T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GLİKOZ VE İNSÜLİN TAYİNİ İÇİN KARBON DESTEKLİ MEZOPOROZ SİLİKA VE ALTIN ELEKTROTLAR KULLANILARAK ENZİMATİK VE APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEVVAL KAYA

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SAMET ŞAHİN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. VELİ ŞİMŞEK

BİLECİK, 2023

10571449

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GLİKOZ VE İNSÜLİN TAYİNİ İÇİN KARBON DESTEKLİ MEZOPOROZ SİLİKA VE ALTIN ELEKTROTLAR KULLANILARAK ENZİMATİK VE APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEVVAL KAYA

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SAMET ŞAHİN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. VELİ ŞİMŞEK

BİLECİK, 2023

10571449

BEYAN

"Glikoz ve İnsülin Tayini için Karbon Destekli Mezoporoz Silika ve Altın Elektrotlar Kullanılarak Enzimatik ve Aptamer Temelli Elektrokimyasal Biyosensör Geliştirilmesi" adlı yüksek lisans tezin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

<table>
<tr><td colspan="4">Bu çalışmanın,
Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.</td></tr>
<tr><td>DESTEK ALINMIŞTIR</td><td>X</td><td>DESTEK ALINMAMIŞTIR</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">Destek alındı ise;</td></tr>
<tr><td colspan="4">Destekleyen kurum;</td></tr>
<tr><td colspan="2">Desteğin Türü</td><td colspan="2">Proje Numarası</td></tr>
<tr><td colspan="2">1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi) X</td><td colspan="2" rowspan="3">BAP : 2018-02.BŞEÜ.03-09

TÜBİTAK :119S218</td></tr>
<tr><td colspan="2">2- TÜBİTAK X</td></tr>
<tr><td colspan="2">Diğer……
……</td></tr>
<tr><td colspan="4">ETİK KURUL onayı var ise;</td></tr>
<tr><td colspan="2">ETİK KURUL karar tarih/sayı:</td><td colspan="2">……/……
……..</td></tr>
</table>

Şevval KAYA

Tarih

…….....

İmza

…….....

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bana rehberlik eden, sabrı, yönlendirmeleri ve bilgi birikimiyle her daim destek olan, öğütleri ve öğrettikleri sayesinde uzun yol kat ettiğim danışmanım Doç. Dr. Samet ŞAHİN'e,

Destekleri, katkıları ve emekleri için ikinci danışmanım Doç. Dr. Veli ŞİMŞEK'e, bilgi birikimiyle çalışmamı desteklediği için Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan Çağlayan'a, destek ve önerileri için değerli jüri üyesi Prof. Dr. Lokman UZUN'a saygılarımı, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Dostluğu, yardımları ve emekleri için değerli arkadaşım Arş. Gör. Kevser Kübra KIRBOĞA'ya, her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Netice KÜÇÜK'e teşekkür ediyorum.

Bana her türlü desteği sağlayan ve yanımda olan babam Mustafa KAYA, annem Yıldız KAYA ve ablam Merve Betül KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Şevval KAYA

2023

ÖZET

GLİKOZ VE İNSÜLİN TAYİNİ İÇİN KARBON DESTEKLİ MEZOPOROZ SİLİKA VE ALTIN ELEKTROTLAR KULLANILARAK ENZİMATİK VE APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Diyabet, kan şekerinin düzenlenmesinde bozukluklara yol açan kronik ve metabolik bir hastalıktır. Kan şekerinin düzenlenmesi, pankreas tarafından salgılanan ve kandaki glikozun hücrelere alınarak enerjiye dönüştürülmesini sağlayan insülin hormonu ile gerçekleşir. Tip 2 diyabette hücreler insüline karşı duyarsızlaşır, Tip 1 diyabetli hastalarda ise pankreas yeterli insülini salgılayamaz ve Tip 2 diyabetli hastalarda görüldüğü gibi hücreler insüline karşı duyarsızlaşır. Tip 1 diyabetli hastalarda, pankreas yeterli insülin salgılayamaz, Tip 2 diyabette olduğu gibi hücreler insüline karşı duyarsızlaşır. Bu durumda, kan şekerinin normal seviyelerde tutulması için dışarıdan müdahale edilmesi gerekebilir. Bu nedenle kanda hem glikozun hem de insülinin aynı anda izlenmesi ve takibi önem kazanır. Bu çalışmada glikoz tayini için enzimatik bir biyosensör ve insülin tayini için bir aptasensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. İlk aşamada, silika kaynaklı mezogözenekli malzemelerin enzim immobilizasyonu için uygunluğu ve elektrokimyasal biyoelektronik sistemlerdeki performansı incelenmiştir. Bu amaçla, silika kaynaklı mezogözenekli malzemelere iletken ve yüksek yüzey alanına sahip bir tabaka olan grafen oksit (GO) katılarak iletkenlik kazandırılmıştır. İletkenlik kazandırılmış mezogözenekli malzeme (MGM) baskı devre karbon elektrotlar (SPE) üzerine kaplanarak elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında doğrusal taramalı voltametri (LSV) ve dönüşümlü voltametri (CV) yöntemleri kullanılmıştır. Elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları sonucu iyi performansı gösteren hacimce (1:1) GO/MCM-41 çözeltisi seçilerek biyosensör uygulamasındaki performansı incelenmiştir. Redoks aktif bir bileşik olan ve elektrokimyasal sinyal sağlayan ferrosen (Fc), SPE üzerine kaplanan GO/MCM-41 üzerine kaplanarak uygulanmış ve GO/MCM-41/Fc modifiye elektrotu elde edilmiştir. . Daha sonra, glikozun oksidasyonunu katalize eden bir enzim olan glikoz oksidaz (GOx) enzimi GO/MCM-41/Fc modifiye elektrot üzerine tutuklanmıştır. Enzimin yüzeye koyulması sonrasında kitosan (Chit) kullanılarak polimer film oluşturulmuştur (GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit). Hazırlanan biyosensörün glikoz tayini için lineer çalışma aralığı, tespit sınırı, seçiciliği, tekrar üretilebilirliği, raf ömrü ve gerçek numune analizi gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün glikoz tayini için lineer çalışma aralığı 1- 10 mM olarak bulunmuştur. Tespit sınırı (LOD) ise 0,516 mM olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği 5 mM glikoz konsantrasyonuna on farklı zamanda vermiş olduğu yanıtın bağıl standart hatası (RSD)

hesaplanarak değerlendirilmiştir. RSD %5,84 olarak bulunmuştur. Biyosensörün raf ömrü deneylerinde ise, 5 mM glikoz için 3, 7 ve 27. Gün yaşlandırılmış elektrotlarda alınan cevapların 1. gün cevabına göre standart RSD'leri sırasıyla %6,44 %9,82 ve %5,86 olarak bulunmuştur. Biyosensörün seçiciliği ise potansiyel girişim yapabilecek ürik asit, askorbik asit ve insülin gibi maddelerin cevaba etkisi ile değerlendirilmiştir. Bu maddelerin cevaba anlamlı bir etki etmediği sonucuna varılmıştır. Gerçek numune analizi için vişne, çilek ve kayısı reçellerinde bulunan glikoz miktarı kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır. Hesaplanan glikoz kısmi bir şekilde KOSKA firmasının vermiş olduğu değerler ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmanın diğer kısmında insülin tayini için yeni bir aptasensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. İlk aşamada, aptamer bazlı bir elektrokimyasal biyosensör sistemi tasarlanmıştır. Bu sistemde, SPE üzerine elektrodepozisyon yöntemiyle altın (Au) kaplanmış ve yüzeye metilen mavisi aptameri bağlanmıştır. Aptamerin bağlanma koşulları ve yüzey doluluğu karakterize edilmiştir. Daha sonra, aptamer, merkaptohekzanol (MCH) ve insülin inkübasyon süreleri Design Expert progamı kullanılarak cevap yüzey yöntemiyle 180 dk., 60 dk. ve 25 dk. olarak belirlenmiştir. Aptamerin farklı insülin miktarları için verdiği tepki elektrokimyasal kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemi kullanılarak incelenmiş ve aptasensör zemin cevabına göre oluşan farklar alınarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Geliştirilen aptasensörün sulu çözeltide lineer çalışma aralığı 25 – 150 pM ve LOD 18.45 pM (%95 güven aralığında) olarak belirlenmiştir. Son olarak, aptasensöre potansiyel girişim yapabilecek maddeler belirlenmiş (streptavidin, glikoz, trombin ve ürik asit) ve aptasensör validasyonu sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, aptasensör için belirlenen girişimlerden anlamlı bir etki görülmemiştir. Aptasensör cevabının en düşük RSD sapma değeri ve yüzde hassasiyeti %9,5 ve %6,4 olarak bulunmuştur. Raf ömrü deneyleri sonucunda ise 10 gün içerisindeki kararlılık kaybı %8 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mezogözenekli Malzeme, Glikoz, İnsülin, Aptamer, Elektrokimyasal Biyosensör

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ENZYMATIC AND APTAMER-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS USING CARBON-SUPPORTED MESOPOROUS SILICA AND GOLD ELECTRODES FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE AND INSULIN

Diabetes is a chronic and metabolic disease that causes disorders in regulating blood sugar. Blood sugar regulation occurs with the hormone insulin, secreted by the pancreas. It enables glucose in the blood to be taken into the cells and converted into energy. In patients with Type 1 diabetes, the pancreas cannot secrete enough insulin, as in Type 2 diabetes, the cells become insensitive to insulin. In this case, external insulin may be required to keep blood sugar at normal levels. For this purpose, electrochemical and aptamer-based biosensors can be used in insulin therapy. This study aimed to develop two new biosensors for the determination of glucose and insulin. In the part of the biosensor developed to determine glucose, the suitability of silica-derived mesoporous materials for enzyme immobilization and its performance in electrochemical bioelectronic systems were investigated. For this purpose, conductivity has been gained by adding graphene oxide (GO), a thin, flexible and conductive layer, to silica-sourced mesoporous materials. MCM-41, a regular porous and high surface area mesoporous material, was used as the silica-derived mesoporous material. GO/MCM-41 solution consisting of a mixture of GO and MCM-41 (1:1) by volume was prepared. Electrochemical characterizations were made by coating this solution on printed circuit carbon electrodes. Linear scanning voltammetry and alternating voltammetry methods were used in characterization studies. As a result of electrochemical characterization studies, the GO/MCM-41 solution, which showed good performance, was selected, and its performance in biosensor application was examined. GO/MCM-41/Fc modified electrode was obtained by coating 75 mM ferrocene on GO/MCM-41 coated on SPE. Ferrocene is a redox-active compound and provides an electrochemical signal. Then, the glucose oxidase (GOx) enzyme was arrested on the GO/MCM-41/Fc modified electrode. GOx is an enzyme that catalyzes the oxidation of glucose. During the immobilization of the enzyme, a polymer film was formed using chitosan. The optimal enzyme arrest time was determined for GO/MCM-41/Fc/Chit. The determined enzyme arrest time is four days at +4 °C; for glucose determination of the prepared biosensor, linear operating range, detection limit, selectivity, reproducibility, shelf life and real sample analysis were performed. The linear operating range of the biosensor for glucose determination was found to be 1 - 10 mM. The limit of detection (LOD) was calculated as 0.516 mM. The

reproducibility of the biosensor was evaluated by the relative standard error of its response to 5 mM glucose concentration at ten different times. The relative standard error was found to be 5.84%. The shelf life of the biosensor was evaluated with the relative standard mistake of the 1st-day response of the shelf life responses on the 3rd, 7th and 27th days, respectively. The standard relative error was 6.44%, 9.82% and 5.86%. The selectivity of the biosensor was evaluated by the effect of substances such as uric acid, ascorbic acid and insulin that could potentially interfere with the response. It was concluded that these items did not significantly affect the response. For real sample analysis, the amount of glucose in sour cherry, strawberry and apricot jams was calculated from the calibration curve. The calculated glucose was partially compatible with the values given by KOSKA.

