SS	MS	F	Anlamlılık F				
Regresyon	1	4,0011087	4,001109	83,895577	0,00078873				
Fark	4	0,190766134	0,047692						
Toplam	5	4,191874833							
	Katsayılar	Standart Hata	t Stat	P-değeri	Düşük %95	Yüksek %95	Düşük 95,0%	Yüksek 95,0%	
Kesişim	0,794975124	0,124187903	6,401389	0,0030585	0,45017423	1,13977602	0,4501742	1,139776019	
X Değişkeni 1	0,024132822	0,002634745	9,159453	0,0007887	0,0168176	0,03144805	0,0168176	0,031448046	

4.2.2. Tekrarlanabilirlik

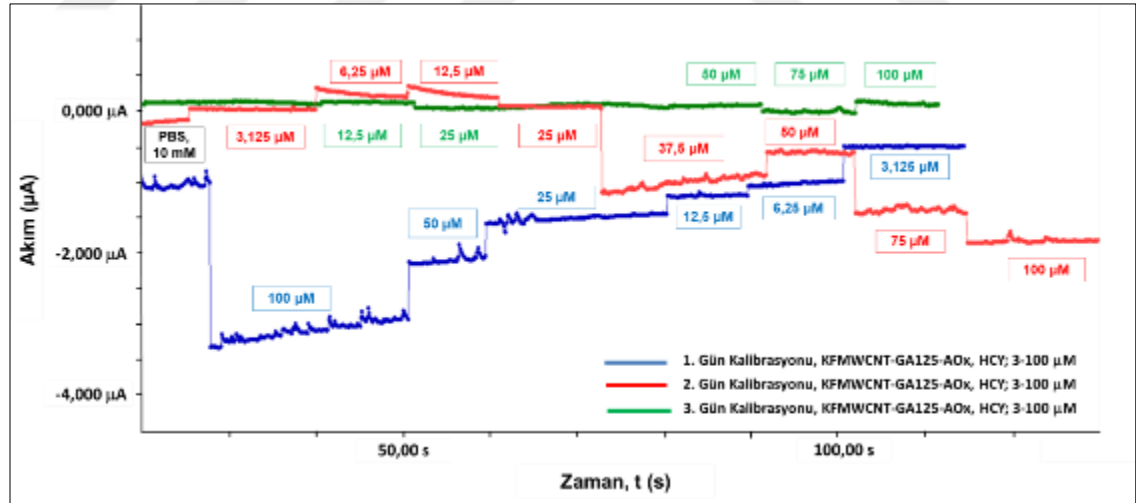
Geliştirilen biyosensörün 3 gün boyunca CV'si alındı. 3. gün alınan CV 'de %40 oranında cevap aralığında azalma olduğu gözlemlendi. 3. gün alınan ölçüm sonrasında da farklı derişimlerdeki substrata cevap vermediği (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, 4.10) gözlemlendi. Bu nedenle 4. ve devam eden günlerde CV'si alınmadı.



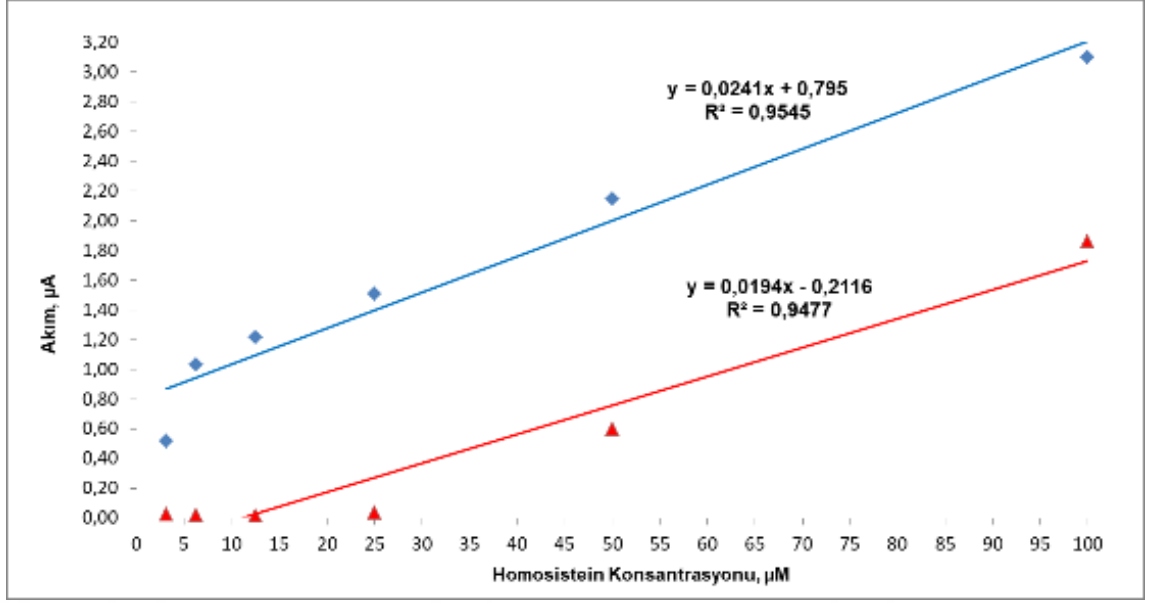
Şekil 4.7 Amperometrik homosistein biyosensörünün tekrarlanabilirliğini gösteren siklik voltajram



Şekil 4.8. Amperometrik homosistein biyosensörün 10 mM PBS'e karşı verdiği cevabın % olarak performansı



Şekil 4.9. Amperometrik homosistein biyosensörün 1.,2.,3. kalibrasyon ölçümüne dair ekran görüntüsü



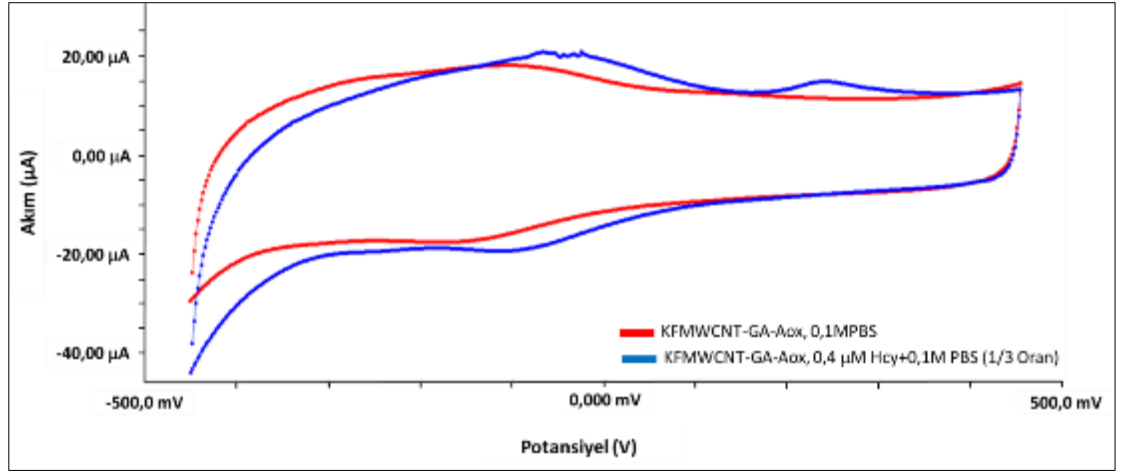
Şekil 4.10. Amperometrik homosistien biyosensörünün 1. ve 2. günkü kalibrasyon grafiklerinin karşılaştırılması; 3,125 -100 µM Hcy, 10 mM PBS, pH:7,20 içerisinde.

Bu verilere göre geliştirilen biyosensörün, tek kullanımlık ya da maksimum 2 kez kullanılabilir olduğu öngörülebilir.

4.2.3. Doğruluk ve Amperometrik Homosistein Biyosensörün Gerçek Numunelere Uygulanması

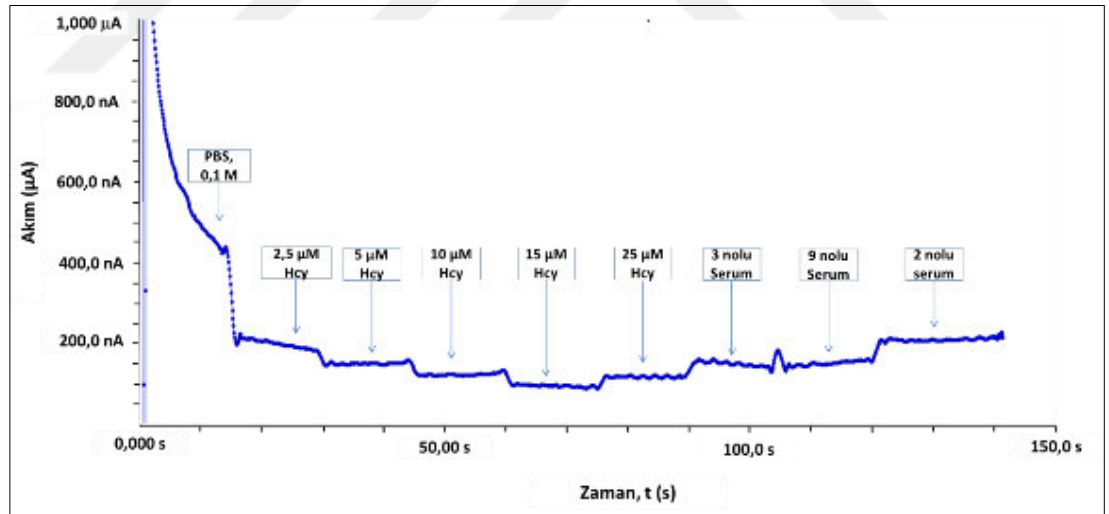
Amperometrik homosistein biyosensörün doğruluk tayini gerçek numunelere uygulanarak yapıldı. Bu amaçla Marmara Eğitim Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarından temin edilen ve Homosistein içeriği HPLC cihazı ile belirlenmiş plazma örnekleri kullanıldı.

Amperometrik homosistein biyosensörün kalibrasyon grafiği, biyolojik ortama benzeştirilerek oluşturulan matris kullanılarak hazırlanan standart homosistein çözeltileri ile oluşturuldu. Matris ortamı, en düşük (4 µM seviyesinde) düzeyde homosisten içeren serumun, 0,1 M PBS, pH.7,40 ile 1/3 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Şekil 4.11'deki CV'leri incelendiğinde, matrisin benzeştirilmesi ile daha keskin bir yükseltgenme indirme pikinin olduğu görüldü.

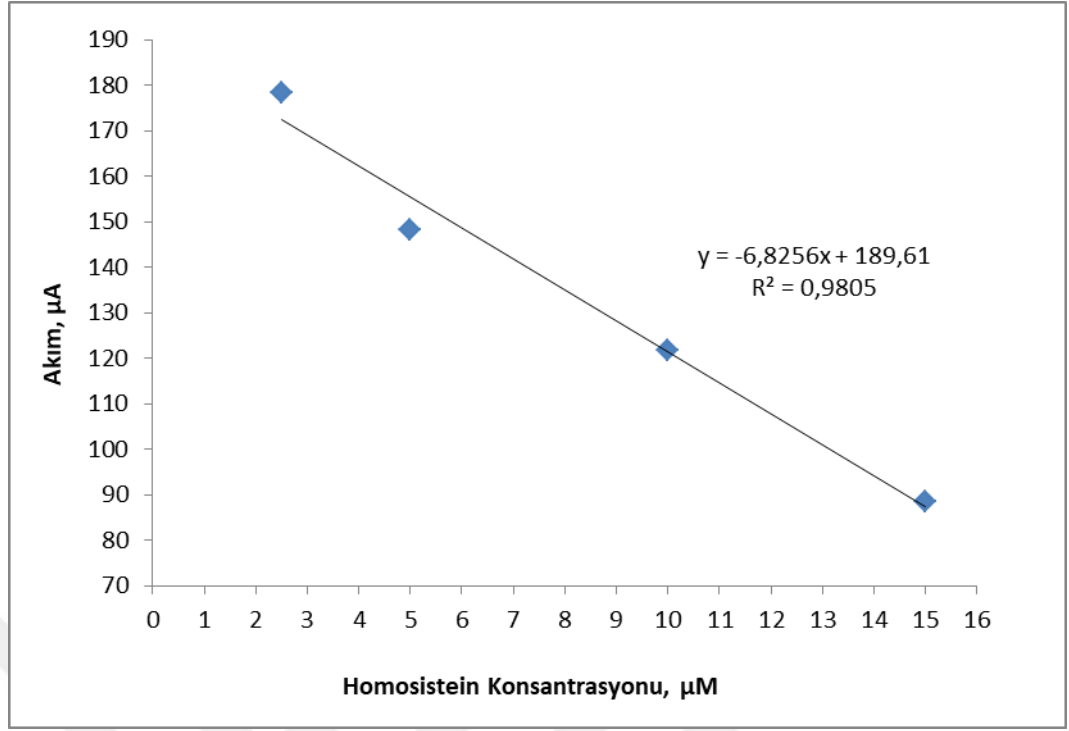


Şekil 4.11. Amperometirk homosistein biyosensörün 0,1 M PBS içindeki ve 0,1 M PBS + 1/3 oranında 4 µM Hcy serum matrisi ortamındaki CV'lerinin karşılaştırılması

Bu matris içerisinde hazırlanmış olan 2,5; 5,0; 1,00; 15,0; 25,0 µM Homosistein konsatrasyonuna sahip standart çözeltiler, amperometirk homosistien biyosensör ile damlatma yöntemiyle ölçüldü ve Şekil 4.13'de sunulan kalibrasyon grafiği elde edildi. Şekil 4.12'de ise, Kronoamperometri'de alınmış olan kalibrasyonun ve devamındaki gerçek numune ölçümlerini gösteren ekran görüntüsü sunuldu.



Şekil 4.12. Anperometirk homosistien biyosensörün 0,1 M PBS (2/3) + 4 µM Hcy(1/3) matrisi kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon grafiği ve gerçek numune ölçünü gösterien ekran görüntüsü.



Şekil 4.13. Gerçek numune homosistein tayini kalibrasyon grafiği

Standart çözeltilerin devamında enzim biyosensör yüzeyine 9 ve 3 numaralı serum örnekleri sırasıyla damlatıldı ve gerçek numune ölçümleri gerçekleştirildi. Şekil 4.13'deki kalibrasyon grafiği kullanılarak serumların homosistein miktarları hesaplandı. Elde edilen değerler Tablo 4.3'de sunulmuştur.

Tablo 4.3. Amperometrik homosistein biyosensör ile serum örneklerindeki homosistein miktarının amperometrik olarak yapılan ölçüm sonuçları

Kullanılan Plazma Örnek No	HPLC İle Ölçülen Değer, µM	Geliştirilen DAAOx Enzim Biyosensör ile Ölçülen Değer, µM	% Hata
3 Nolu Serum	6,52	6,90	%5,9
9 Nolu Serum	8,08	7,44	%7,9

Geliştirilen biyosensör ile %10 hatanın altında ölçüm alındığı gözlemlendi.

4.3. İyontoforez Çalışmaları

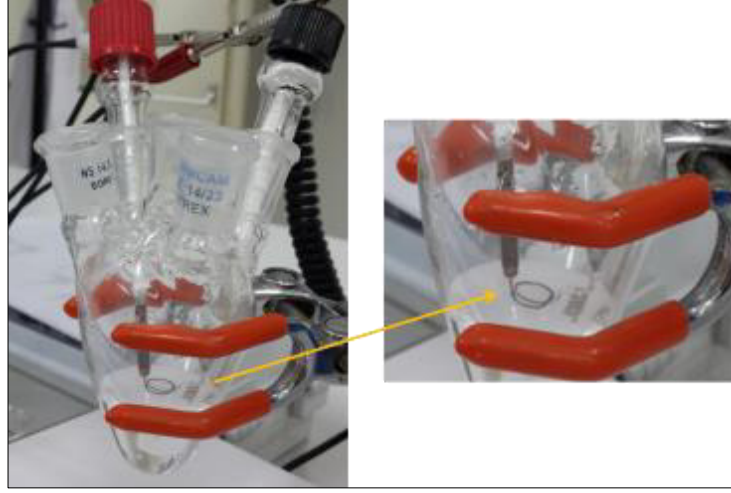
4.3.1. İyontoforez Elektrotların Hazırlanması

İyontoforez elektrodun hazırlanmasında, GAMRY600 potansiyostat/golvanostat cihazı ve bu cihazın *Cronopotantiometry* ve *Cronoamperometry* modülleri kullanıldı. İyontoforez elektrotların hazırlanmasında literatürden elde edilen genel bilgiler ışığında (Brewer ve Brown, 2009) öncelikle (*akım uygulanarak*) kaba bir deneme yapıldı; 0,1 M HCl çözeltisine daldırılmış 4,5 cm uzunluğunda, 1,2 mm çapında gümüş tel ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılarak 15 dakika boyunca (*Cronopotantiometry*) akım uygulandı. Akım miktarı fazla geldiğinden gümüş tel yüzeyinde $\text{AgCl}_{(k)}$ oluşumu gözlemlendi. Reaksiyonun gerçekleştiği hücre Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



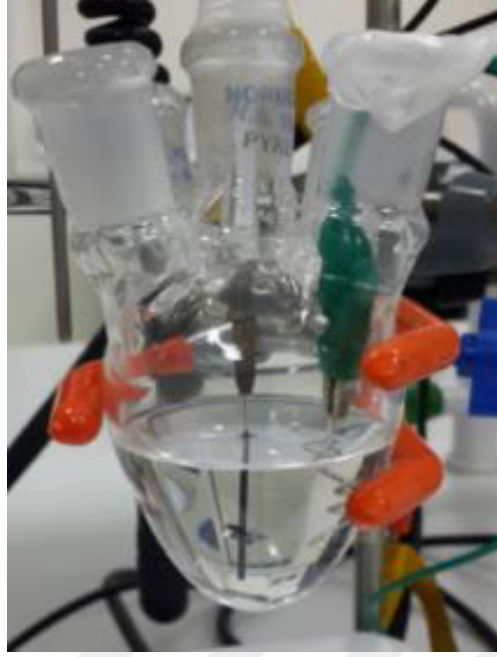
Şekil 4.14. İyontoforez elektrotların hazırlanması- reaksiyon hücresi

Aynı fiziksel şartlara sahip deneme, bu kez belirli bir miktarda akım uygulanarak tekrarlandı ve bu şartlarda sağlıklı bir kaplanın elde edildiği gözlemlendi (Şekil 4.15). Sistemde 10 dakika boyunca, 338,0 μA (4,5 cm boyunda, 1,2 mm çapında gümüş tel; akım uygulanan alan; 1,7 cm^2), akım uygulandı ve sistemde 0,6 V’ luk bir potansiyel oluştuğu gözlemlendi. Bu kapsamda, Gamry 600- *Cronoamperometry* modülünde, 0,5 V sabit voltaj altında 2,5; 5,0; 10 ve 15 dakika boyunca (her biri ayrı zamanlarda) iyontoforez elektrot hazırlama işlemi yapıldı.



Şekil 4.15. Miktarı belirli bir akım uygulandığında, reaksiyonun gerçekleştiği hücre

Sabit potansiyel altında hazırlanan elektrotların, yapılan ters-iyontoforez denemesinde deforme olmasına bağlı olarak bu kez sabit akım uygulanan şartlarda iyontoforez elektrot hazırlama denemeleri yapıldı. Bu denemelerde elektrotlar literatürden (glukoz ve laktatın ters-iyontoforez çalışması için) faydalanılarak hazırlandı (Lee vd, 2010). Bu kapsamda, öncelikle farklı çaplarda, yeni gümüş teller temin edildi ve 40 mm boyunda bir kesit alınarak, 25 mm'si çözeltiye daldırılacak şekilde ayarlandı. Çözelti olarak 0,1 M HCl çözeltisinden 30 mL kullanıldı ve bu çözeltiden 10 dakika boyunca azot gazı geçirildi. Karşıt elektrot olarak platin tel kullanıldı. Bu deneme, Gamry600-Potansiyostat cihazında, *Cronoamperometry* modülünde, 90 dakika boyunca 314 μA ($\sim 0,4 \text{ mA/cm}^2$ olacak şekilde) akım uygulanarak gerçekleştirildi. Ancak kaplama süresinin çok uzun olmasına bağlı olarak bu süre 30 dakika olarak modifiye edildi (Tablo 3.2). Bu kaplama işlemi sırasında kullanılan düzenek Şekil 4.16'da sunulmuştur. Hazırlanan bu (Tablo 3.2'de şartları sunulan) iyontoforez elektrotlar homosisteinin ters- iyontoforez ile ekstrakte edilmesinde kullanıldı.



Şekil 4.16. İyontoforez elektrot hazırlanması reaksiyon hücresi; 90 dakika boyunca 314 μ A akım uygulaması

4.3.2. İyontoforez Hücresi

Ters iyontoforez çalışmalarında kullanılmak üzere, Şekil 4.17’de gösterilen düzenek geliştirildi. Bu hücrenin geliştirilmesinde, Connolly vd, (2002) tarafından yapılmış çalışmadan faydalandı; Anot ve Katot hücreleri maksimum 750 μ L hacme sahip 1 cm çapında plastik borular kullanılarak hazırlandı. Alt çözelti ve anot/katot kuyucukları arasında ayırıcı membran olarak selüloz ester kullanıldı. Selüloz ester, pleksi glass malzemeden yapılmış bir kaseye sıkıştırılarak derinin alt kısmını ve üst kısmını temsil eden düzenek oluşturuldu. Alt çözelti kabının toplam hacmi 30 mL olarak ayarlandı. Aparat bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi ve alt çözeltinin içerisinde bir balık yerleştirilerek ters iyontoforez işlemi sırasında çözeltinin karıştırılması sağlandı.