An aptamer-based electrochemical biosensor system was designed in the other part of the study. In this system, gold (Au) is coated on the printed circuit carbon electrodes (SPE) by electroplating and insulin-recognizing aptamer is attached to the Au surface. The binding conditions and surface occupancy of the aptamer were characterized. Then, the interaction of aptamer with insulin was investigated by signal on-off measurement method. The incubation times of aptamer, mercaptohexanol and insulin were then determined as 180 min, 60 min and 25 min by response surface method using the Design-Expert program, respectively. The response of the aptamer for different insulin concentrations was determined using the electrochemical square-wave voltammetry method and the calibration curve was obtained by taking the differences according to the aptasensor background response. The linear working range of the developed aptasensor in aqueous solution was determined as 25 - 150 pM and the detection limit value was 18.45 pM (at 95% confidence interval). Finally, interfering substances were identified (streptavidin, glucose, thrombin, and uric acid) and aptasensor was validated. No significant interfering effect was observed for the aptasensor. The lowest relative standard deviation and accuracy of the aptasensor response were found to be 9.5% and 6.4%. The stability loss of the aptasensor within 10 days was found to be 8%.

Keywords: Mesoporous Silica, Aptamer, Insulin, Glucose, Electrochemical Biosensor

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ i

ÖZET ii

ABSTRACT iv

İÇİNDEKİLER vi

TABLOLAR LİSTESİ ix

ŞEKİLLER LİSTESİ x

KISALTMALAR LİSTESİ xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Biyosensörler 4

2.1.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması 7

2.1.2. Biyosensörlerin performans faktörleri 11

2.2. Enzimler 12

2.2.1. Enzim Kinetiği 13

2.2.2. Enzim immobilizasyonu 15

2.3. Aptamerler 16

2.4. Gözenekli Malzemeler 17

2.4.1. Mezogözenekli malzemeler 18

2.4.1.1. M41S ailesi 19

2.4.1.2. Santa Barbara Amorphus ailesi (SBA) 20

2.5. Grafen Oksit 20

3. MATERYAL VE YÖNTEM 22

3.1. Materyal 22

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar 22

3.1.2. Kullanılan Cihazlar **22**

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları **23**

3.2. Yöntem **24**

3.2.1. Elektrot Yüzeyinin Stabilizasyonu **24**

3.2.2. GO/Mezogözenekli Malzeme Elektrotların Hazırlanması **24**

3.2.3. GO/MGM Elektrotlarına Glikoz Oksidaz Enzimi Tutuklanması **25**

3.2.4. GO/MGM Elektrotlarında Farklı Glikoz Konsantrasyonları Analizi **26**

3.2.5. GO ve GO/MCM-41 Malzemeleri İçin Gün İçi ve Günler Arası Performans Deneyleri **26**

3.2.6. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit Elektrotlarının Modifikasyonu **27**

3.2.7. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit Elektrotlarının Performans Analizleri **28**

3.2.7.1. Kalibrasyon Eğrisi Elde Edilmesi **28**

3.2.7.2. Girişim Etkisinin Belirlenmesi **28**

3.2.7.3. Gerçek Numune Analizleri **29**

3.2.7.4. Raf Ömrü ve Tekrar Üretilebilirlik Analizleri **29**

3.2.8. İnsülin Tayini İçin Aptasensör Geliştirilmesi **29**

3.2.8.1. Au Kaplama ve Aptamer Tutuklanması **29**

3.2.8.2. Aptamer ve MCH Sürelerinin Optimizasyonu **30**

3.2.8.3. İnsülin Süresinin Optimizasyonu **32**

3.2.9. SPE/Au/Apt/Ins Elektrotlarının Performans Analizleri **33**

3.2.9.1. Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi **33**

3.2.9.2. Raf ömrü Analizleri **33**

3.2.9.3. Girişim Etkisinin Belirlenmesi **33**

4. DENEYSEL SONUÇLAR **34**

4.1. GO/MGM Elektrotlarının Karakterizasyonu **34**

4.2. GO/MGM Modifiye Edilmiş Elektrotlarda Enzim Performansı **36**

4.3. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Analizi Sonuçları 38

4.4. GO ve GO/MCM-41 Elektrotları İçin Gün İçi ve Günler Arası Performans Deneyleri 40

4.5. Silika Kaynaklı Mezogözenekli Malzemelerin Karakterizasyon Sonuçları 41

4.5.1. FT-IR Analizi Sonuçları 41

4.5.2. XRD Analizi Sonuçları 43

4.5.3. SEM Analizi Sonuçları 44

4.6. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit Elektrotlarının Performans Deney Sonuçları 47

4.6.1. Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi 47

4.6.3. Tekrar Üretilebilirlik Analizleri 48

4.6.4. Raf Ömrü Analizleri 49

4.6.7. Gerçek Numune Analizleri 51

4.7. En Uygun Aptamer, MCH ve İnsülin İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesi 54

4.8. SPE/Au/Apt/Ins Elektrotlarının Performans Analizleri 57

4.8.1. Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi 57

4.8.2. Girişim Etkisinin İncelenmesi 59

4.8.3. Raf Ömrü Analizleri 59

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 60

KAYNAKÇA .....

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil sensörlerin bağlantı türleri ve örnekleri. **7**

Tablo 2. 2. Dönüştürücü türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması. **8**

Tablo 2. 3. Biyoreseptör sınıflandırılmasına göre sensör tipleri ve örnek sensörler. **9**

Tablo 2. 4. SBA malzemeri ve gözenek yapıları. **20**

Tablo 3. 1. Aptamer ve MCH inkübasyon sürelerinin elektrot performansına etkisinin belirlenmesi için Design Expert programı tarafından belirlenen deneyler……**31**

Tablo 3. 2. İnsülin inkübasyon süreleri optimizasyonu için Design Expert programı tarafından belirlenen deneyler. **32**

Tablo 4. 1. GO/GOx ve GO/MCM-41/GOx elektrotlarının gün içi ve günler arası performans deneylerinin yüzde değişim değerleri……**41**

Tablo 4. 2. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun günler arası performans değişimi. **50**

Tablo 4. 3. Vişne, diyabetik vişne ve diyabetik çilek reçeli numuneleri için kalibrasyon eğrisinden elde edilen glikoz konsantrasyonu ve geri kazanım hesaplamaları. **51**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Normal ve yüksek kan şekerinin damar içi kesitinde glikoz ve kan hücreleri bakımından karşılaştırılması. (A) Düşük kan şekeri (B) Yüksek kan şekeri. **3**

Şekil 2. 2. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması **5**

Şekil 2. 3. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil sensörler olarak sunulan enzimatik glikoz oksidasyon mekanizmalarının özeti **6**

Şekil 2. 4. Biyosensörün performansını belirleyen faktörler. **11**

Şekil 2. 5. GOx enziminin katalizlediği reaksiyon. **13**

Şekil 2. 6. Lineweaver-Burk grafiği..... **15**

Şekil 2. 7. Gözenek boyutları ve şekilleri **18**

Şekil 2. 8. M41S ailesi **19**

Şekil 3. 1. Kitosanın 500 rpm ve 50 °C'de hazırlanması. **23**

Şekil 3. 2. SPE/GO/MGM elektrotlarının hazırlanışı ve karakterizasyonunun şematik gösterimi **25**

Şekil 3. 3. SPE/GO/MGM/GOx elektrotlarının hazırlanışı şematik gösterimi..... **26**

Şekil 3. 4. Gün içi ve günler arası deneylerde elektrotların saklanma hücresi..... **27**

Şekil 3. 5. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarının hazırlanması şematik gösterimi..... **28**

Şekil 3. 6. SPE/Au/MB Aptamer elektrotlarının hazırlanma şeması..... **30**

Şekil 4. 1. (A) SBA-15 (B) SBA-16 (C) MCM-41 (D) MCM-48 malzemelerinin kütlece 1:1, 1:1.5, 1:2 oranlarında GO ile karıştırılmasıyla hazırlanan çözeltilerin SPE üzerine kaplanmasıyla elde edilen CV eğrileri. CV analizleri 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 2 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probu içerisinde 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. (n=3)..... **34**

Şekil 4. 2. (A) SBA-15 (B) SBA-16 (C) MCM-41 (D) MCM-48 için Şekil 4.1'de verilen CV eğrilerinden elde edilen anodik-katodik pik akım değerleri ve standart hatalar..... **35**

Şekil 4. 3. GO/MGM/GOx modifikasyonları için farklı enzim konsantrasyonları (1, 5, 10 mg/mL GOx) analizleri (20 mV/s) (A) GO (B) GO/SBA-15 (C) GO/SBA-16 (D) GO/MCM-41 (E) GO/MCM-48 (n=3). **37**

Şekil 4. 4. (A) GO/SBA-15 (B) GO/SBA-16 (C) GO/MCM-41 (D) GO/MCM-48 kaplı elektrotların 1, 5, 10 mg/mL enzim konsantrasyonları pik akım ve standart hata grafikleri. .. **38**

Şekil 4. 5. GO/MGM/GOx modifikasyonları için farklı glikoz konsantrasyonları (1, 3, 5, 7 mM glikoz) CA analizleri (0.14 V, 120 saniye) ve kalibrasyon eğrileri (A) GO (B) GO/SBA-15 (C) GO/SBA-16 (D) GO/MCM-41 (E) GO/MCM-48 (n=3). **40**

Şekil 4. 6. GO/GOx ve GO/MCM-41/GOx elektrotları için (A) gün içi ve (B) günler arası performans deneyleri. **40**

Şekil 4. 7. Silika kaynaklı mezogözenekli malzemelerin FT-IR analiz sonuçları. **42**

Şekil 4. 8. Mezogözenekli malzemelerin düşük açılı XRD analizi sonuçları. **44**

Şekil 4. 9. Elektrotların SEM analizi sonuçları (A) GO (B) GO/MCM-41 (C) MCM-41 (D) MCM-48 (E) SBA-15 (F) SBA-16. ..... **45**

Şekil 4. 10. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun (A) Farklı glikoz konsantrasyonlarında alınan zamana karşı akım grafiği (B) Akım değişimi ile elde edilen Michaelis-Menten grafiği (C) Kalibrasyon eğrisi (D)GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun Lineweaver ve Burk grafiği. **47**

Şekil 4. 11. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotuna girişim maddelerinin etkisi. **48**

Şekil 4. 12. Farklı zamanlarda hazırlanan 10 farklı GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun akım cevabı. **49**

Şekil 4. 13. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarının 1., 3., 10. Ve 27. Günlerde 5 mM ve 10 mM glikoza verdikleri akım cevapları. **50**

Şekil 4. 14. (A) 0,1 M KCl içerisinde gerçekleştirilen elektrokimyasal yüzey stabilizasyonu (B) SPE elektrot üzerine Au kaplanmasını gösteren CV eğrileri (0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış $HAuCl_4$) (C) 2 mM $K_3Fe(CN)_6$/$K_4Fe(CN)_6$içerisinde SPE'nin KCl ile yüzey temizlenmesi gerçekleştirilmeden önceki (mor), KCl ile yüzey temizlendikten sonra (pembe) ve temizlenmiş elektrota Au kaplandıktan sonrasında (mavi) alınan CV eğrileri. **52**