Şekil 4.17. Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere tasarlanmış ve kurulmuş ters-iyontoforez hücresi

4.3.3. Ters İyontoforez Çalışmaları

4.3.3.1. İyontoforez Sırasında Elektrotların Bozunma Sınırının Belirlenmesi

Şekil 4.17’de verilen şartlarda, ters iyontoforez işlemi uygulanarak elektrotların ve selüloz ester membranın, uygulanan akım şartlarındaki davranışları gözlemlendi. Elde edilen veriler Tablo 4.4’ de sunulmuştur. Başlangıçta, 0,1, 0,2; 0,3 mA /cm² akım yoğunluğu değerlerinin her birinde elektrotların deforme olma durumunun gözlenmesi hedefleniş olsa da, deneme çalışmalarına 0,1 mA/cm², 15 dakika ters iyontoforez şartlarının daha üstündeki değerlerde devam edilemedi. 15 dakika, çok az da olsa çökelek oluşumu ve deformasyonun gözlemlendiği ilk değerdir ve bu değer sınır değer olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.4. Akım yoğunluğu ve süreye bağlı olarak iyontoforez elektrotların deformasyon durumunun gözlenmesi

Deneme	Uygulanan akım yoğunluğu	Akım uygulama süresi	Elektrodu deformasyon durumunun gözlenmesi
Deneme-1	0,1 mA / cm ²	5 dakika	İyontoforez elektrodun, (-) kutbunda deformasyon gözlenmedi. Buna bağlı olarak (+) kutuptaki elektrot üzerinde birikme de gözlenmedi ve (+) kutuptaki selüloz ester membran üzerinde herhangi bir deformasyon gözlenmedi.
Deneme-2	0,1 mA / cm ²	10 dakika	İyontoforez elektrodun, (-) kutbunda <i>hafif düzeyde</i> deformasyon gözlendi. Buna bağlı olarak (+) kutuptaki elektrot üzerinde birikme gözlenmedi ancak (+) kutuptaki selüloz ester membran üzerinde <i>hafif düzeyde bir tortu oluştuğu</i> gözlendi.
Deneme-3	0,1 mA / cm ²	15 dakika	İyontoforez elektrodun, (-) kutbunda deformasyon gözlendi. Buna karşın (+) kutuptaki elektrot üzerinde birikme gözlenmedi, ancak (+) kutuptaki selüloz ester membran üzerinde <i>hafif düzeyde sarımsı rengi belli olan bir tortu oluştuğu</i> gözlendi.

Burada verilen deneme modeli, ilerleyen çalışmalarda, iyontoforez elektrotların, farklı akım yoğunluğu şartlarındaki deformasyon durumlarının ortaya konulması için kullanıldı.

Tez çalışması kapsamındaki ters iyontoforez çalışmalarında, Tablo 3.2.' de sunulan modifiye yönteme göre hazırlanmış iyontoforez elektrotlar (her bir denemede yeni bir çift iyontoforez elektrot), Şekil 4.17' de sunulan ters iyontoforez hücresi, Şekil 4.17'de belirtilen şartlar kullanılarak denemeler yapıldı. Bu sistem üzerinde akım yoğunluğu, iyontoforez süresi ve homosistein konsantrasyonu parametreleri değişken olarak kullanıldı ve bu sayede sistemin optimizasyon parametreleri netleştirildi. Diğer taraftan ters iyontoforez çalışmalarından elde edilen ekstraktlar referans yöntem olarak seçilen HPLC'de analiz edilerek, alt çözeltide kullanılan standart homosistein miktarına karşılık, üst çözeltiye geçmesi beklenen homosistein miktarının varlığı ortaya konuldu.

4.3.3.2. HPLC Analizi Bilgileri

HPLC, homosistein tayin yöntemleri içerisinde yer almaktadır. Bu kapsamda yapılan ters iyonotoforez çalışmalarından elde edilen ekstraktlar ve ilgili diğer numuneler, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Anabilim Dalı bünyesinde yer alan HPLC Laboratuvarında analiz edildi. Laboratuvar kapsamında kullanılan HPLC cihazı ve kullanılan kitin ilgili özellikleri aşağıdaki Tablo 4.5’ de sunulmuştur.

Tablo 4.5. HPLC testlerine yönelik gerekli bilgiler

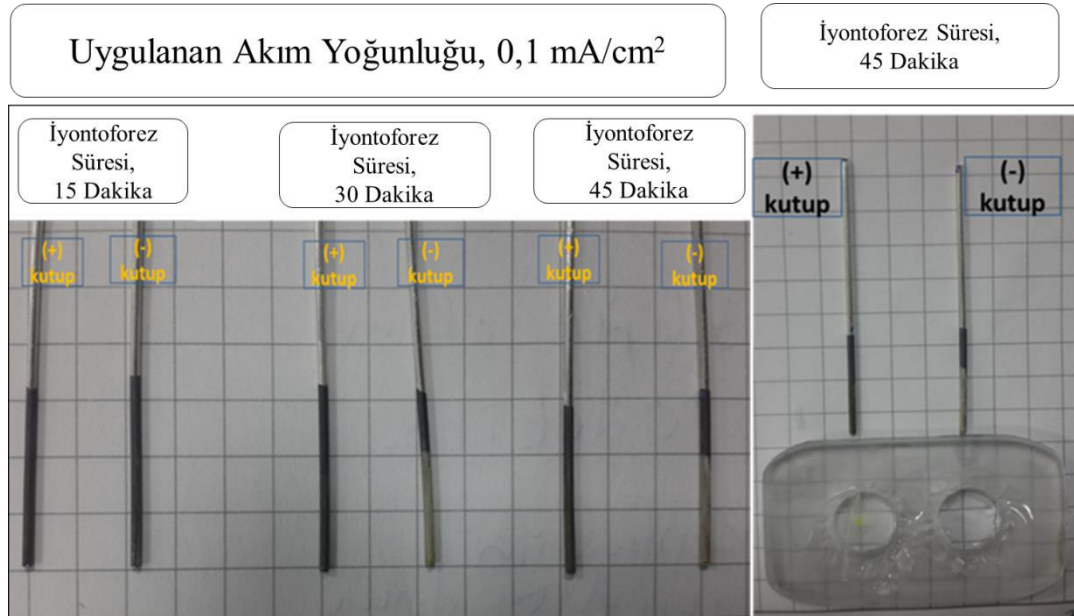
HPLC Analizi Bilgileri	
HPLC Analizlerinin Yapıldığı Laboratuvar	Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Anabilim Dalı, HPLC Laboratuvarı
Kullanılan Cihaz bilgisi	Shimatzu, DGU-20A
	RF -10A XL,Flouresence Detektor
	CTO -10AS VP, Column Over
Kullanılan Kolon	VERTICAL Marka, VertiSep, Silica Based HPLC Column
Kullanılan Taşıyıcı Faz	Veri yok
Kullanılan Kit	IMMUCHROM -Homocysteine UBB No: 4260154632816 HPLC-Test system for the determination of homocystine in plazma and serum
Kitin spesifikasyonları (Validation data)	<i>Precision and reproducibility</i>
	<i>Intra-Assay CV</i> 0,9 % (8,7 µmol/L)
	1,0 % (23,4 µmol/L)
	<i>Inter-Assay CV</i> 3,5 % (8,9 µmol/L)
	1,7 % (23,2 µmol/L)
	Lenearity up to 1000 µmol/L)
	<i>Detection time</i> 0,3 µmol/L
	Recovery 97,30%
	Homocysteine values
Referans Aralıklar (Reference intervals)	< 15 µmol/l Normal value
	15-30 µmol/l Lack of vitamins

31-100 $\mu\text{mol/l}$	Indication of heterocygote homocysteinemia
> 100 $\mu\text{mol/l}$	Indication of homocygote homocysteinemia

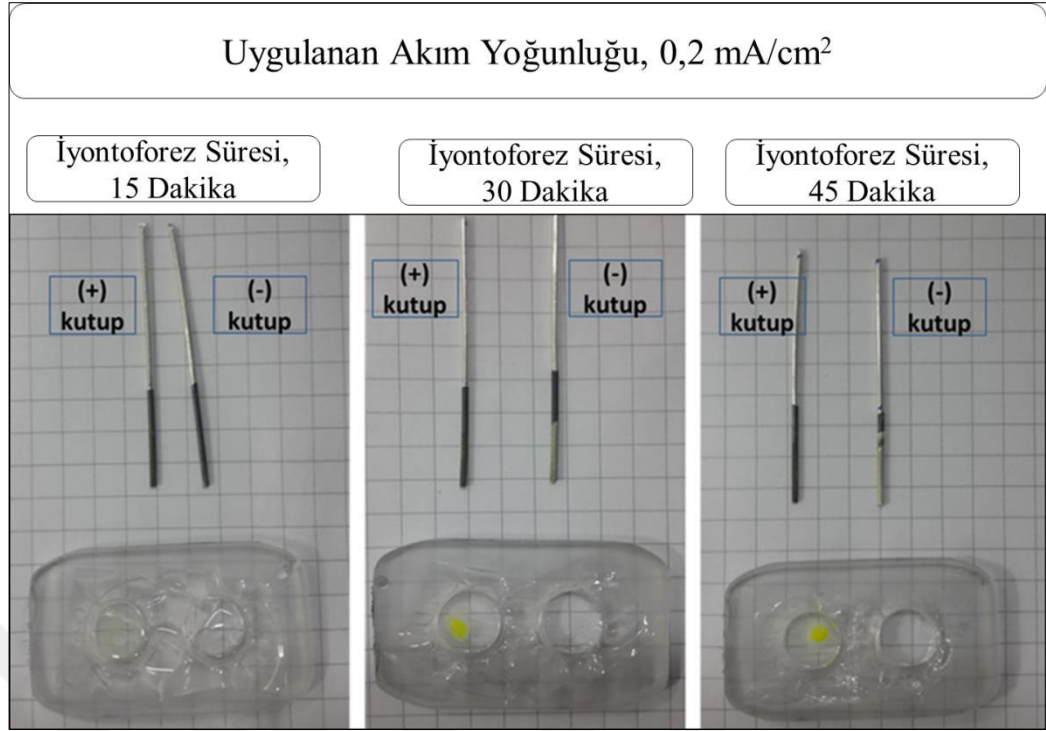
HPLC cihazında, Tablo 4.5’ de bilgileri sunulan kit kullanılarak, ters iyontoforez yönteminden elde edilen ekstraktlar ve tez çalışmasında kullanılan gerçek numuneler analiz edildi.

4.3.3.3. İyontoforez Süresi Ve Akım Miktarının Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Bu iyontoforez çalışmasında, yüksek homosistein konsantrasyonlarında üst çözeltiye geçen homosistein miktarının, zamana ve uygulanan akım değerine bağlı değişiminin gözlenmesine yönelik bir deneme yapıldı. Bu kapsamda, 200 μM homosistein içeren alt çözelti hazırlanarak iki farklı akım yoğunluğu (0,1 mA /cm² ve 0,2 mA /cm²) ve üç farklı sürede (15, 30, 45 dakika) ters iyontoforez işlemi uygulandı. Bu denemelerde, elektrot yüzeyinde ve selüloz ester membranda meydana gelen deformasyon durumları da incelendi (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Bu denemelerde, her iyontoforez işleminde, selüloz ester membran değiştirildi.