Şekil 4. 15. Altın kaplanmış elektrot yüzeyinde gözlenen değişim. **53**

Şekil 4. 16. (A) SPE SEM analizi görüntüsü (B) SPE/Au elektrotu SEM analizi görüntüsü.. **53**

Şekil 4. 17. (A) Design Expert ile hesaplanan artık (residual) analizi (B) Tahmin edilen verilerin modele olan uygunluğu. **54**

Şekil 4. 18. (A) MCH inkübasyon sürelerinin MCH inkübasyon süresi ile ilişkisi (B) RSM sonuçlarına göre İnsülin inkübasyon sürelerinin aptamer inkübasyon süresi ile ilişkisi ve (C) RSM sonuçlarına göre İnsülin inkübasyon sürelerinin MCH inkübasyon süresi ile ilişkisi.... **55**

Şekil 4. 19. RSM tercih edilebilirlik ve model sonuçları. **56**

Şekil 4. 20. Hazırlanan SPE/Au/Apt ve SPE/Au/Apt/Ins elektrotların (A) 25 pM, (B) 50 pM, (C) 100 pM ve (D) 150 pM insülin konsantrasyonu için insülin olmayan duruma göre değişimini gösteren SWV voltamogramları 0,1 M PBS içinde. **57**

Şekil 4. 21. SPE/Au/Apt/Ins elektrotu kalibrasyon eğrisi. **58**

Şekil 4. 22. Aptasensör performansına girişim maddelerinin etkisi (insülin: 50 pM, streptavidin: 50 pM, glikoz: 1,5 mM, Trombin: 0,5 µM ve ürik asit: 0,15 mM). **59**

KISALTMALAR LİSTESİ

µ **:** Mikro

m : Mili

pM : Pikomolar

µM : Mikromolar

mM : Milimolar

Fc : Ferrosen

FcCOOH : Ferrosen Karboksilik Asit

GO : Grafenoksit

DMF : Dimetilformamid

MB : Metilen mavisi

etOH : Etanol

GOx : Glikoz oksidaz

Ins : İnsülin

Apt : Aptamer

OTA : Okratoksin A

CEA : Karsinoembriyonik antijeni

MCH : Merkaptohekzanol

SPE : Baskı devre karbon elektrot

BE : Boş elektrot

Chit : Kitosan

MCM : Mobil Composition of Matter

SBA : Santa Barbara Amorphus

MGM : Mezogözenekli malzeme

Nf : Nafyon

LSV : Doğrusal Taramalı Voltametri

CV : Döngüsel Voltametri

CA : Kronoamperometri

SWV : Kare Dalga Voltametri

DET : Doğrudan Elektron Transferi

MET : Aracılı Elektron Transferi

RSD : Bağıl Standart Hata

AA : Askorbik Asit

UA : Ürik Asit

K_m : $V_{max}/2$ değerine ulaşmak için gerekli substrat miktarı

V_{max} : Maksimum reaksiyon hızı

1. GİRİŞ

Diyabet vücudun enerji ihtiyacını karşılaması için gerekli olan kan şekerinin düzenlenmesi yeteneğini etkileyen metabolik bir hastalıktır ve dünya çapında milyonlarca insanı etkilemekte ve gelecek nesiller için ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 1980 yılında 108 milyon olan diyabetli yetişkin sayısı, 2014 yılında 422 milyona, 2019 yılında ise 537 milyona ulaşmıştır (Ogurtsova vd. , 2017; Shaw vd. , 2010; WHO, 2023). Diyabet, her yıl yaklaşık 2 milyon ölüme doğrudan neden olan ve körlük, böbrek yetmezliği, kalp krizi, inme ve alt ekstremite ampütasyonu gibi ciddi komplikasyonlara yol açan bir hastalıktır (Palazzuoli ve Iacoviello, 2023; Theofilis vd. , 2023; Wingard ve Barrett-Connor, 1995). Kan şekeri dengesi, kan dolaşımındaki glikoz seviyesini kontrol eden ve pankreas tarafından üretilen insülin hormonu tarafından sağlanır. İnsülin, kandaki glikozun hücrelere alınmasını ve enerji üretimini düzenler. Hücreler, glikozu yakarak enerji elde eder ve vücudun fonksiyonlarını sürdürür. Tip 1 diyabetli kişilerde, pankreas yeterli insülin üretemez, Tip 2 diyabette ise hücreler insüline karşı direnç geliştirir. Bu durumda, kan şekerinin normal seviyede tutulması için insülin tedavisi gerekebilir (Frankum ve Ogden, 2005). Diyabetli hastalara kan şekerini normal aralıkta tutmak ve diyabetin komplikasyonlarını önlemek veya geciktirmek amacıyla dışarıdan insülin verilmesi şeklinde gerçekleşen tedavide insülin; enjeksiyon, pompa veya solunum yoluyla verilebilir (Cooke ve Plotnick, 2008). Diyabet hastalığının teşhis ve tedavisinde kan şekeri takibini sağlamak amacıyla düzenli glikoz ölçümü ve insülin ölçümü yapılması gerekmektedir (Ozougwu vd. , 2013; Zaccardi vd. , 2016). Günümüzde glikoz ölçümü laboratuvara gereksinim duymadan hasta başında gerçekleştirilmektedir ancak insülin ölçümü sadece hastanelerde ve uygun laboratuvar ortamında genellikle enzimatik immünolojik testler (ELISA) içeren yavaş ve duyarlılığı belirli bir düzeyin üzerine çıkmayan yöntemlerle yapılmaktadır (Andersen vd. , 1993). Buna ek olarak yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez gibi sistemler de insülin ölçümü için kullanılmaktadır. Bu tip sistemlerde aynı şekilde duyarlılık ve farklı maddelerle etkileşim gibi problemler görülmektedir (Määttä vd. , 2003; Martin vd. , 2000).

Biyosensörler, biyolojik bileşiklerin varlığını veya konsantrasyonunu ölçmek için tasarlanmış cihazlardır. Enzimatik biyosensörlerde kullanılan enzimler, substrat moleküllerine bağlanarak belirli kimyasal bağları kırma veya oluşturma yeteneğine sahiptirler. Örneğin; enzimatik bir glikoz biyosensöründe GOx enzimi glikozun oksidasyonunu katalize eder ve glikoz konsantrasyonu ile ilişkili bir sinyal üretir. İnsülin tespitinde kullanılan biyosensörlerde, insülini tanıyan ve bağlanan bir aptamer veya antikor kullanılarak insülinin bağlanması

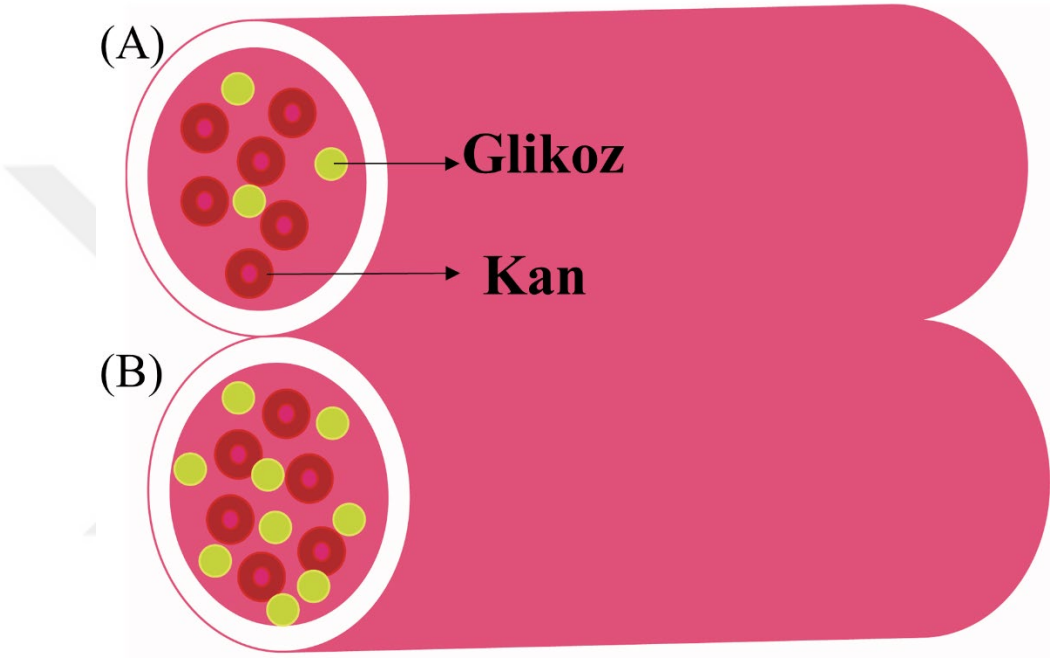
sonucunda ortaya çıkan elektron veya hidrojen peroksit gibi ürünler, elektriksel bir sinyale dönüştürülerek insülin konsantrasyonu ölçülür (Grieshaber vd. , 2008).

MGM'ler yüksek yüzey alanı, büyük gözenek hacmi ve düzenli gözenek yapısı nedeniyle adsorpsiyon, kataliz ve ilaç taşıma gibi birçok alanda uygulama bulmaktadır (Suib, 2017). MCM-41, MCM-48, SBA-15 ve SBA-16, mezogözenekli silika malzemelerin en bilinen örnekleridir (Şimşek ve Şahin, 2021). Bu malzemeler, farklı gözenek geometrilerine sahiptir. MCM-41, hegzagonal dizilmiş silindirik gözeneklere; MCM-48, kübik dizilmiş küresel gözeneklere; SBA-15, kalın duvarlı hegzagonal dizilmiş silindirik gözeneklere; SBA-16, kübik dizilmiş üç boyutlu bağlantılı gözeneklere sahiptir (Olkhovyk ve Jaroniec, 2005). Mezogözenekli silika malzemeler, kimyasal olarak modifiye edilebilir ve farklı fonksiyonel gruplarla işlevselleştirilebilir. Bu sayede, kataliz alanında çeşitli reaksiyonlar için uygun katalizörler elde edilebilir (Chaudhary ve Sharma, 2017).

Bu tez çalışmasında elektriksel olarak yalıtkan MGM'lere GO kullanılarak iletkenlik kazandırılmış ve yüksek yüzey alanına sahip iletken modifiye malzeme ile glikoz tespiti için hassas enzimatik biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında, altın kaplı elektrotlar elde edilmiş ve insülini tanıyabilen ve bağlanabilen aptamer kullanılarak hassas, hızlı cevap veren bir insülin biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Diyabet, vücudun enerji kaynağı olan kan şekeri (glikoz) seviyesinin çok yüksek olduğu bir hastalıktır. Diyabet, pankreasın yeterli miktarda insülin üretememesi veya vücudun insülini etkili bir şekilde kullanamaması durumunda ortaya çıkar. İnsülin, kan şekeri seviyesini düzenleyen bir hormondur. Şekil 2.1.'de kan şekeri seviyesinin yükselmesine bağlı olarak artan glikoz gösterilmektedir. Kan şekeri seviyesinin yüksek olması, zamanla vücudun birçok sisteminde, özellikle sinirlerde ve kan damarlarında ciddi hasara yol açabilir (Deshpande vd. , 2008).



Şekil 2. 1. Normal ve yüksek kan şekerinin damar içi kesitinde glikoz ve kan hücreleri bakımından karşılaştırılması. (A) Düşük kan şekeri (B) Yüksek kan şekeri.