Şekil 4.18. 0,1 mA /cm² akım uygulanarak farklı sürelerde gerçekleştirilen ters iyontoforez işleminde elektrot ve membran deformasyon durumu



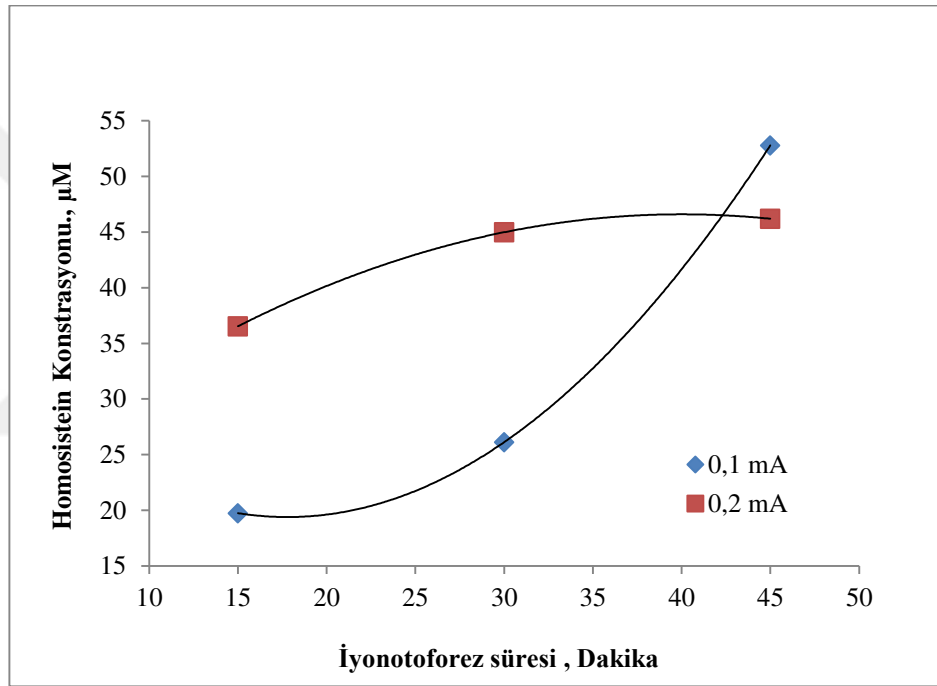
Şekil 4.19. 0,1 mA /cm² akım uygulanarak farklı sürelerde gerçekleştirilen ters iyontoforez işleminde elektrot ve membran deformasyon durumu

0,2 mA /cm² akım yoğunluğu, 15 dakika ters-iyontoforez şartlarında herhangi bir deformasyon ve çökelek gözlenmedi. Ancak bu süre 30 dakika olduğunda elektrot ve membran yüzeyinde deformasyon ve ayrıca membran yüzeyinde bariz bir sarı çökelek gözlemlendi. 45 dakikadaki durumun da 30 dakikadaki duruma benzer olduğu gözlemlendi.

0,1 mA /cm² ve 0,2 mA /cm² akım değerlerinde, elde edilen veriler Tablo 4.6.'da, bu verilerden yola çıkılarak elde edilmiş olan grafik de Şekil 4.20'de sunulmuştur. 0,1 mA /cm² akım yoğunluğunda yapılan deneylerde, öncelikle 45 dakika iyontoforez süresindeki davranış incelendi ve elektrot yüzeyinde deformasyon gözlenmesine rağmen, membranda çok düşük oranda bir deformasyon gözlemlendi. Diğer taraftan, 30 dakika iyontoforez süresinde, elektrot yüzeyinde deformasyon gözlenirken 15 dakika iyontoforez süresinde deformasyon gözlenmemiştir.

Tablo 4.6. Farklı iyontoforez sürelerinde, 0,1 mA / cm² ve 0,2 mA/cm² şartlarında elde edilen ekstraktların HPLC sonuçları

(İyontoforez öncesi alt çözelti, Hcy. Konst. µM)			200		
İynotoforez süresi, dakika			15	30	45
HPLC Sonuçları	Uygulan akım yoğ: 0,1 mA /cm ²	Üst Çözelti (-) kutup konst., µM	19,75	26,12	52,79
		Üst Çözelti (+) kutup konst., µM	9,81	21,39	2,33
	Uygulanan akım yoğ: 0,2 mA/cm ²	Üst Çözelti (-) kutup konst., µM	36,50	44,99	46,19
		Üst Çözelti (+) kutup konst., µM	2,09	6,93	8,39



Şekil 4.20. Ters iyontoforez süresi ve farklı akım değerlerinde ekstrakte edilen homosistein ilişkisi

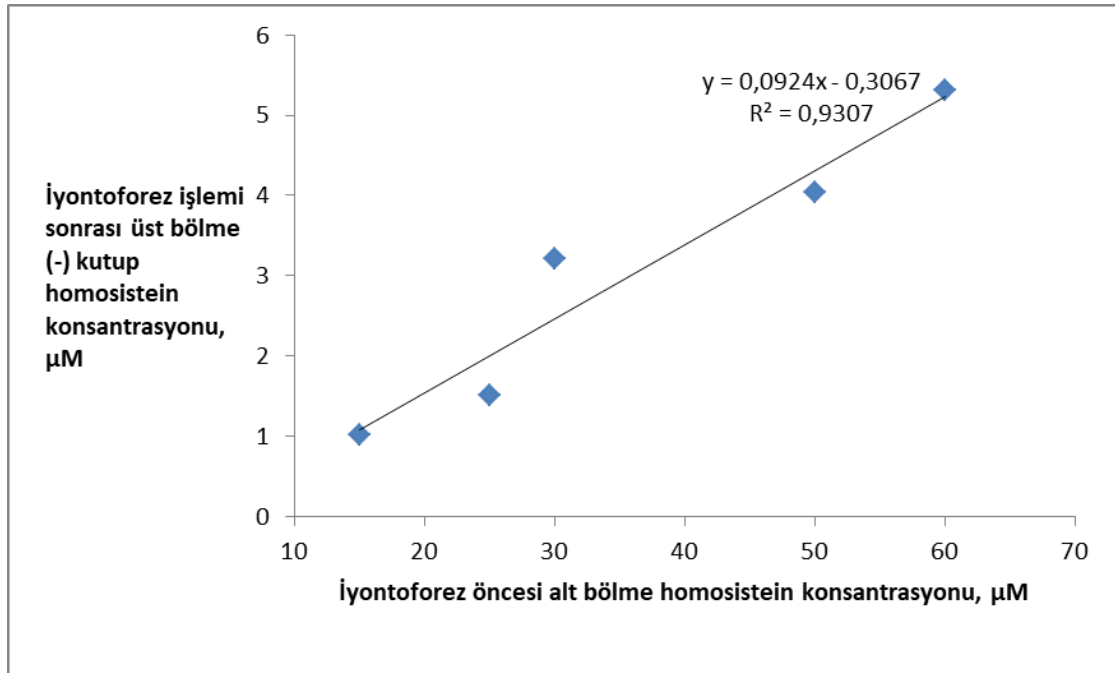
Şekil 4.20'de görüldüğü gibi, 0,2 mA/cm² akım yoğunluğunda daha fazla homosisteinin üst çözeltiye ekstrakte olduğu gözlemlendi. Ancak ekstraksiyon sürelerine bağlı olarak, 0,1 mA/cm² değerinde giderek artan bir eğilim gözlenirken, 0,2 mA/cm² de ekstraksiyon süresine bağlı olarak sabitlenen bir eğilim olduğu gözlemlendi. Alt çözeltideki homosistein miktarı akım ve ekstraksiyon sürelerinin etkilerinin daha net izlenmesi için 200 µM olarak tercih edildi

4.3.3.4. Homosistein Konsantrasyonunun Ekstraksiyon Verimine Etkisi

0,1 mA /cm² akım yoğunluğunda, 15 dakika boyunca, homosisteinin 15, 25, 30, 50 ve 60 µM konsantrasyon değerlerinde 5 farklı ters iyontoforez işlemi uygulandı. Bu denemelerde, elektrot yüzeyinde ve membranda herhangi bir deformasyon gözlenmedi, sarı çökelek gözlenmedi. Her bir denemede aynı selüloz ester membran kullanıldı, değiştirilmedi. Bu denemede, üst çözeltiler, negatif ve pozitif kutupta biriken ekstratlar HPLC’de analiz edildi. Elde edilen bu veriler Tablo 4.7’de, alt çözeltiden üst çözletiyeye ekstrakte olan farklı konsantrasyonlardaki homosistein ilişkisini gösteren grafik ise Şekil 4.21’de verilmiştir.

Tablo 4.7. Akım yoğunluğu; 0,1 mA/cm², 15 dakika iyontoforez şartlarında elde edilen ekstraktların HPLC sonuçları

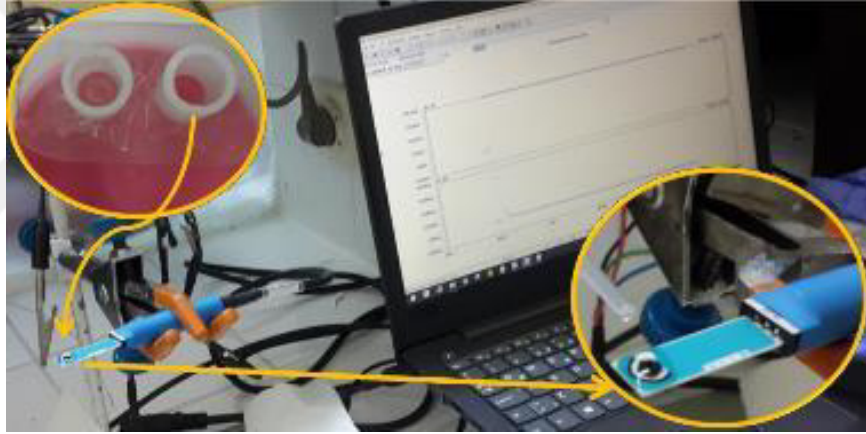
Standart değerler, µM	İyontoforez öncesi alt çözelti, Hcy. Konst.	15	25	30	50	60
Ters İyontoforez sonrası, HPLC Ölçümü, µM	Üst Çözelti (-) kutup konst.	1,02	1,52	3,21	4,04	5,31
	Üst Çözelti (+) kutup konst.	0,48	0,09	0,89	0,47	1,31



Şekil 4.21. Farklı Homosistein Konsantrasyonlarında, Alt ve Üst Çözelti (-), Homosistein düzeyleri arasındaki ilişki

4.4. Ters İyontoforez İle Elde Edilen Ekstraktların Geliştirilen Amperometrik Homosistein Biyosensör İle Tayin Edilmesi

Geliştirilen biyosensör ile tayin yapmak için, Bölüm 4.3.2’de çalışılan ve belirlenen iyontoforez şartları kullanılarak, 0,1 mA/cm² akım uygulanarak, 15, 30, 45 ve 60 dakika süreleri kullanılarak 4 farklı iyontoforez denemesi yapıldı. Her bir ters iyontoforez denemesinden elde edilen (-) kutupta biriken ekstraktlar, Bölüm 4.1.5’de verilen protokole uygun olarak hazırlanan ve Bölüm 4.2.3’de elde edilen ölçüm sonuçlarına göre gerçek numunelerde %10 hatanın altında sonuçlar veren D-aminoasit enzim biyosensör ile analiz edildi. Ekstraktların analizi, iyontoforez düzeneğinin (-) kutbunu temsil eden kuyucuktan bir pipet yardımı ile alınarak SPE-AAOx enzim biyosensörün yüzeyine damlatılması suretiyle gerçekleştirildi (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Amperometrik homosistein biyosensörü ile damlatma yöntemiyle homosistein tayini

Ters iyontoforez şartları ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.8.’de sunulmuştur.

Tablo 4.8. Ters iyontoforez şartları ve elde edilen ekstraktların hazırlanan biyosensörlerle ölçülmesi ile elde edilen veriler

İyontoforez No	İyontoforez Şartları		Biyosensörden elde edilen ölçüm sonucu, μM
	Hcy Konsantrasyonu, μM	İyontoforez Süresi, dakika	
İyontoforez -1	100 μM	15 dakika	3,28
İyontoforez -2	100 μM	30 dakika	8,54

İyontoforez -3	100 µM	45 dakika	9,63
İyontoforez -4	50 µM	60 dakika	11,55

100 µM Hcy'nin alt çözeltide kullanıldığı durumda, 0,1 mA/cm² akım uygulanarak gerçekleştirilen iyontoforez işleminde süreye bağlı olarak oransal bir ekstraksiyon olduğu gözlemlendi.



4.5. Tartışma

4.5.1. Amperometrik Homosistein Biyosensörü

- Tez çalışmasında kullanılan SPE elektrot; üçlü elektrot sistemini kompakt bir şekilde bir arada barındırması, yüzey modifikasyonuna uygun olması, 20-100 µL hacimdeki örneklerle çalışma imkânı sunması yönleriyle ters iyontoforezden elde edilen ekstraktların tayin edilmesi için uygun bir elektrot türüdür (Counto vd, 2016). Bu avantajından dolayı, SPE elektrot, tez çalışmasında, ters iyontoforez üst çözeltiyi barındıran kutucuklarının hacminin 250 µL olarak tasarlanmasını sağlamıştır. Bu sayede ekstraktların seyrelme oranının azalmasını ve biyosensörün çalışma aralığına denk gelecek ekstraktların elde edilmesine katkı sağlamıştır.
- Kompak yapısı ve küçük hacimlerle çalışması yanında, biyosensör uygulamalarında, uyumlaştırıcı bir yüzeye sahip olmasına bağlı olarak birçok nanopartikül ya da polimer ile modifiye edilmeye uygun bir yüzey olması büyük avantaj sağlamaktadır. Tablo 4.9.'da SPE kullanılarak özellikle ilaç sekötründe yapılan çalışmalar için, SPE yüzeyinin CNT ve Nanopartiküllerle modifiye edilmiş biyosensörlerin tayin limitleri verilmiştir (Counto vd, 2016). Tablonun sonunda tez çalışmasında hazırlanan enzim biyosensörün tayin limiti de sunulmuştur. Tez çalışmasında çalışma elektrodu bölgesi karbon olan SPE (SPCE) kullanılmıştır ve bu yüzey bir biyopolimer olan kitosan ve MWCNT kullanılarak modifiye edilmiştir. Geliştirilen amperometrik homosistein biyosensörün tayin limiti tabloda nanomateriyal kullanılarak modifiye edilen biyosensörlerle aynı mertebede ($2,184 \times 10^{-6} M$) olup bir çoğuna göre çok daha düşük bir tayin limiti sunmaktadır.

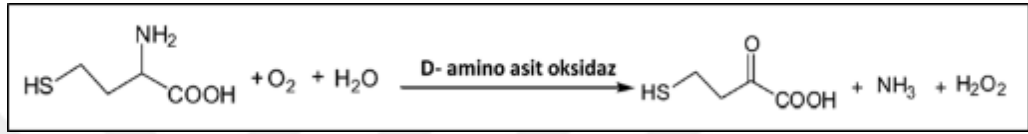
Tablo 4.9. SPE temeline dayanan ilaç sektörüne yönelik çalışılmış biyosensör çalışmaları (Counto vd, 2016)

Analit	Modifikasyon Türü	Kullanılan Ölçüm Tekniği	Tayin Limiti	Matris
SPCE kullanılarak yapılmış farmasötik bileşimlerin tayini için geliştirilmiş biyosensörler				
Parasetamol; Asetaminofen ve askorbik asit	SPCE	Amperometri	5.0×10^{-7} M	Farmasötik Bileşim
Piridoksin, askorbik asit, folik asit	CNT temelli SPCE	Amperometri	8.0×10^{-6} M, 1.1×10^{-5} M 8.0×10^{-6} M	Farmasötik Bileşim
SPE Yüzeyinin Nano Partüklü Kullanılarak Modifiye edilmesiyle geliştirilmiş biyosensörler				
Metimazol	IrOx-NPs-SPE	Kronoamperometri	4.0×10^{-9} M	Farmasötik Bileşim ve insan serumu
SPE Yüzeyinin Enzim Modifiye edilmesiyle geliştirilmiş biyosensörler				
Kodein	CYP450 2D6-SPCE	Kronoamperometri	4.9×10^{-6} M	Farmasötik Bileşim ve insan idrarı
3-β-Hydroxybutyrate	"3-β-Hydroxybutyrate dehydrogenase-SPCE"	Kronoamperometri	2.92×10^{-5} M	Su ortamı
Kodein	Acetylcholinesterase-SPCE	Kronoamperometri	2.0×10^{-5} M	Farmasötik Bileşim ve insan idrarı
Levetirasetam	HRP-SPCE	Kronoamperometri	9.81×10^{-6} M	Farmasötik Bileşim ve insan kan plazması
Katekol	Tyr-MWCNTs-SPE	Kronoamperometri	1.0×10^{-5} M	Aqueous solutions
Ethion	Butyrylcholinesterase-MWCNTs-SPE	Kronoamperometri	3.0×10^{-7} M	ticari örnekler, su ve soyayağı örneği
Homosistein (Bu Tez çalışması)	MWCNT modified SPCE	Kronoamperometri	$2,2 \times 10^{-6}$ M	İnsan Serum, PBS, pH: 7.20

- Tez çalışmasında sunulan biyosensörün yüzey modifikasyonunda, ağırlıkça (W/W) %40 Kitosan, %40 Ferrosen ve %20 MWCNT içeren bir karışım hazırlanmıştır. Bu bileşimin homojen olarak SPE yüzeyinde dağılımının sağlanması için 15 saat boyunca karıştırılmıştır. Bunun yanında bu üçlü bileşenin sensör yüzeyinde iyi bir dağılım “Well Dispersed” sağladığı literatürde belirtilmiştir (Li vd, 2019). Kitosan, ferrosen ve CNT’ nin benzer doğalarından dolayı bir biyosensör yüzeyinde uyumlu bir yapı sergilediği belirtilebilir.
- Kitosan, yapısında çok sayıda $-NH_2$ ve $-OH$ grupları barındırması nedeniyle, uyumlaştırıcı olması yanında, öncelikli olarak tez çalışmasında enzimin yüzeye kovalent bağlanması için tercih edilmiştir. Buna karşın iletkenliği düşük olduğu için yüzeydeki sinyalin de düşük olmasına neden olmaktadır. Şekil 4.1.a ve Şekil 4.1.b ‘de görüldüğü gibi, yüzeyin elektriksel iletkenliği karbon nanotüp kullanılarak artırılmıştır. CNT kullanılmadan yapılan denemelerde gürültü/sinyal oranı çok yüksek olduğundan dikkate değer bir biyosensör sinyali de elde edilememiştir. Şekillerde görülen, Kitosan ve MWCNT piki de bunu desteklemektedir. Karışım içerisinde kullanılan ferrosen, elektro-katalitik etkiye sahip iyi bir mediyör olduğundan enzim reaksiyonu esnasında açığa çıkan elektronların transferinde görev almaktadır.
- KFCNT (W/W, %40, %40, %20) karışımı için optimize edilen bir diğer parametre, kaplama hacmi ve kalınlığıdır. Şekil 4.2’ de, görüldüğü gibi, 10 μ L ile yapılan kaplamalarda yüzeyin elektron transferini etkilendiği, indirgenme-yükseltgenme pikini perdelendiği gözükmemektedir. Bu nedenle tez çalışmasının tamamında 5 μ L kaplama hacmi kullanılmıştır.
- Karbon nanotüpün hem tek katmanlı hem de çok katmanlı türü denenmiş ve Şekil 4.3’ de de görüldüğü gibi, KFCNT (W/W, %40, %40, %20) hazırlanan bileşim oranlarında, çok katmanlı karbon nanotüpün performansının daha iyi olduğu gözlenmiş ve ilerleyen çalışmalarda, çok katmanlı CNT kullanılmıştır.
- Gluteraldehit, enzim biyosensör çalışmalarında çapraz bağlayıcı olarak kullanılmakta olup, tez çalışmasında, % 0,25 yerine, % 0,125 oranında, 5 μ L kaplama yapılarak kullanılmıştır. Şekil 4.4.a ve b’de, 0,125 μ L oranının tez çalışmasında kullanılan KFMWCNT karışımı için daha uygun olduğu belirtilebilir. % 0,125’ten daha yüksek oranda kullanıldığında sensör yüzeyinde

herhangi bir indirgenme-yükseltgenme piki elde edilememiştir. Son aşamada, enzim miktarı 5 mg/mL oranında 5 µL olarak kaplanmıştır.

- Homosistein molekülünün analit olduğu bir ortamda, biyosensör yüzeyinde, homosisteinin ortamdaki oksijeni kullanarak D-aminoasiti katalizlediği bir reaksiyonla bir ketoasit türevine dönüşmesi ve bu esnada H₂O₂'nin açığa çıkması beklenmektedir. Açığa çıkan H₂O₂ ise, ferrosen ile indirgenme- yükseltgenme reaksiyonuna girerek yüzeydeki etkileşimin amperometrik olarak izlenebilen bir sinyale dönüşmesi gerçekleşmektedir. Açığa çıkan hidrojen peroksit miktarı ile homosistein konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur (Zhang vd, 2006; Fan vd,2012).



- Geliştirilen biyosensörün performans özelliklerinin literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılması Tablo 4.9 ve 4.10.'de verilmiştir. Literatürde homosistein tayinine yönelik yapılan çalışmalara ayrıca bakılacak olursa; Ching vd, (2011a) tarafından sunulan çalışmada, plazma homosisteini, hem normal fizyolojik hem de patolojik aralıklarda belirlemek amacıyla D-aminoasit oksidaz enzimi ile entegre edilmiş 8 çalışma elektrodundan oluşan bir “screen-printed” amperometrik biyosensör dizisi (array) geliştirmiştir. Geliştirilen sensör dizisi 6.4–100 µM doğrusal çalışma aralığına sahiptir ve 2 ay gibi uzun bir süre için enzimatik stabiliteye sahiptir. Yapılan bir diğer çalışmada, (Rajaram ve Mathiyarasu, 2018) homosisteinin elektrokimyasal tayinine yönelik AuNP/rGO/GCE elektrot geliştirmişlerdir. Geliştirilen AuNP/rGO/GCE elektrot, 2-14 mM doğrusal çalışma aralığına sahip olup tayin limiti 6,9 µM olarak olarak belirtilmiştir. Gong vd, (2004) tarafından yapılan bir çalışmada ise, nitrik asit ile ön işlem uygulanmış p-CNT/Nafion/GC elektrot geliştirmiş ve geliştirilen elektrotun homosistein oksidasyonuna karşı mükemmel bir elektrokatalitik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Geliştirilen p-CNT/Nafion/GC elektrot, 0.10-60 µM doğrusal çalışma aralığına sahip olup tayin limiti 0,06 µM olarak belirtilmiştir. Tez çalışmasında geliştirilen biyosensörün kalibrasyon aralığı 3,125-100,000 µM olarak gözlenmiştir. R=0,9545'dir. LOD= 0,655 µM, LOQ = 2,184 µM'dır. Bu yönüyle homosistein tayini için geliştirilen sensörden

elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında sensörün mevcutlarla yarışabilir bir performans sergilediği söylenebilir. İlaveten tayin limiti literatürde verilen örneklerle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür.