Diyabetin Tip 1 ve Tip 2 diyabet olarak iki ana tipi bulunmaktadır. Tip 1 diyabet (daha önce insüline bağımlı, juvenil veya çocukluk çağı diyabeti olarak biliniyordu), pankreasın yeterli insülin üretememesi ile karakterizedir ve günlük insülin uygulamasını gerektirir (WHO, 2023). Tip 2 diyabet (daha yaygın olan tip), pankreasın yeterli insülin üretmesine rağmen vücudun insüline direnç göstermesi ile karakterizedir (Kharroubi ve Darwish, 2015).

Diyabetin belirtileri, aşırı susama, sık idrara çıkma, istemsiz kilo kaybı, ketonların idrarda bulunması (insülin eksikliğinde kas ve yağın parçalanmasının bir yan ürünü), yorgunluk, halsizlik, sinirlilik veya diğer ruh hali değişiklikleri, bulanık görme, yavaş iyileşen yaralar, diş eti, cilt ve vajinal enfeksiyonlar gibi çok sayıda enfeksiyondur (Olokoba vd. , 2012; Ramachandran, 2014; Westman, 2021). Tip 1 diyabet her yaşta başlayabilir, ancak genellikle

çocukluk veya ergenlik döneminde başlar. Tip 2 diyabet her yaşta gelişebilir, ancak 40 yaşından büyük kişilerde daha yaygındır (Chatterjee vd. , 2017; Larsson vd. , 2017; Olokoba vd. , 2012; Westman, 2021).

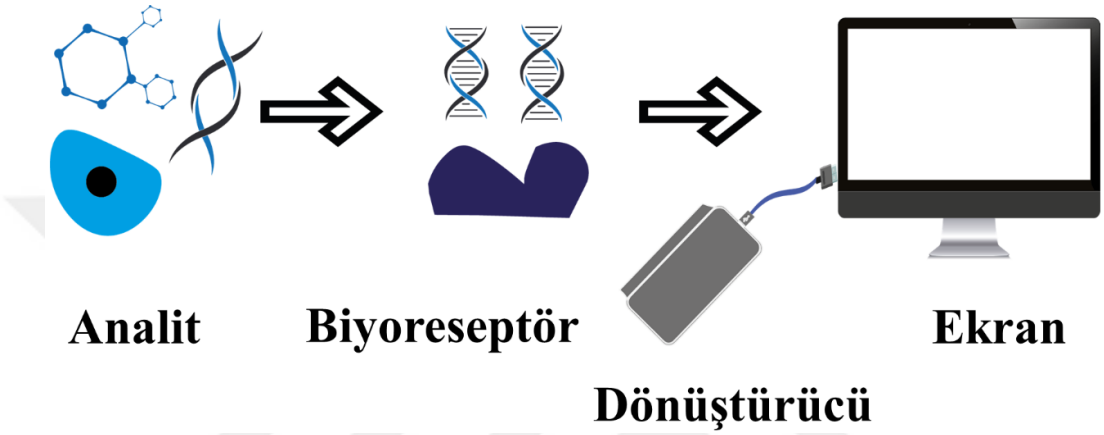
Diyabetin küresel bir sağlık sorunu olduğu ve hastalığın yaygınlığının son yıllarda sürekli arttığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 1980 yılında 108 milyon olan diyabetli yetişkin sayısı, 2014 yılında 422 milyona, 2019 yılında ise 537 milyona ulaşmıştır (Ogurtsova vd. , 2017; Shaw vd. , 2010; WHO, 2023). Tip 2 diyabetli kişilerin çoğu düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (WHO, 2023). Diyabet, her yıl yaklaşık 2 milyon ölüme doğrudan neden olan ve körlük, böbrek yetmezliği, kalp krizi, inme ve alt ekstremite ampütasyonu gibi ciddi komplikasyonlara yol açan bir hastalıktır (Palazzuoli ve Iacoviello, 2023; Theofilis vd. , 2023; Wingard ve Barrett-Connor, 1995).

Diyabetin tedavisi yoktur, ancak hastalığın kontrol altına alınması ve komplikasyonların önlenmesi veya geciktirilmesi mümkündür. Diyabet tedavisinde kullanılan yöntemler arasında, sağlıklı bir diyet, düzenli fiziksel aktivite, normal vücut ağırlığının korunması ve tütün kullanımından kaçınılması bulunmaktadır. Ayrıca ilaçlar, insülin enjeksiyonları veya pompaları ve kan şekeri seviyesinin düzenli olarak ölçülmesi de gerekebilir (Frankum ve Ogden, 2005; Jamal vd. , 2021; Raoufi vd. , 2018). Diyabet alanında yapılan akademik araştırmalar hastalığın etyolojisi, patogenezi, yönetimi ve önlenmesi gibi konuları kapsamaktadır. Örneğin, son zamanlarda kök hücre ve gen tedavisi gibi kişiselleştirilmiş tıp yöntemleri diyabet için umut verici görünmektedir (Berna vd. , 2001; Hamad vd. , 2021; Madsen, 2005). Ancak, bu yöntemlerin tüm diyabet hastaları için uygulanabilir olması için henüz aşılmamış birçok engel vardır ((Haxha vd. , 2020; Lockwood vd. , 1986; Rodriguez-Stanley vd. , 2023; Ulbrecht vd. , 2004). Ayrıca ilaçlar, oral antidiyabetikler veya insülin gibi, kan şekeri seviyesini düşürmeye veya insülin duyarlılığını artırmaya yardımcı olabilir (Babiker ve Al Dubayee, 2017; Chaudhury vd. , 2017; Eliasson, 2003; Haire-Joshu vd. , 1999). Diyabet hastalığının tedavisinde kan şekeri seviyesinin düzenli olarak ölçülmesi için hassas ve hızlı cevap veren biyosensörlerden faydalanılmaktadır.

2.1. Biyosensörler

Biyosensör, biyolojik bir bileşeni fizikokimyasal bir detektörle birleştiren, kimyasal bir maddenin saptanması için kullanılan analitik bir cihazdır (Rusling ve Forster, 2021; Tetyana vd. , 2021; Ziegler ve Göpel, 1998). Biyosensörler, biyolojik sistemlerden esinlenerek tasarlanmış biyomoleküller veya biyomimetik malzemeler kullanarak, ilgili analit ile özel ve

hassas bir şekilde etkileşime girerler. Bu etkileşim, numunedeki analitin varlığı veya miktarıyla orantılı olarak ölçülebilir bir sinyal üretir. Bu sinyal, optik, elektrokimyasal, elektriksel, termal, piezoelektrik gibi farklı fizikokimyasal yöntemlerle dönüştürülür ve işlenir (Uniyal vd. , 2023). Biyosensörler, klinik, tarım, gıda, çevre, güvenlik gibi pek çok alanda faydalı uygulamalara sahiptir (Gu vd. , 2023; Velasco-Garcia ve Mottram, 2003). Biyosensörler Şekil 2.2.'de verildiği gibi analizi yapılacak numune (analit), biyoreseptör, dönüştürücü ve cevabı görüntülemeyi sağlayan ekrandan oluşur.



Şekil 2. 2. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

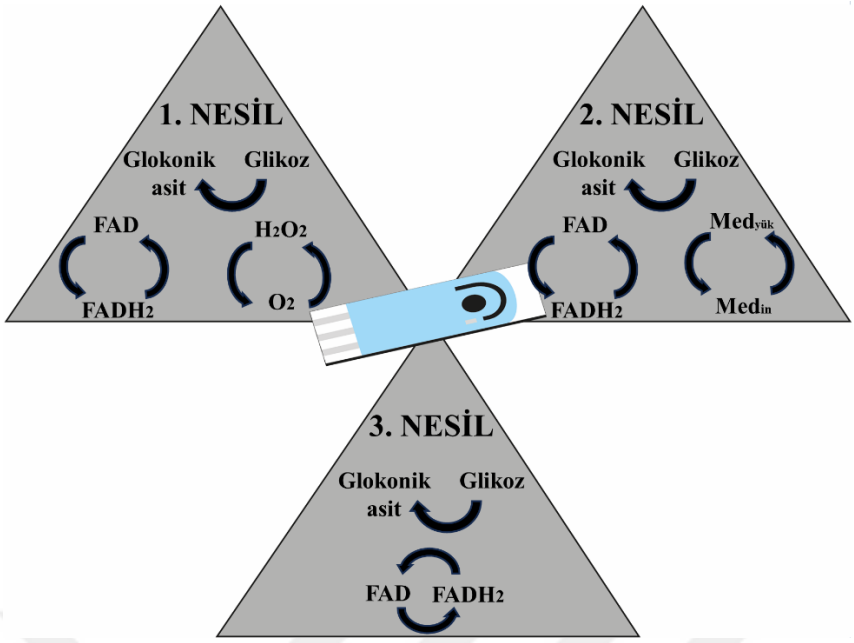
Analit: Biyosensörün tespit etmeye çalıştığı hedef bileşen olarak tanımlanır.

Biyoreseptör: Analiti tanıyan ve onunla bağlanan biyolojik veya biyomimetik bir malzemedir. Örneğin, enzimler, antikorlar, nükleik asitler, hücre reseptörleri, mikroorganizmalar vb. biyoreseptör olarak kullanılabilir (Jain vd. , 2023b; Samal vd. , 2023)

Dönüştürücü: Biyoreseptörün analitle etkileşiminden kaynaklanan fiziksel veya kimyasal değişimi elektriksel sinyale dönüştüren bir cihazdır. Örneğin, fotodiyotlar, elektrotlar, termistörler vb. dönüştürücü olarak kullanılabilir (Jain vd. , 2023b). Dönüştürücüden gelen elektriksel sinyali amplifiye eden, filtreleyen, sayısallaştıran ve analiz eden bir devre sinyal işlemcidir (Jain vd. , 2023a).

Ekran: Sinyal işlemciden gelen sonucu görsel veya sesli olarak kullanıcıya sunan bir arayüzdür (Jain vd. , 2023b).

Biyosensörler enzimin elektrotla arasındaki ilişkiye bağlı gruplandırılması Şekil 2.3'te birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil olarak verilmiştir.



Şekil 2. 3. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil sensörler olarak sunulan enzimatik glikoz oksidasyon mekanizmalarının özeti

Birinci nesil biyosensörler, enzimlerin katalitik aktivitesini ölçerek analitleri tespit eden ederler. Enzimlerin doğrudan elektrot yüzeyine bağlandığı veya bir membran içine gömüldüğü basit bir yapıya sahiptir. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonun ürünü veya tüketimi ile ilgili bir parametreyi ölçerek analiti belirler. Bu parametre, elektriksel akım, gerilim, ısı, ışık, pH gibi farklı fizikokimyasal büyüklükler olabilir (Kulkarni vd. , 2023; Sýs vd. , 2023). Enzim bir elektrot yüzeyine bağlanır veya bir membran içine gömülür ve bu şekilde, enzimin elektriksel iletişimi sağlanır. Daha sonra, numuneden alınan analit, elektrot yüzeyine getirilir ve enzim ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda, enzimin katalizlediği reaksiyon gerçekleşir ve reaksiyonun ürünü veya tüketimi oluşur (Karyakin vd. , 1995; Sercan ve Altay, 2018; Sýs vd. , 2023). Son olarak, elektrot üzerinde amperometrik, potansiyometrik, termometrik, optik veya piezoelektrik gibi bir yöntemle reaksiyonun ürünü veya tüketimi ile ilgili bir parametre ölçülür. Bu parametre, analit konsantrasyonu ile orantılıdır ve böylece analit seviyesi belirlenir (Karyakin vd. , 2002). Bu biyosensörlerin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. 1. nesil biyosensörler, basit ve ucuz bir tasarıma sahiptir. Yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlarlar. Hızlı ve kolay analiz yapılmasına olanak sağlarlar. Fakat, enzim stabilitesi ve ömrü ile sınırlıdır. Elektrot yüzeyindeki kirlenme ve pasifasyon sorunları yaşayabilirler. Reaksiyon ortamındaki oksijen ve hidrojen peroksit gibi arka plan maddelerinden etkilenebilirler (Mehrvar ve Abdi, 2004; Wang, Joseph, 2001; Yoo ve Lee, 2010).