- Geliştirilen biyosensörün, 3. gün yapılan ölçümlerdeki performansının %40 düzeyine düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Bu yönüyle geliştirilen biyosensörün tek kullanımlık uygulamalar için uygun olduğu belirlenmiştir. Yine Tablo 4.10 incelendiğinde, geliştirilen biyosensörün kullanım sayısı, tekrarlanabilirlik yönüyle literatürdeki örneklere göre iyileştirilmesi gerekmektedir.
- Geliştirilen enzim biyosensörün doğruluk testi, HPLC’de analiz edilmiş olan gerçek numunelerde yapılmıştır (Tablo 4.3.) Geliştirilen biyosensörün gerçek numunelerde ortalama % 6-8 oranında hata ile ölçüm yapabildiği belirlenmiştir.

Tablo 4.10. Geliştirilen amperometrik homosistein biyosensörün literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması

Analit	Kullanılan Enzim	Yüzey İmmobilizasyon Materyali	Enzimin İmmobilizasyon Yöntemi	Kullanılan Transduser Türü	Çalışma pH'sı	Optimum Sıcaklık (°C)	Çalışma Aralığı (µM)	Tayin Limiti (LOD) (µM)	Gözlene bilme sınırı (LOQ), (µM)	Raf ömrü (gün)	Uygulama Alanı	Referans
Glukoz ve D-Alanin	DAAO	Grafit elektrot	Adsorpsiyon	Amperometrik	7,60	30	70–140	30	...	14		(Chi ve Dong, 1995)
L- ve D-amino asitleri	DAAO	Hidroksietil selüloz	Çapraz Bağlama	Amperometrik	8,30	25	1250–16000	1250	...	...	balık sosu	(Loughran vd, 1998)
L- ve D-amino asitleri	DAAO	Rodanize karbon	Çapraz Bağlama	Amperometik-SPCE	7,80	...	200–2000	150	...	56	Meyve suyu ve süt	(Sarkar vd, 1999)
D-alanin ve diğer D-aminoasitler	DAAO	Grafit Elektrot	Çapraz Bağlama	Amperometrik - SPE	7,40		50–200	30	..	10	Meyve suyu ve süt	(Weislo vd, 2007)
D-Aminoasitler	DAAO	"Amberzyme oxirane" destekli	Çapraz Bağlama	Amperometrik	8,00	30	250–5000	250	..	14		(Rosini vd, 2008)

D-Serine	DAAO	Pt-iridyum disk	Çapraz Bağlama	Amperometirk	8,00	30		0.02	..	3		(Zain vd, 2010)
D-alanine	DAAO	DAAO/Pin 5-COOH/ ZnSNPs/Au	Kovalent Bağlanma	Amperometirk	7,50	35	1–3500	0.8	..	120	Meyve suyu	Lata vd, 2012)
Akrilamid	DAAO	CuNPs/PANI/c-MWCNT/AuE	Kovalent Bağlanma	Amperometirk	7,50	35	1–6500	0.5	...	110	Meyve suyu	(Batra vd, 2013)
D-Aminoasitler	DAAO	NiHCNFe/PPy/GC	Çapraz Bağlama	Amperometrik	7,00	30	20–500	1.5	...	60	İnsan serumu ve idrar	(Lata ve Pundir, 2013)
Homosistein	DAAO	yumurta kabuğu zarı	Çapraz Bağlama	...	7,00	20	50-1500	30	...	60	İnsan serumu	(Zhang vd, 2006)
Homosistein	...	pCNT/Nafion/GC		Amperometrik akış analiz	7,00	25	0.10-60	0.06	...			(Gong vd, 2004)

Homosistein		(AuNP/rGO/GCE)	Adsorpsiyon	Amperometirk	7,00	...	2000-14000	6.9	...	...		(Rajaram ve Mathiyarasu, 2018)
Homosistein	DAAO	homosistein biosensör dizisi (SPCE) (GA-AAOx)	Çapraz Bağlama	Amperometik-SPCE	7,00	...	6.4-100	...	...	60	insan serumu	(Ching vd, 2011a)
Homosistein	DAAO	(SPCE) (KFCNT M-GA-DAAO)	Çapraz Bağlama	Amperometrik	7,20		3,125 -100	0,655	2,184	raf ömrü çalışıl madı, en falzla 2 ölçüm kullanımı	İnsan serumu	Tez çalışması

4.5.2. Ters İyontoforez Çalışmaları

Ters iyontoforez çalışmaları, Şekil 3.2.'de sunulan iyontoforez şartları ve bölüm 2.3.3.'de verilen literatür bilgilerinden faydalanılarak geliştirilmiştir. Bu hücrede, Connolly vd, (2002) tarafından yapılan çalışmadaki kritik noktalar esas alınmıştır. Sağlıklı bir elektron transferinin elde edilmesinde, ekstraktların biriktiği anot ve katot hücreleri arasındaki mesafe ve bu hücrelerin çapları önem arz etmektedir. Tez çalışmasında da bu noktalara dikkat edilerek ters iyontoforez hücresi tasarlanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda ayırıcı membran olarak hayvan derisinin (fare, domuz vb.) kullanıldığı (Ching vd, 2011b) çalışmalar da mevcuttur. Ancak tez çalışmasında, hayvan derisinin temin edilmesi ve saklanmasıdaki zorluk yanında, girişim etkilerinin belirsizlikleri nedeniyle kullanılması tercih edilmemiştir. Bunun yerine Connolly vd, (2002)'nin çalışmasında da kullandığı, selolüz ester bir membran tercih edilmiştir. Bunun nedeni, selüloz esterin, pH: 7.0' de negatif bir yük sergilemesi ve nano-gözenekli yapıda olması, derinin in vivo (canlı) şartlarda sergilediği elektriksel iletkenlik özelliklerini sergileyebilmesi gibi, derinin bazı anahtar özellikleri ile benzeşim göstermesidir.

- Ters iyontoforez çalışmalarının önemli bir diğer bileşeni, iyontoforez için kullanılacak olan elektrotların hazırlanmasıdır. Literatürde bu amaca yönelik sunulan yöntemler mevcuttur. Hatta, biyosensör ile entegre bir sistem olarak, geliştirilen biyosensörün hem iyontoforez elektrot olarak hem de tayin için kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (Liu vd, 2011; Ching vd, 2010). Tez çalışmasında bu çalışmalara ilave olarak Brewer ve Brown (2009) ve tarafından kullanılan yöntem de dikkate alınarak Tablo 3.2.'de sunulan protokol belirlenmiştir.
- Ters iyontoforez çalışmalarında insan vücuduna uygulanacak maksimum akım değeri 5 mA/cm^2 olarak sınırlandırılmış (Leboulanger vd, 2004a) olup 15-90 dakika arasında iyontoforez süresinin (Connolly vd, 2002) uygulandığı çalışmalar belirtilmiştir. Tez çalışmasında hazırlanan deney modeli ve yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar Tablo 4.4.'te sunulmuştur. Bu verilere göre, Şekil 3.2.'de tanımlanan iyontoforez hücresi kullanılarak yapılan çalışmalarda, $0,1 \text{ mA/cm}^2$ akım değeri ve 15 dakika iyontoforez süresinde membran yüzeyinde deformasyon olduğu gözlenmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda, $0,1 \text{ mA/cm}^2$ akımda, 5 ve 10 dakika boyunca uygulanan ters iyontoforez işleminde

herhangi bir deformasyon gözlenmezken 15 dakika boyunca uygulanan akım değerinde elektrot yüzeyinde dikkate alınamayacak düzeyde deformasyon olduğu gözlenmiştir.

- Şekil 4.19 ve 4.20 de görüleceği üzere, 15, 30, 45 dakika ekstraksiyon süreleri ve 0,1; 0,2 mA/cm² akım değerleri kullanılarak yapılan denemelerde, 30 dakika ve üzerindeki sürelerde uygulanan akım değerlerinde, elektrot yüzeyinde bariz deformasyon olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan 0,2 mA/cm² akım değerinde 15 dakika boyunca uygulanan ters iyontoforez işleminde çok hafif düzeyde, deformasyon gözlenirken, 30 dakika ve üstündeki sürelerde elektrot yüzeyinde bariz deformasyon gözlenmiştir. Bu durumda; her iki akım yoğunluğu değerinde de 15 dakika ve altındaki iyontoforez sürelerinde, herhangi bir deformasyon olmadan ters iyontoforezin gerçekleştirebileceği görülmüştür. Buna karşın iyontoforez sürelerinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin incelenmesi için 15 dakikanın üstündeki sürelerde ve farklı akım değerlerinde ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.
- Tablo 4.7’de, 15, 30 ve 45 dakika boyunca, sırasıyla 0,1 ve 0,2 mA/cm² akım yoğunluğunda gerçekleştirilen iyontoforezden elde edilen ekstraktların HPLC’de analiz edilmiş miktarları yer almaktadır. Bu denemede sürenin ve akımın etkisini daha net ortaya koymak için 200 µM gibi yüksek bir homosistein miktarı tercih edilmiştir. Şekil 4.21., iyontoforez süresi ve analit arasında, doğrusal bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Literatürde de, üst çözeltiye geçen analit miktarının ekstraksiyon süresiyle doğrusal olarak değiştiği belirtilmektedir (Degim vd, 2003)
- Benzer şekilde, Şekil 4.21.’de görüldüğü gibi, aynı analit konsantrasyonu ve aynı süre şartlarında, uygulanan akım değerinin artırılmasıyla ekstrakte olan analit miktarı arasında da doğrusal bir ilişki mevcuttur.
- Tez çalışmasında, 0,1 mA/cm², 15 dakika iyontoforez şartları sabit tutularak, farklı konsantrasyonlardaki homosistein miktarının ters iyontoforez ile üst çözeltiye geçen miktarları arasındaki ilişki incelenmiştir. Elde edilen ekstraktlar HPLC ile tayin edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.6’ da sunulmuş, aradaki doğrusal ilişki ise Şekil 4.21’deki grafikte verilmiştir. Literatürde de benzer bir doğrusal ilişkinin olduğu çalışmalar mevcuttur (Değim, 2003; Sun vd, 2010; Ching vd, 2011b)