İkinci nesil biyosensörler, biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü arasındaki bağlantıyı geliştirmek için nanoteknoloji kullanımına dayanan biyosensörlerdir (Mayorga Martinez vd. , 2011; Scheller vd. , 1991; Wang, Joseph, 2001). Bu biyosensörler, birinci nesil biyosensörlerden daha yüksek duyarlılık, seçicilik ve stabilite sunarlar. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyosensörlerin bağlantı türlerinin özeti ve bu biyosensör türlerinin örnekleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2. 1. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil sensörlerin bağlantı türleri ve örnekleri.

Nesil	Bağlantı Türü	Örnek
Birinci Nesil	Biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü arasında bir arabulucu madde (örn. elektron taşıyıcı) vardır.	GOx enzim sensörleri, Clark elektrotu
İkinci Nesil	Biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü arasında nanoteknoloji kullanımına dayanan bir bağlantı vardır.	Nanotüp, nanopartikül veya nanoyapı tabanlı biyosensörler
Üçüncü Nesil	Biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü arasında bir bağlantı yoktur. Biyolojik algılayıcı doğrudan elektriksel sinyal üretir.	Nanopor veya grafen tabanlı biyosensörler

Üçüncü nesil biyosensörler, biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü arasındaki bağlantıyı kaldıran ve biyolojik algılayıcının doğrudan elektriksel sinyal üretmesini sağlayan biyosensörlerdir. Üçüncü nesil biyosensörler, ikinci nesil biyosensörlerden daha basit, daha hızlı, daha duyarlı ve daha güvenilir olabilirler (Xia, 2023; W. Zhang & Li, 2004).

Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörlerin sınıflandırılması genel olarak dönüştürücü ve biyoreseptöre göre yapılmaktadır. Biyosensörlerin dönüştürücü türüne göre sınıflandırılması Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2. 2. Dönüştürücü türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Dönüştürücü Türüne Göre Biyosensör Tipi	Alt Grupları
Elektrokimyasal Biyosensörler	Amperometrik Biyosensörler
	Potansiyometri Biyosensörler
	Yarı İletken (kondüktometri) Biyosensörler
	Empedimetrik Biyosensörler
Optik Biyosensörler	Fotometri Esaslı Biyosensörler
	Fluorometri Esaslı Biyosensörler
	Biyolüminesans Esaslı Biyosensörler
Kalorimetri Biyosensörler	Termistörler
Piezoelektrik Biyosensörler	Piezoelektrik Kristaller

Kaynak: (Solanki vd. , 2011).

Biyosensörler biyoreseptör türüne göre enzim, antikor, nükleik asit, hücre, biyomimetrik sensörler olarak sınıflandırılmaktadır. Biyoreseptöre göre sınıflandırılma ve örnekleri Tablo 2.3.'de verilmiştir (Ronkainen vd. , 2010).

Tablo 2. 3. Biyoreseptör sınıflandırılmasına göre sensör tipleri ve örnek sensörler.

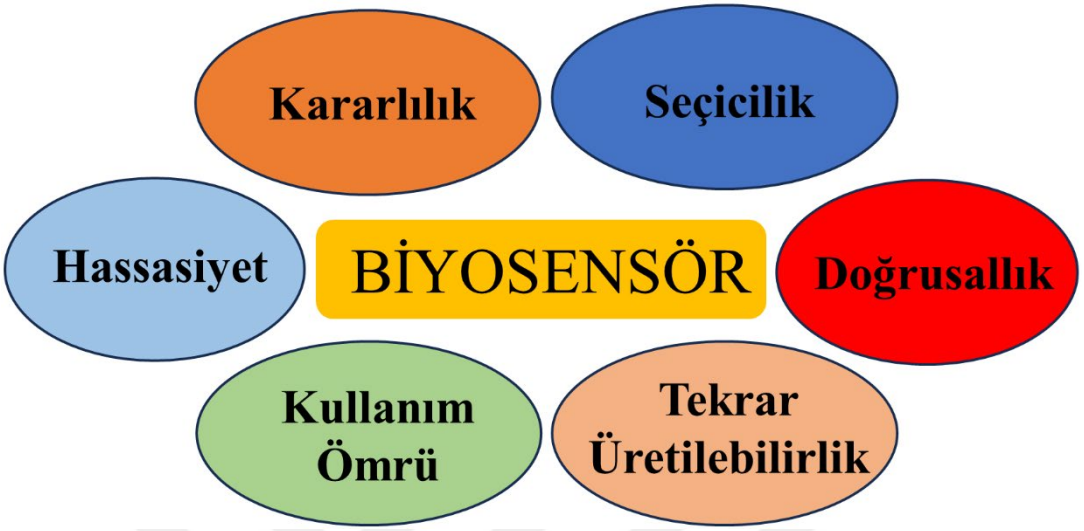
Tip	Biyolojik Algılayıcı Türü	Örnek
Enzim Sensörleri	Enzimler, analit ile etkileşime girerek bir reaksiyon katalizler ve reaksiyon ürünleri veya tüketilen substratlar ölçülür.	Glikoz, kolesterol, laktat, üre gibi metabolitleri ölçmek için kullanılır.
Aptasensörler	Aptamerler, DNA veya RNA gibi nükleik asitlerden oluşan kısa moleküllerdir. Analit ile yüksek afinite ve seçicilik ile bağlanır ve elektriksel sinyal ölçülür.	İlaç, protein, virüs, bakteri gibi analitleri ölçmek için kullanılır.
Antikor Sensörleri	Antikorlar, analit ile spesifik olarak bağlanan protein molekülleridir. Bağlanma olayı optik, elektrokimyasal veya mekanik bir sinyale dönüştürülür.	Hormon, antijen, toksin gibi analitleri ölçmek için kullanılır.
Nükleik Asit Sensörleri	Nükleik asitler, DNA veya RNA gibi genetik materyallerdir. Analit ile baz eşleşmesi veya hibridizasyon yoluyla bağlanır ve bağlanma olayı optik, elektrokimyasal veya mekanik bir sinyale dönüştürülür.	DNA dizisi, mutasyon, mikroRNA gibi analitleri ölçmek için kullanılır.
Hücre Sensörleri	Hücreler, canlı organizmaların temel yapı taşlarıdır. Analit ile hücre yüzeyindeki reseptörler veya kanallar aracılığıyla etkileşir ve etkileşim hücrenin fonksiyonlarını veya davranışlarını değiştirir. Bu değişim optik, elektrokimyasal veya mekanik bir sinyale dönüştürülür.	Virüs, bakteri, ilaç, toksin gibi analitleri ölçmek için kullanılır.
Biyomimetik Sensörleri	Biyolojik sistemleri taklit eden yapay malzemelerdir. Analit ile biyomimetik malzemenin yüzeyi veya yapısı arasında fiziksel veya kimyasal bir etkileşim olur ve etkileşim optik, elektrokimyasal veya mekanik bir sinyale dönüştürülür.	Gaz, iyon, pH gibi analitleri ölçmek için kullanılır.

Aptasensörler

Aptasensörler, geleneksel yöntemlere göre artan duyarlılık, seçicilik, tasarım esnekliği ve maliyet-etkinlik gibi birçok avantaja sahiptir (O'Sullivan, 2002) (Prante vd. , 2020). Aptasensörlerin temel prensibi, aptamerin hedef molekülle bağlanması sonucunda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimin, bir dönüştürücü yardımıyla okunabilir bir sinyale dönüştürülmesidir. Dönüştürücü, biyolojik etkileşimi elektriksel, optik, mekanik veya termal bir sinyale çeviren bir cihazdır. Aptasensörlerde kullanılan dönüştürücü türleri arasında elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve termal transdüserler sayılabilir. Aptasensörlerin tasarımında dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta, aptamerin hedefle bağlanması sırasında konformasyonel bir değişim geçirmesidir. Bu değişim, aptamerin sinyal verici bir molekülle etkileşimini etkileyebilir (Prante vd. , 2020). Örneğin, aptamerin hedefle bağlanması sinyal verici molekülün serbest kalmasına veya yakınlaşmasına neden olabilir. Bu şekilde, aptamer-hedef etkileşimi sinyal yoğunluğunda bir artışa veya azalmaya yol açabilir. Aptasensörlerin uygulama alanları oldukça geniştir. Özellikle tıbbi tanı ve çevresel izleme alanlarında aptasensörler önemli rol oynamaktadır. Aptasensörler sayesinde bakteri, virüs, toksin, ilaç, hormon gibi çeşitli hedef moleküller hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilebilir (Vasilescu vd. , 2018; Zhang vd. , 2021). Altın nanopartiküller, karbon nanotüpler, GO ve kuantum noktalar gibi çeşitli nanomalzemeler, sinyal amplifikasyonu, biyolojik uyumluluk ve yüzey modifikasyonu gibi özellikleri sayesinde aptasensör performansını artırabilir.(Kaur ve Shorie, 2019). Bulaşıcı patojenleri tespit etmek için geliştirilen aptasensörlerin tasarım stratejileri ve hasta başı testleri hakkında bir inceleme makalesi yayımlanmıştır , bu makalede üç ana sinyal transdüseri olan elektrokimyasal, optik ve mekanik transdüserlerin kullanımını vurgulamıştır (Chen, X.-F., Zhao ve Yang, 2022). Ayrıca, aptamer seçimi ve modifikasyonu, biyosensör platformu oluşturma (çoğunlukla mikro ve nanomalzeme bazlı), raporlama mekanizmaları ve sinyal geliştirme yöntemleri gibi aptasensör tasarımında dikkate alınması gereken faktörleri tartışmıştır. Wang vd., ayrıca, COVID-19 gibi yaygın bulaşıcı hastalıkların tanısında kullanılan bazı hazır cihazlar da örnek olarak sunmuştur (Chen, X.-F. vd. , 2022). Ming ve vd., ise kâğıt bazlı mikroakışkan aptasensörlerin avantajları ve uygulamaları detaylandırmışlardır. Kâğıt bazlı mikroakışkan aptasensörler, düşük maliyetli, taşınabilir, kullanımı kolay ve atılabilir biyosensörlerdir. Kâğıt, sıvı numuneleri kapiler kuvvetlerle taşıyabilen doğal bir mikroakışkan malzemedir. Kağıt bazlı mikroakışkan aptasensörler, renkli, floresan veya elektrokimyasal sinyaller kullanarak çeşitli hedef molekülleri tespit edebilir (Ming vd. , 2020).

Biyosensörlerin performans faktörleri

Bir biyosensörün çalışma özelliklerini gösteren, kullanım amacına göre uygunluğunu belirleyen ve verimliliğini gösteren faktörler Şekil 2.4.'de verilmiştir (Currie, 1995).



Şekil 2. 4. Biyosensörün performansını belirleyen faktörler.

Seçicilik: Biyosenörün ölçüm ortamında hedeflenen analitin dışında bulunabilecek ve girişim yapabilecek diğer maddelere cevap verip vermediğini gösteren parametredir.

Hassasiyet: Biyosensörün tespit edeceği en düşük analit miktarını (niceleştirme sınırı, LOQ) ve tespit sınırını (LOD) tanımlar.

Doğrusallık: Ölçüm ortamındaki analit konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak, alınan sinyal cevabının doğrusal olarak değiştiği bölge biyosensörün doğrusal çalışma aralığını verir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün farklı zamanlar ve aynı şartlar altında, sabit analit derişimine karşı verdiği sinyalin bağıl aktivite hesabı ile ifade edilmesidir (Gibson 1999). İdeal bir biyosensörün kullanım kararlılığının yüksek ve raf ömrünün uzun olması beklenir.

Kararlılık: Biyosensörde kullanılan protein veya enzim gibi bileşenlerin özelliklerinin zaman içinde aktivitesinin korunmasına bağlı olarak biyosensör cevabının sabit kalma derecesi ile ilgilidir (Gibson, 1999). Kararlılıktaki değişiklikler, aynı zamanda sapma olarak da bilinir; bileşenlerin yaşlanması, bileşenlerin hassasiyetindeki azalma veya sinyal oranındaki bir değişiklik vb. nedeniyle olabilir.

Tekrar üretilebilirlik: Biyosensörün tekrar üretilebilirliği, aynı preosürle hazırlanmış biyosensörlerin farklı zamanlarda ölçümü tekrar edebilmesindeki tutarlılıkla belirlenir. Yanıtın aynı olması güvenilirlik ve sağlamlığı gösterir (Asha vd., 2020).

2.2. Enzimler

Enzimler katalitik aktiviteye, yüksek seçiciliğe sahip ve biyokimyasal reaksiyonları hızlandırmaya yarayan biyolojik makromoleküllerdir (Isaksson vd. , 1993). Enzimler, substratlarına spesifik olarak bağlanarak onları reaksiyon ürünlerine dönüştürürler. Normal koşullarda çok yavaş gerçekleşecek ya da gerçekleşmeyecek reaksiyonlarda biyokatalizör görevi görürler. Teoride enzim tipik bir katalizör gibi tepkimeye girdikten sonra değişikliğe uğramadan çıkar ve tekrar tepkimeye katılabilir ancak uygulamada enzimlerin bir ömrü vardır. Enzimlerin katalitik aktivitesi, pH, sıcaklık, iyon kuvveti ve inhibitörler gibi faktörlere bağlıdır (Daniel ve Danson, 2013).

Enzimler genler tarafından şifrelendikleri için amino asit dizilimleri kendilerine özgüdür. Enzimlerin yapısı ve işlevi karmaşıktır. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken, diğerleri iki farklı bölümden oluşur (Murakami vd. , 1996).

Apoenzim: Enzimin temel protein yapısıdır ve hangi maddeye etki edeceğini belirler. Apoenzimin işlevsel olması için koenzim veya kofaktörle birleşmesi gerekebilir.

Koenzim Kısmı: Koenzimler, organik veya inorganik moleküller içeren ve protein kısmına göre daha küçük olan kısımlardır. Koenzimler, enzimin işlevini destekler ve aktivasyonu için gereklidir. Koenzim kısmı metal iyonuysa kofaktör olarak adlandırılır.

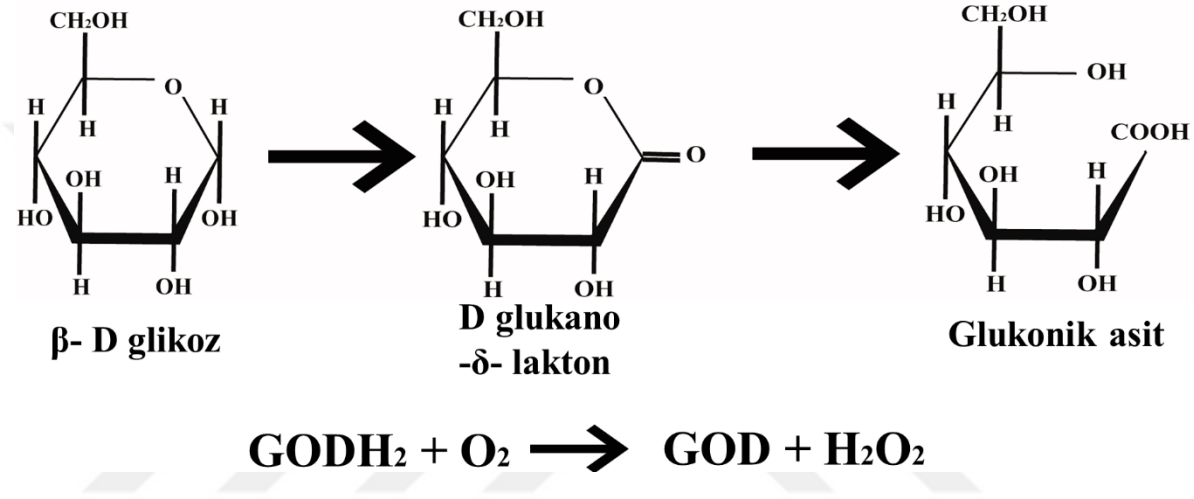
Enzimlerin aktif olduğu form, enzim ve koenzimin birleştiği komplekstir ve buna "holoenzim" denir. Enzim-koenzim kompleksi, katalitik tepkimenin başlangıç aşamasında substrat molekülü ile etkileşime girer. Bu etkileşim, substratın enzimin aktif bölgesine sadece uygun olan bir şekilde bağlanabilmesi için özel bir boşluk veya yapı gerektiren "anahtar-kilit modeli" olarak adlandırılır.

Substrat, enzim-koenzim kompleksi içinde kimyasal etkileşimlere tabi tutulur ve geçiş durumu yapısına dönüşür. Bu sırada oluşan bağlar, zayıf van der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları gibi kimyasal etkileşimlerdir. Daha sonra, enzim-substrat kompleksi, enzim-ürün kompleksine dönüşerek ürünü oluşturur ve ardından ürün çevresel ortama bırakılır. Enzim, yapısında herhangi bir değişiklik olmadan başka bir substratı bağlamak için tekrar hazır hale

gelir. Bu şekilde enzimler, özgün ve seçici bir şekilde belirli tepkimeleri hızlandırırlar (Daniel ve Danson, 2013).

Glikoz Oksidaz Enzimi

GOx (EC 1.1.3.4, β-D-glikoz: oksijen oksidoredüktaz), glikoz moleküllerini oksijen ile reaksiyona sokarak glikozun oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Şekil 2.5.'te verilen reaksiyonda glikozun oksidasyonu sonucunda glikoz asidi ve su oluşurken, oksijen indirgenerek suyu oluşturur. GOx, genellikle bakteri türlerinden elde edilir ve biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılır (Witt vd. , 2000).



Şekil 2. 5. GOx enziminin katalizlediği reaksiyon.

2.2.1. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalize edilen kimyasal reaksiyonların hızlarını inceler ve enzimlerin katalitik mekanizmalarını, metabolizmadaki rollerini, aktivitelerinin nasıl kontrol edildiğini, bir ilaç veya modifiye edicinin (inhibitör veya aktivatör) reaksiyon hızını nasıl etkilediğini ortaya çıkarmak için faydalanılan önemli bir araştırma alanıdır (Cleland, 1967). Bir enzimin katalitik aktivitesi, pH, sıcaklık, iyon kuvveti ve inhibitörler gibi faktörlere bağlıdır (Cook ve Cleland, 2007) ve bu faktörler, enzimin konformasyonunu, substrat bağlanmasını ve reaksiyon mekanizmasını etkileyebilir. Optimal pH ve sıcaklık, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği değerlerdir. Denklem 2.1.'de verilen tek substratlı bir enzimin reaksiyonu denkliğinde eenzim (E), substrat (S) adı verilen başka bir molekülün reaksiyonuna neden olan bir biyolojik makromoleküldür ve substratı aktif bölgesine bağlayarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturur. Daha sonra enzim-ürün kompleksi (EP) ve son olarak da ürün (P) oluşur (Cornish-Bowden, 2014). Bu matematiksel modeli geliştiren Michaelis ve

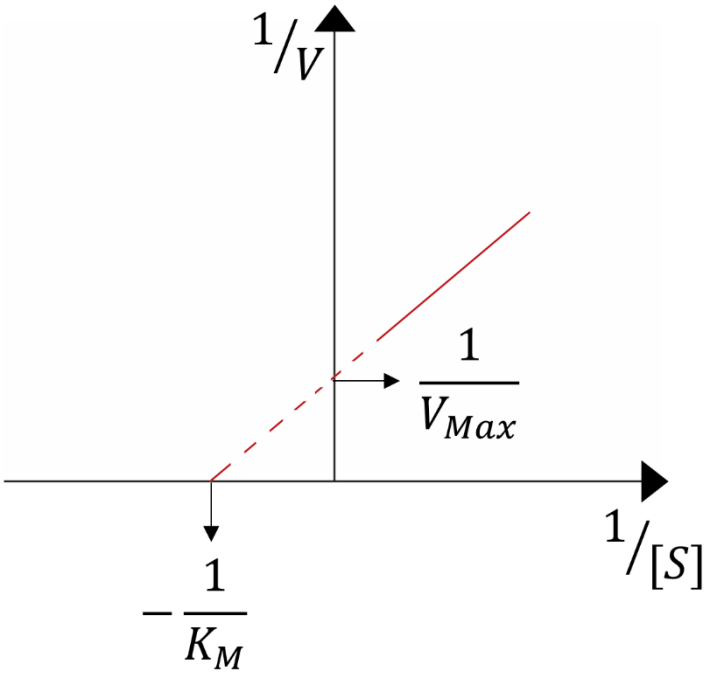
Menten, 1913 yılında yaptıkları çalışmalarla günümüzün enzim kinetiğinin temelini atmışlardır (Michaelis ve Menten, 1913).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightarrow}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} E + P \tag{2.1}$$

Denklem 2.1.'de verilen Michaelis-Menten denklemi, enzimler tarafından katalize edilen kimyasal reaksiyonların hızlarının substrat konsantrasyonu ile nasıl değiştiğini, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu ve bozulmasını birinci dereceden kinetik yasalarına göre modeller (Cornish-Bowden, 2015). Denklem 2.2'de yer alan [S] substrat konsantrasyonu, V_0 anlık reaksiyon hızı, V_{max} maksimum reaksiyon hızı ve yarı maksimum reaksiyon hızına ulaşmak için gerekli substrat konsantrasyonu (K_m) olarak tanımlanabilir (Cornish-Bowden, 2013a). V_{max}, enzimin tüm aktif bölgelerinin substratla doyurulduğu durumdaki reaksiyon hızı, K_m ise enzimin substrata olan afinitesinin bir ölçüsü olarak ifade edilebilir. Düşük K_m, yüksek afinite anlamına gelir ve yüksek K_m değeri yani düşük afinite V_{max}'a ulaşmak için gereken substrat konsantrasyonun yüksek olduğunu gösterir. (Cornish-Bowden, 2013b).

$$V_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{[S] + K_m} \tag{2.2}$$

Enzim-substrat reaksiyonlarının davranışlarını görselleştirmek için enzim kinetiği grafikleri kullanılır (Bisswanger, 2017). Bu grafiklerde, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak gösterilir. Bu grafiklerden V_{max} ve K_m gibi kinetik parametreler elde edilebilir. Ayrıca, inhibitörlerin etkileri de bu grafiklerde görülebilir.