4.5.3. Ters İyontoforez Yöntemi ile Ekstrakte Edilen Homosisteinin Amperometrik Enzim Biyosensör ile Tayini

- Literatürde sunulan çalışmalarda, membran türleri, iyontoforez şartları gibi parametreler, her çalışmada farklılık gösterse de, alt çözeltiden, üst çözeltiye ekstrakte edilen analit miktarları sunulan bu tez çalışması da dâhil olmak üzere bütün çalışmalarda nispeten düşük seyretmektedir (Connolly vd, 2002) (Ching vd, (2011b). Tablo 4.7’de sunulan veriler incelendiğinde, 15 μM homosistein değeri, sağlıklı bireydeki homosistein düzeyini temsil etmekte ve belirlenen iyontoforez şartlarında, üst çözeltiye ekstrakte olan miktarın 1,02 μM olarak gerçekleştiği görülmektedir. Tayin yöntemi olarak HPLC tercih edildiğinde 1,02 μM homosistein düzeyi belirlenebiliyorken, tez çalışmasında geliştirilen biyosensör kullanıldığında, bu değerın biyosensörün tayin limitinin (LOQ; 2,18 μM) altında kaldığı görülmektedir. 0,1 mA/cm² akım değeri ve 15 dakika iyontoforez süresi şartlarında, 30 μM ve üstünde homosistein düzeyine sahip yapıda ters iyontoforezle elde edilen ekstraktın (üst çözeltiye ekstrakte olan miktar; 3,21 μM), geliştirilen biyosensör ile sağlıklı bir şekilde tayin edilebileceği görülmektedir. Geliştirilen biyosensörün tayin limiti, literatürdeki örneklerine göre (Tablo 4.10) oldukça düşüktür. Sağlıklı bireylerdeki homosistein düzeyinin geliştirilen sensörle tayinindeki sorun iyontoforez şartlarında yapılacak iyileştirmeler ile aşılabilecektir.
- Tez çalışmasının son aşamasında, geliştirilen biyosensörle, Tablo 3.2.’de tanımlanan iyontoforez elektrotların ve Şekil 3.2’de belirtilen iyontoforez düzeneğinin kullanıldığı, alt çözelti konsantrasyonu 100 μM ; iyontoforez süresi 15, 30, 45 dakika olan ve alt çözelti konsantrasyonu 50 μM ve 60 dakika ekstraksiyon süresi olan iyontoforez denemelerinden elde edilen ekstraktlar tayin edildi. Bu sonuçlar Tablo 4.8’ de sunulmuştur. Tabloda da görüleceği gibi, ekstraksiyon sürelerinin uzun tutulması durumunda elde edilen ekstraktlar geliştirilen biyosensörün kalibrasyon aralığında ve tayin limitinin üstünde bir değerde yer alarak doğru bir şekilde tayin edilebilmektedir. Diğer taraftan, Şekil 4.20.’de verilen grafiktekine benzer olarak, Tablo 4.8’de sunulan verilere bakıldığında da, aynı konsantrasyon değerinde, ekstraksiyon süresi arttıkça ekstrakte edilen analit miktarının arttığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Homosisteinin ters iyontoforez tekniğiyle non-invaziv olarak vücut sıvısından ya da simüle edilen bir sistemden ekstraksiyonu işleminde, seyrelme ve ekstraksiyon verimi gibi faktörlerden dolayı ekstrakte edilen analit miktarı düşük seyretmektedir. Sağlıklı bir insanda homosistein düzeyi 5-15 μM olup bu değerin üzerindeki miktarlar ölçeklendirilerek hastalık kıstası olarak belirtilmektedir. Sunulan tez çalışmasında, homosistein tayini için geliştirilen SPE temelli enzim biyosensörü, serum örneklerinde ya da simüle edilen ilgili matrislerde uygulandığında, homosisteinin hastalık faktörü olup olmadığını başarılı ve doğru bir şekilde ortaya koymaktadır. Ancak sağlıklı bireylerdeki homosistein düzeyinin geliştirilen sensörle tayinindeki sorun iyontoforez şartlarında yapılacak iyileştirmeler ile aşılabilecektir. Bu durumda iki öneri değerlendirilebilir;

- İlk olarak tez çalışmasında belirlenen iyontoforez şartları iyileştirilebilir. Gerçek numuneler ile çalışıldığında (cihazın ve yöntemin insan koluna entegre edilen bir cihaz olduğu varsayımı) homosistein konsantrasyonu müdahale edilemeyen bir parametre olacağı için iyontoforez süresinin uzun tutulması, uygulanan akım değerinin optimizasyonu ve membran materyalinin seçimi önem arz etmektedir. Tez çalışmasında, kullanılan membran, süre ve akım değerlerinde çalışmayı kısıtlayıcı bir faktör olmuş, 15 dakika ve 0,1 mA/cm^2 şartlarının üstünde deforme olmuştur. Nitekim ticari olarak geliştirilen ürünlerde membran kısmı hidrojel yapıları ile entegre bir şekilde kullanılmakta, biyosensör sistemleri de bu hidrojel içerisine yerleştirilmektedir (Kim vd, 2004).
- Bir diğer çözüm ise, ekstrakte edilen analitin daha az seyrelmeye maruz kalmasını sağlayacak düzeneklerin kurgulanmasıdır. Tez çalışmasında, ekstraktların toplandığı kuyucuklar 750 μL hacimli 1 cm çapı olan silindirik yapıda oluşturulmuş ve analitin 250 μL tampon çözelti içerisine toplanması sağlanmıştır. Elde edilen ekstraktların HPLC analizleri için de kullanılması gerektiğinden miktar biraz fazla tutulmuştur. Bu miktar, bir SPE biyosensörün kullanıldığı optimize bir sistemde 3-4 kat daha aşağı çekilerek analitin daha konsantre bir şekilde elde edilmesi sağlanabilir. SPE'lerin sunduğu, düşük hacimli örneklerde (20-100 μL) çalışma avantajı bu tez çalışmasında da avantaj oluşturmuştur; analitin ölçülmesi için, üst kuyucukta bulunan ekstraktların

içerisine biyosensörün daldırılması yerine, SPE yüzeyine bu kuyucuktan alınan ekstrakt damlatılarak tayin gerçekleştirilmiştir. Küçük boyutlarda seri bir şekilde üretilebilirlik ($3 \times 1 \times 0,05$ cm), küçük hacimlerle (20- 100 μ M) çalışabilir olma, 3'lü elektrot sistemini kompakt bir sistem olarak sunma, SPE'lere birçok bileşen ve sistemle entegre çalışmak için üstün bir özellik ve işlevsellik sağlamaktadır. SPE'lerin bu avantajı da dikkate alınarak daha düşük üst hacimli iyontoforez hücreleri tasarlanabilir.

Tez çalışmasında geliştirilen DAA enzim biyosensörü, Tablo 4.9 ve 4.10'da sunulduğu üzere, literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında sensörün mevcutlarla yarışabilir bir performans sergilediği söylenebilir. İlaveten tayin limiti literatürde verilen örneklerle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Geliştirilen biyosensörün tek kullanımlık çalışmalar için uygun olduğu, bu yönünün iyileştirilmesine yönelik çalışmalar gerektirebilir.

Diğer taraftan, bir biyosensör sistemini ve bir iyontoforez sistemini bir arada kullanan giyilebilir biyosensör teknolojisinin pazarda yer alması, yaygınlaşması için, tez çalışmasında değinilen problemler gibi aşılması gereken birçok durum mevcuttur;

- Bu cihazların dayanıklılığı, uzun süreli stabilitenin sağlanması ve biyo-uyumluluk gibi teknolojik konulara özellikle önem verilmelidir. Örneğin epidermal sensörler, normal vücut hareketleri sırasında karmaşık mekanik deformasyonla karşı karşıya kalmaktadır. Böyle bir deformasyonun boyutu, kullanıcının yoğun fiziksel aktivite yapmasıyla artar. İlaveten, tekstil tabanlı sensörler, mekanik, kimyasal ve ısı düşüşü durumlarında deformasyona ve değişime uğramaktadır. Gereğinden fazla kullanılma durumu gibi ekstrem şartlarda, belirtilen bu deformasyonlara karşı koyabilen sensörlerin geliştirilmesi büyük bir çaba gerektirmektedir. Son 10 yıldaki çalışmalar bu sorunların çözümüne yönelik elektronik teknolojisinde dikkate değer gelişmelerin olmasını sağlamıştır (Bandodkar ve Wang, 2014).
- Bazı hedef analitler (patojenler ve proteinler gibi) biyo-afinite protokol gerektirebilir. Bu gibi analitlerin sürekli izlenmesi, reseptörlerin yenilenmesini (tek kullanımlık yüzey) zorunlu kılmaktadır. Ayrıca yıkama gerektiren aşamalarının olması vücut üzerindeki uygulamalar için uygun değildir. Bu nedenlere bağlı olarak, “*sandviç immunoassay*” gibi çok adımlı prosedüre

dayanan bilinen teknikler, hâlihazırda giyilebilir girişimsel olmayan sensör platformuna uyumlaştırılamamıştır.

- Giyilebilir sensörler için güç kaynağı, diğer büyük bir zorluğu ortaya koymaktadır. Giyilebilir biyo-yakıt hücreleri, piezo-elektrik enerji üreteçleri ve ince-film bataryaları bu problemin çözümü olarak görülmektedir. Bununla beraber, bu gibi güç kaynaklarının kullanılması durumunda da birçok konunun çözüme ulaştırılması gerekmektedir.
- Giyilebilir sensörlerin elektronikle bağlantılı olarak fonksiyonelliği ve taşınabilirliğinin artırılması ve sensörün küçültülebilmesi, dikkat çekilmesi gereken bir başka yöndür. Nano-elektronik alanındaki son yenilikler, bu gereklilikleri karşılayabilecek düzeydedir.
- Kimyasal sensörler, biyo-sıvı ile reaktif tabakanın direkt etkileşimini gerektirir. Ancak cihazın elektronik aksamının sıvı ortamdan yalıtılması gerekmektedir. Bu taleplerin bir arada karşılanması, cihazın estetiğinin korunması ve de minyatürize bir sensör beklentisi, bu alandaki çalışmalar için darboğaz noktalarıdır (Bandodkar ve Wang, 2014).

6. KAYNAKÇA

- Andreescu, S., & Sadik, O. A. (2004). Trends and challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring. *Pure and Applied Chemistry*, 76(4), 861-878.
- Anonim. (tarih yok). http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/tebakademi/modern_farmasotk/10.pdf. adresinden alınmıştır
- Anonim. (2017, Aralık). Yeni Biyoloji. <https://www.yenibiyoloji.com/deri-ve-dokunma-duyusu-derinin-yapisi-kisimlari-tabakalari-gorevleri-360>. adresinden alınmıştır
- Anonim. (2018). Centro Laboratuvarları. Homosistein: www.centro.com.tr/wp-content/uploads/2018/12/Homosistein.pdf adresinden alınmıştır
- Anonymous. (2021). Methrom Dropsense. 2021 tarihinde Screen-Printed Electrodes: http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/110-c110.pdf adresinden alındı
- Araganam, G., Manivannan, N., & Harrison, D. (2019). Review on Wearble Tecnology Sensors Used in Consumer Sport Applications. *Sensors*(19), 1983.
- Bandodkar, A. J., & Wang, J. (2014). Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends in Biotechnology*, 32(7), 363-371.
- Batra , B., Lata, S., Sharma, M., & Pundir, C. S. (2013). An acrylamide biosensor based on immobilization of hemoglobin onto multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline hybrid film. *Analytical Biochemistry*, 433, 210-217.
- Brewer, P. J., & Brown, R. J. (2009). Effect of structural design of silver/silver chloride electrodes on stability and response time and the implications for improved accuracy in pH measurement. *Sensors*, 9(1), 118-130.
- Carson , N. A., Cusworth, D. C., Dent , C. E., Field, C. M., Neill, D. W., & Westall, R. G. (1963). Homocystinuria: A New Inborn Error Of Metabolism Associated With Mental Deficiency. *Archives of Disease in Childhood*(38), 425-436.
- Chi, Q., & Dong, S. (1995). Amperometric biosensors based on the immobilization of oxidases in a Prussian blue film by electrochemical codeposition. *Analytica Chimica acta*, 310(3), 429-436.
- Ching, C. S., Chou, T. R., Sun, T. P., Huang, S. Y., & Shieh, H. L. (2011b). Simultaneous, noninvasive, and transdermal extraction of urea and homocysteine by reverse iontophoresis. *International Journal Of Nanomedicine*(6), 417-423.
- Ching, C. S., Fu, L. S., Sun, T. P., Hsu, T. H., & Chang, K. M. (2012). Use of electroporation and reverse iontophoresis for extraction of transdermal multibiomarkers. *International Journal of Nanomedicine*(7), 885-894.
- Ching, C. S., Sun, T. P., Huang, S. H., Shieh, H. L., & Chen, C. Y. (2010). A mediated glucose biosensor incorporated with reverse iontophoresis function