Şekil 2. 6. Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 2.6.'da verilen Lineweaver-Burk grafiği, Michaelis-Menten denkleminin tersi alınarak elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiğidir (Lineweaver ve Burk, 1934). Lineweaver-Burk grafiğinde, $1/V_0$ (reaksiyon hızının tersi) değeri y eksenine, 1/[S] (substrat konsantrasyonunun tersi) değeri x eksenine konur. Bu şekilde, doğrunun y eksenini kestiği nokta $1/V_{max}$'a, x eksenini kestiği nokta -1/Km'ye eşit olur. Doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} olur. Bu grafik, enzimlerin farklı inhibisyon tiplerine göre nasıl etkilendiğini de göstermek için kullanılabilir. Rekabetçi inhibisyon, doğrunun eğimini ve x eksenini kesme noktasını artırır, ancak y eksenini kesme noktasını değiştirmez. Rekabetçi olmayan inhibisyon, doğrunun eğimini ve y eksenini kesme noktasını artırır, ancak x eksenini kesme noktasını değiştirmez (Hamilton vd. , 1974; Waldrop, 2009). Bu grafiğin yararı, enzim kinetiğinin önemli parametreleri olan V_{max} ve K_m gibi değerleri daha kolay belirlemeyi sağlamasıdır (Rodriguez vd. , 2019).

2.2.2. Enzim immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutulmasıdır (Homaei vd. , 2013). Enzim immobilizasyonu, enzimlerin üründen ve substrattan ayrılmasını önleyerek, çalışma ürünü izolasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca, enzim immobilizasyonu, enzimlerin kararlılığını,

seçiciliğini ve verimliliğini artırabilir (Datta vd. , 2013). Enzim immobilizasyonu, çeşitli alanlarda uygulama bulmaktadır. Örneğin, GOx enzimi kullanılarak glikoz seviyesini ölçen elektrokimyasal glikoz sensörleri diyabet tanı ve tedavisinde kullanılır (Lee vd. , 2020; Nguyen ve Kim, 2017; Suresh vd. , 2023). Biyosensörler uygulamalarında enzim immobilizasyon yöntemleri olarak adsorpsiyon, hapsetme, kovalent bağlama ve çapraz bağlama kullanılmaktadır.

Adsorpsiyon: Adsorpsiyonda, enzimler taşıyıcı yüzeyine fiziksel olarak bağlanırlar. Bu yöntem basit, ucuz ve enzim aktivitesini koruyucudur. Ancak, bağlanma zayıf olduğu için enzimler kolayca ayrılabilir (Khan, 2021).

Hapsetme (Tutuklama): Hapsetme metodunda, enzimler bir polimer veya jel matrisin içine hapsedilirler. Matrisin gözenek boyutu, enzimin tutulmasını substrat ve ürün moleküllerinin geçmesini sağlar. Bu yöntem enzim aktivitesini korur, ancak difüzyon sınırlaması olabilir (Nguyen ve Kim, 2017).

Kovalent Bağlama: Bu yöntemde, enzimlerin kimyasal grupları ile taşıyıcının kimyasal grupları arasında kovalent bağlar oluşturulur. Bu yöntem güçlü bir bağlanma sağlar, ancak enzim aktivitesini azaltabilir (Wang, X. vd. , 2014).

Çapraz Bağlama: Çapraz bağlama yönteminde, enzim molekülleri arasında çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak kovalent bağlar oluşturulur. Bu yöntem stabil bir agregat oluşturur, ancak enzim aktivitesini azaltabilir (Moehlenbrock ve Minteer, 2017; Sheldon vd. , 2005).

2.3. Aptamerler

Aptamerler, spesifik bir hedef moleküle bağlanabilen tek sarmal DNA veya RNA oligonükloititlerden veya peptitlerden oluşan moleküllerdir (Ellington ve Szostak, 1990; Tuerk ve Gold, 1990). Aptamerler genellikle yüksek afiniteye sahiptirler, çünkü hedef moleküllere bağlandıktan sonra yapılarını değiştirme yeteneklerini kullanabilirler. Bu, küçük molekülleri nükleik asit yapılarına entegre edebilmeleri veya makromoleküllerin (örneğin proteinler) yapısına dahil olabilmeleri anlamına gelir (Hermann ve Patel, 2000). Yüksek afiniteleri sayesinde, karbonhidratlar, ilaçlar, amino asitler, nükleotitler, peptitler, enzimler, hormonlar ve bunun gibi birçok farklı hedefin tayininde kullanılmaktadır (Cho vd. , 2009). Aptamerler, teşhis ve tedavi alanında giderek daha önemli hale gelen moleküler araçlar olarak kabul edilirler. Genellikle SELEX adı verilen (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) ve üssel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimine dayalı geliştirilen bir yöntemle belirli

bir hedef moleküle karşı yüksek seçicilikte üretilirler (Tuerk ve Gold, 1990). Özellikle aptamer tabanlı biyosensörler, antikorlar ve enzimler gibi doğal reseptörleri kullanan geleneksel biyosensörlere kıyasla benzersiz avantajlar sunarlar (Song vd. , 2008).

Metilen Mavisi Konjuge Aptamer

Metilen mavisi (MB), tek veya çift iplikli DNA'ya farklı şekillerde bağlanabilen bir elektrokimyasal probdur. Aptamer ise, spesifik bir hedef moleküle bağlanabilen bir DNA veya RNA dizisidir (Catanante vd. , 2016). MB konjüge aptamer (MB-Apt), elektrokimyasal sinyal almak amacıyla etiketlenmiş ve sensörlerde kullanılan bir kombinasyondur (Wang, Jianlong vd. , 2009). Hedef molekülün varlığına göre elektrokimyasal sinyalde değişikliklere neden olur.

Catanante vd. okratoksin A (OTA) tespit etmek için MB aptameri kullanmışlardır. Yapılan çalışmada SPE elektrot yüzeyine heksametilendiamin, polietilen glikol, basit adsorpsiyon ve diazonyum birleştirme mekanizması kullanılarak farklı aptamer birleştirme stratejileri test edilmiştir (Catanante vd. , 2016).

Wei vd., yapmış oldukları çalışmada mikrosistin-LR'yi (MC-LR) tespit etmek amacıyla MB modifiye edilmiş bir aptasensör geliştirmiştir. Aptamer ve MC-LR birleştirildikten sonra MB ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferinin kolaylaştığını ve SWV analizlerinde akımın arttığını, hassas bir aptasensör geliştirildiğini rapor etmişlerdir (Wei vd. , 2022).

Bir diğer yaklaşımda ise, Chanarsa vd., karsinoembriyonik antijeni (CEA) tespit etmek için metilen mavisi aptameri kullanmışlardır. Bu çalışmada, aptameri altın elektrot üzerine immobilize etmişlerdir. MB, aptamer ile interkale olmuştur. CEA eklendiğinde, aptamer ile bağlanarak MB ile interkale olan kısmını azaltmıştır. Bu da diferansiyel puls voltametrisi (DPV) sinyalinde azalmaya neden olmuştur (Chanarsa vd. , 2022).

2.4. Gözenekli Malzemeler

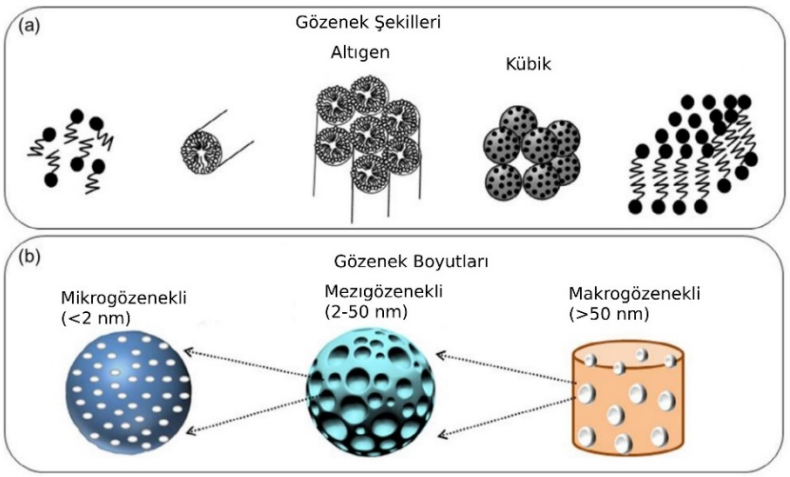
Gözenek terimi en genel haliyle sürekli bir madde içerisindeki sınırlı boşluk olarak tanımlanabilir (Hasanzadeh vd. , 2012). Gözenekli malzemeler, yapısında farklı büyüklük ve boyutlarda heterojen veya homojen olarak dağılan gözenekler bulunan doğal veya yapay katı malzemelerdir. Gözenekli katılar sahip oldukları yüksek yüzey alanları nedeniyle adsorban, katalizör ve katalizör destek malzemeleri olarak kullanılmaktadırlar. Gözenekli yapılar 1960'lı yıllardan beri kullanıldıkları çeşitli teknolojik ve bilimsel çalışmalar nedeniyle büyük ilgi toplamıştır. Gözenek boyutu ve şekli üretim şekli ya da kullanılan hammaddeye bağlı olarak

değişiklik göstermektedir (Ciesla ve Schüth, 1999). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC)'a göre gözenekli malzemeler üç grupta incelenmektedirler:

• Mikrogözenekli malzemeler: gözenek boyutu 2 nm'den küçük,

• MGM'ler: gözenek boyutu 2-50 nm arasında değişen,

• Makrogözenekli malzemeler: gözenek boyutu 50 nm'den büyük.



Şekil 2. 7. Gözenek boyutları ve şekilleri

Kaynak: (Baino vd. , 2017).

Doğru gözenek boyutuna sahip malzemeyi kullanım alanına bağlı olarak seçmek önemlidir. Sıcaklık arttıkça parçacıkların birbirine sinterlenmesi ile önce mikrogözenekler sonra da mezogözenekler ortadan kalkar bir başka deyişle; mikro-MGM'ler ısıl işlemlerden makrogözenekli malzemelere göre daha çok etkilenmektedir. Basınçta ise durum tam tersidir ve makrogözenekli yapılar yüksek basınçtan mikro-MGM'lere göre daha çok etkilenmektedir. Makrogözenekli malzemelerin gözenekler arası boşlukları yüksek basınç altında mikro ya da mezogözenek boyutuna iner (Demirel vd., 1995).

2.4.1. Mezogözenekli malzemeler

MGM'ler birim kütle başına düşen aktif yüzey alanları sayesinde kütle transferini arttırmaları ve bu nedenle yüksek katalitik, adsorpsiyon, iletkenlik özellikler göstermeleri sebebiyle çok fazla tercih edilmektedirler. MGM'lerin sentezinde kullanılan yüzey aktif madde ve silika kaynağı gözenek ve duvar özelliklerinde farklılıkların oluşmasına yol açmaktadır (Zhao vd. , 2000).

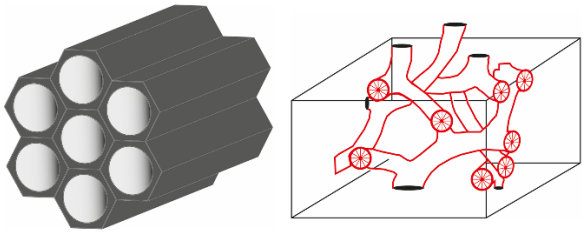
Mezogözenekli yapılarilk olarak 1990 yılında düzenli gözenek boyutuna sahip olan mezogözenekli silika (FSM-16) sentezi ile rapor edilmiştir. 1995 yılında Michigan State University (MSU)'de hekzagonal mezogözenekli silikalar ve moleküler elekler üzerinde yoğunlaşılmıştır. 1998 yılına gelindiğinde; asidik ortamda düzenli mezogözenekli silika malzemeler sentezlenmiştir. Kullanılan yüzey aktif maddeye göre farklı düzende olan bu malzemelere SBA (Santa Barbara Amorphus) malzemeleri adı verilmiştir. 1999 yılında ise periyodik mezogözenekli organosilikalar (PMO) sentezlenmiştir (Inagaki vd. , 1999).

MGM'lerden MCM (Mobil Composition of Matter, Exxon-Mobil Co., ABD) ailesi ve SBA-n ailesi yapılarında mikrogözenek ve mezogözenekleri bir arada bulundurmaları nedeniyle katalizör destek malzemesi olarak tercih edilmektedir.

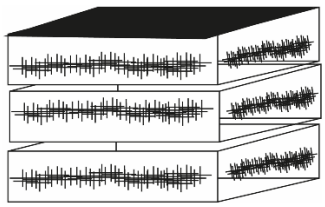
2.4.1.1. M41S ailesi

M41S, çeşitli MCM türü malzeme ailesinin genel adıdır. 1992 yılında, "Mobil Group" bilim insanları düzenli gözenek yapıları, yüksek spesifik yüzey alanları ve belirli gözenek hacmine sahip M41S tipi malzemeler ailesini bildirmiştir (Kresge vd. , 1992). Bu malzemelerin termal dayanıklılıkları yüksektir.

M41S ailesinde aynı maddeden sentezlenmesine rağmen farklı geometrik yapıda malzemeler bulunur. Bunlar; MCM-41 iki boyutlu (2D) altıgen yapıdan, MCM-48 (Ia-3d) kübik yapıdan ve MCM-50 katmanlı yapıdan oluşan malzemelerdir.



MCM-41 **MCM-48**



MCM-50

Şekil 2. 8. M41S ailesi

2.4.1.2. Santa Barbara Amorphus ailesi (SBA)

1998 yılında Zhao ve çalışma arkadaşları Santa Barbara Amorphus (SBA) olarak adlandırılan düzenli gözenek yapısına sahip MGM'leri literatüre eklemişlerdir (Zhao vd. , 1998). Gözeneklerin geometri yapısına göre farklı SBA malzeme çeşitleri elde edilmiştir. Bu malzemeler Tablo 2.4'de sıralanmıştır.

Tablo 2. 4. SBA malzemeleri ve gözenek yapıları.

Malzeme	Gözenek Yapısı
SBA-1	Kübik
SBA-11	Kübik
SBA-12	3D hekzagonal ağ
SBA-14	Lameller
SBA-15	2D hekzagonal ağ
SBA-16	Kübik kafes yapılı

SBA-15; silika yapılı mezogözenekli , son derece düzenli iki-boyutlu (2D) altıgen yapı ile yüksek yüzey alanına (600-1000 m^2/g), 4,6-30 nm aralığında ayarlanabilir gözenek boyutuna, yüksek gözenek hacmine (~1 g/cm^3), kalın duvarlara (3.1 - 6.4 nm), ve yüksek hidrotermal ve termal dayanıklılığa sahiptir (Chen, L.-F. vd. , 2009).

SBA-16; literatürde bildirilen mezogözenekli yapılar arasından kübik kafes yapısı, kalın duvarlarıyla iyi termal kararlılığa sahip olması, ekonomik oluşu ve büyük gözenek yapısı ile destek katalizörü olarak kullanılmaya iyi bir adaydır (Zhao vd. , 1998).

2.5. Grafen Oksit

GO, grafenin oksijen içeren fonksiyonel gruplarla modifiye edilmiş bir formudur. GO, grafene göre daha kolay sentezlenebilir, işlenebilir ve işlevselleştirilebilir. Bu özellikleri sayesinde, GO sensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Karthik vd. , 2021; Liu vd. , 2022; Peña-Bahamonde vd. , 2018). GO sensörleri, çeşitli analitleri tespit etmek için farklı mekanizmalarda kullanabilir.

- GO, elektriksel iletkenliği yüksek ve çevresel değişimlere duyarlı bir malzemedir. Bu nedenle, GO elektrokimyasal sensörlerde elektrot malzemesi olarak kullanılabilir. GO'nun yüzeyine farklı biyomoleküller (enzimler, antikorlar, aptamerler vb.) bağlanarak spesifik hedeflerin tespiti sağlanabilir. GO'nun yüksek yüzey alanı ve düşük arka plan akımı, elektrokimyasal sensörlerin duyarlılığını ve seçiciliğini artırır (Liu vd. , 2022).
- GO, floresan özelliğine sahip bir malzemedir. Bu nedenle, GO floresan sensörlerde sinyal verici olarak kullanılabilir. GO'nun floresansı, çevresindeki moleküllerle etkileşime girerek söndürülebilir veya artırılabilir. Bu şekilde, GO floresan sensörleri, farklı analitleri (metal iyonları, organik moleküller, biyomoleküller vb.) tespit edebilir (Verma vd. , 2022).
- GO, gaz molekülleriyle etkileşime girerek elektriksel direncinde değişimlere neden olan bir malzemedir. Bu nedenle, GO gaz sensörlerde aktif malzeme olarak kullanılabilir. GO'nun gaz molekülleriyle adsorpsiyonu ve desorpsiyonu arasındaki dinamik denge, gaz sensörlerinin yanıt süresini ve geri kazanım süresini belirler. GO'nun yüksek yüzey alanı ve gözenekliliği, gaz sensörlerinin duyarlılığını ve seçiciliğini artırır (Nag vd. , 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar en az analitik saflıktadır ve işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. GO, GOx, Fc, nafyon, düşük moleküler ağırlıklı kitosan, ferrosen karboksilik asit (FcCOOH), human serum albümin, kloroaurik asit ($HAuCl_4$), insülin, askorbik asit ve streptavidin Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. D-Glikoz AFG Bioscience firmasından; N-N dimetilformamid, MCH, potasyum ferrisiyanür, potasyum ferrosiyanür Fluka Analytical firmasından; etanol, potasyum klorür Emsure firmasından; potasyum monobazik, potasyum dibazik, ürik asit Acros Organics firmasından ve asetik asit Riedel de Haen firmasından temin edilmiştir.

5'-NH_2-$(CH_2)_6$-GGT GGT GGG GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC-3', 5'- NH_2 -$(CH_2)_6$- GGT GGT GGG GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC -Fc-3', 5'- NH_2- $(CH_2)_6$-GGT GGT GGG GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC-MB-3' ve SH- $(CH_2)_6$ – GGT GGT GGG GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC- $AttoMB_2$ sekanslarına sahip aptamerler Ella Biotech (Almanya) firmasının yerel temsilcisinden temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışması kapsamında fiziksel ve kimyasal karakterizasyon işlemlerinde Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan ZEISS marka Supra 40 VP model taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDX), Agilent Cary 360 marka Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) ve Pan-Analytical marka X- ışınımı kırınım (XRD) cihazları kullanılmıştır.

Hazırlanan çözeltiler ve deney esnasında kullanılan ultra saf su MP Minipure Dest Plus cihazından elde edilmiştir. Deneylerin hazırlık ve gerçekleştirilme aşamalarında; katı malzemelerin tartımında hassas terazi Radwag/AS 220.R2 (Polonya), çözeltilerin pH ölçümünde pH metre olarak Mettler-Toledo (İsviçre) hazırlanmasında ısıtıcılı manyetik karıştırıcı olarak Elektro-mag, (Türkiye) elektrokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesinde potansiyometre İvium Technologies (Hollanda), ultrasonik banyo Bandelin RK 100 H (Almanya) ısı tabancası Maestro JS-HG-12AII (Çin), vorteks karıştırıcı Jeiotech/VM-96B (Kore) marka cihazlar kullanılmıştır.

Elektrokimyasal deneyler için Dropsens firmasından alınan yüzey alanı 0,059 cm^2 olan DRP-X1110 ve yüzey alanı 0,126 cm^2 olan DRP-X110 elektrotlar kullanılmıştır. Gerçek numune

deneylerinde kullanılan vişne, çilek, kayısı reçelleri KOSKA firmasının ticari olarak satılan ürünlerinden temin edilmiştir.

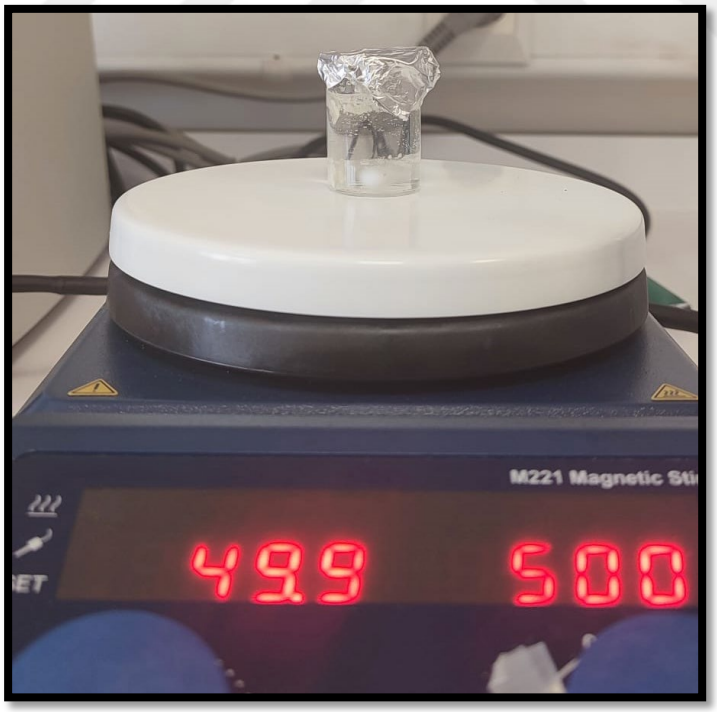
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Potasyum Fosfat Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

0,1 M fosfat tamponu çözeltisi (PBS) monobazik (sodyum fosfat monobazik) ve dibazik (sodyum fosfat dibazik) tuzu ile hazırlanmıştır. 0,1 M monobazik ve 0,1 M dibazik çözeltileri hazırlandıktan sonra dibazik çözeltisinin pH'ı pH metre yardımıyla ölçülmüştür. Hazırlanan dibazik çözeltisine monobazik çözeltisi eklenerek pH düşürülmüş ve istenilen aralığına getirilmiştir. Hazırlanan tampon çözelti 1 gün bekletilmiştir ve pH tekrar ölçülerek sabit pH'a gelmesi sağlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında 0,1 M PBS pH'ı 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kitosanın Hazırlanması

Tez çalışmaları kapsamında %1 g/mL kitosan kullanılmıştır. 0,1 g kitosan tartılarak 0,1 M asetik asit ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti Şekil 3.1.'de gösterilen şekilde 3 saat boyunca 500 rpm ve 50 °C ayarlı manyetik karıştırıcıda tutularak çözünme sağlanmıştır. Hazırlanan polimer çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 1. Kitosanın 500 rpm ve 50 °C'de hazırlanması.

Glikoz Oksidaz Enziminin Hazırlanması

GOx enzimi kullanılacağı deney setine göre farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. 1, 5, 10, 20 mg/mL konsantrasyonlarındaki enzim çözeltileri hazırlanırken 0,45 µm filtre kullanılarak filtre edilmiş 0,1 M PBS kullanılmıştır. Hazırlanan enzim çözeltileri tek seferlik kullanıma uygun hacimlerde eppendorf tüplerine bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu sayede enzimin sıklıkla donma-erime çevrimine (freeze-thaw cycle) maruz kalmasının önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Glikoz Çözeltisinin Hazırlanması

Bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda glikoz