- for noninvasive glucose monitoring. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(4), 1548-1555.
- Ching, C. S., Yong, K. K., Yao, Y. D., Shen, H. T., Hsieh, S. M., Jheng, D. Y., et al. (2014). A new approach for noninvasive transdermal determination of blood uric acid levels. *International Journal of Nanomedicine*(9), 3069-3076.
- Ching, C. T., Sun, T. P., Shieh, H. L., Tsai, C. L., Huang, H. W., Liu, C. M., et al. (2011a). An amperometric biosensor array for precise determination of homocysteine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152, 94-98.
- Connolly, P., Christopher, C., & Morin, F. (2002). Opportunities at the skin interface for continuous patient monitoring: A reverse iontophoresis model tested on lactate and glucose. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 99(1), 37-41.
- Counto, R. A., Lima, J. L., & Quinaz, M. (2016). Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta*, 146, 801-814.
- Değim, İ. T., İlbasmış, S., Dündaröz, R., & Oğuz, Y. (2003). Reverse iontophoresis: a non-invasive technique. *Pediatric Nephrology*, 18(10), 1032-1037.
- Fan, L., Zhang, Q., Wang, K., Li, F., & Niu, L. (2012). Ferrocene functionalized graphene: preparation, characterization and efficient electron transfer toward sensors of H₂O₂. *Journal of Materials Chemistry*, 22(13), 6165-6170.
- Gazelius, B. (1999). Innovations in Microvascular Diagnosis. Iontophoresis-theory: perimed.com.cn adresinden alınmıştır
- Gibson, J. B., Carson, N. J., & Neill, D. W. (1963). Pathological Findings In Homocystinuria. *Journal of Clinical Pathology*(17), 427-437.
- Gong, K., Dong, Y., Xiong, S., Chen, Y., & Mao, L. (2004). Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 253-259.
- Hou, Y. (2005). Elaboration et caractérisation de biofilms pour micro-et nanobiocapteurs olfactifs. Doctoral Dissertation, Ecully, Ecole Centrale de Lyon.
- Jin, X., Liu, C., Xu, T., Su, L., & Zhang, X. (2020). Artificial intelligence biosensors: Challenges and prospects. *Biosensors and Bioelectronics*(165), 112412.
- Kim, L., Parris, N. A., Potts, R. O., Tamada, J., Tierney, M. J., & Berner, B. (2004, November). Patent No. US 6,816,742 B2. CA (US).
- Lata, S., & Pundir, C. S. (2013). Fabrication of an amperometric D-amino acid biosensor based on nickel hexacyanoferrate polypyrrole hybrid film deposited on glassy carbon electrode. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(1), 81-89.
- Lata, S., Batra, B., & Pundir, C. S. (2012). Construction of d-amino acid biosensor based on d-amino acid oxidase immobilized onto poly (indole-5-carboxylic acid)/zinc sulfide nanoparticles hybrid film. *Process Biochemistry*, 47, 2131-2138.
- Leboulanger, B., Guy, R. H., & Delgado-Charro, B. (2004b). Non-invasive monitoring of phenytoin by reverse iontophoresis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*(22), 427-433.

- Leboulanger, B., Guy, R. H., & Delgado-Charro, M. B. (2004a). Reverse iontophoresis for non-invasive transdermal monitoring. *Physiological Measurement*, 25(3), R35-R50.
- Lee, C. K., Ching, C. S., Sun, T. P., Tsai, C. L., Huang, W., Huang, H. H., et al. (2010). Non-invasive and transdermal measurement of blood uric acid level in human by electroporation and reverse iontophoresis. *International Journal of Nanomedicine*(5), 991-997.
- Lee, C. K., Ching, C. S., Sun, T. P., Tsai, C. L., Huang, W., Huang, H. H., et al. (2010). Non-invasive and transdermal measurement of blood uric acid level in human by electroporation and reverse iontophoresis. *International Journal of Nanomedicine*(5), 991-997.
- Li, G., Zeng, J., Zhao, L., Wang, Z., Dong, C., Liang, J., et al. (2019). Amperometric cholesterol biosensor based on reduction graphene oxide-chitosan-ferrocene/platinum nanoparticles modified screen-printed electrode. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(7), 1-16.
- Liu, J., Jiang, L., Liu, H., & Cai, X. (2011). A bifunctional biosensor for subcutaneous glucose monitoring by reverse iontophoresis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*(660), 8-13.
- Loughram, M., Ren, H., & Watanabe, E. (1998). Some voltammetric condutions for the determination of D- and L-amino acids. *Journal of Tkyo University of Fisherines*, 85(2), 43-52.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 314(1-2), 1-26.
- Marra, F., Nicoli, S., Padula, C., & Santi, P. (2013). Amikacin reverse iontophoresis: Optimization of in vitro extraction. *International Journal of Pharmaceutics*(440), 216-202.
- Martin, J. E. (2001). Composite films for modifying evanescent wave characteristics in long-period grating biosensors. Doctoral Dissertation, Virginia Tech.
- Mathew, M., Radhakrishnan, S., Vaidyanathan, A., Chakraborty, B., & Rout, C. S. (2021). Flexible and wearable electrochemical biosensors based on two-dimensional materials: Recent developments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(413), 727-762.
- Moreno-Guzmán, M., García-Carmona, L., Molinero-Fernández, A., Cava, F., Gil, M. L., & Escarpa, A. (2017). Bi-enzymatic biosensor for on-site, fast and reliable electrochemical detection of relevant D-amino acids in bacterial samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*(242), 95-101.
- Ozkan, M., Erbil, M. K., Rashed, M. A., Akgul, E. O., Boyunaga, H., Bilgi, C., et al. (2003). Determination Of Fasting And Post Methionine Load Plasma Homocysteine Levels With HPLC. *Turkiye Klinikleri J Cardiol*, 16(2), 82-87.
- Parkinson, G., & Pejcic, B. (2005). Using Biosensors to detect emerging infectious diseases. Curtin University of Technology Perth, Nanochemistry Research Institute. Western Australia: Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre.
- Parlak, O., Curto, V. F., Ojeda, E., Basabe-Desmonts, L., Benito-Lopez, F., & Salleo, A. (2020). Chapter 3 - Wearable biosensors and sample handling strategies.

Wearable Bioelectronics (s. 65-88). içinde doi.org/10.1016/B978-0-08-102407-2.00004-7 .

- Potts, R. O., Tamata, J. A., & Tierney, M. J. (2002). Glucose Monitoring by Reverse Iontophoresis. *Diabetes/Metabolism Research And Reviews*, 18(S1), 49-53.
- Pundir, C. S., Lata, S., & Narwal, V. (2018). Biosensors for determination of D and L-amino acids: A review. *Biosensors and Bioelectronics*(117), 373-384.
- Rajaram, R., & Mathiyarasu, J. (2018). An electrochemical sensor for homocysteine detection using gold nanoparticle incorporated reduced graphene oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 109-114.
- Rosini, E., Molla, G., Rossetti, C., Pilone, M. S., Pollegioni, L., & Sacchi, S. (2008). A biosensor for all d-amino acids using evolved d-amino acid oxidase. *Journal of Biotechnology*, 135, 337-384.
- Sarkar, P., Tothill, I. E., Setford, S. J., & Turner, A. P. (1999). Screen-printed amperometric biosensors for the rapid measurement of L-and D-amino acids. *Analyst*, 124(6), 865-870.
- Sekban, A., Aksungar, F. B., Sahin , M., Topkaya, A. E., & Akyıldız, M. (2007). Plasma BNP And Homocysteine Levels In Patients With Or Without Congestive Heart Failure. *Turkish Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery*, 15(2), 217-220.
- Sieg , A., Guy, R. H., & Charro, M. B. (2004). Simultaneous Extraction Of Urea And Glucose By Reverse Iontophoresis İn Vivo. *Pharmaceutical Research*, 21(10), 1805-1810.
- Sieg, A., Guy, R. H., & Charro, M. B. (2003). Reverse Iontophoresis For Noninvasive Glucose Monitoring: The Internal Standard Concept. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 92(11), 2295-2302.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2004). *Analytical Chemistry*. Belmont, CA: Thomson Learning, Inc.
- Sun, T. P., Shieh, H. L., Ching, C. S., Yao, Y. D., Huang, S. H., Liu, C. M., et al. (2010). Carbon nanotube composites for glucose biosensor incorporated with reverse iontophoresis function for noninvasive glucose monitoring. *International Journal of Nanomedicine*(5), 343-349.
- Susanto, H., Samsudin, A. M., Rokhati, N., & Widiyasa, I. N. (2013). Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 386-392.
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, S. (1999). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 71(12), 2333-2348.
- Vo- Dihn, T., & Cullum, B. (2000). Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 336(6), 540-551.
- Wang, B., Wilhelm, A., Wilhelm, A., Pilevher, S., Moshfeghi, S., Stout, P., et al. (2020). Chapter -2 Wearable chemical sensors. *Wearable Bioelectronics* (s. 49-63). içinde doi.org/10.1016/B978-0-08-102407-2.00003-5.

- Wcisło, M., Compagnone, D., & Trajanowicz, M. (2007). Enantioselective screen-printed amperometric biosensor for the. *Bioelectrochemistry*, 71, 91-98.
- Zain, Z. M., O'Neill, R. D., Lowry, J. P., Pierce, K. W., Tricklebank, M., Dewa, A., et al. (2010). Development of an implantable d-serine biosensor for in vivo monitoring using mammalian d-amino acid oxidase on a poly (o-phenylenediamine) and Nafion-modified platinum–iridium disk electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6), 1454-1459.
- Zhang, G., Liu, D., Shuang, S., & Choi, M. M. (2006). A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 936-942.



S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 13.01.2021

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ters İyontoforez Yöntemi ile Homosistein Molekülünün Girişimsel Olmayan Amperometrik Metotla Tayin Edilmesi
VARSA- ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURULU BİLGİLERİ	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRESİ	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
TELEFON	216 570 91 90
FAKS	216 565 35 26
E-POSTA	etik@dgztepehastanesi.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	PROF.DR. NİHAT TINKILIÇ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya, Kromatografi, Biyosensörler, Besin Analizleri			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZE VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐	
		FAZ 4 ☐	Gözlemsel ilaç çalışması ☐	Tıbbi cihaz klinik araştırması ☐	
		In vivo tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları ☐	İlaç dışı klinik araştırma ☒	Retrospektif ☐	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Version Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLUR RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROSÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	SKORSETA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐			
	BEYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	İLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
DİĞER:	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2020/0773	Tarih: 13.01.2021			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.				

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 13.01.2021

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ters İyontoforez Yöntemi ile Homosistein Molekülünün Girişimsel Olmayan Amperometrik Metotla Tayin Edilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. İslam MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Asıl Yıldırım	Öroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Süleyman Daşdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Sıdıka Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Hacer Hicran Mutlu	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐	
Uzm. Dr. Ergül Demirçivi Bör	Kadın Hastalıkları ve Doğum	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☒	
Saliha Şahin	İşçi		E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:

*:Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi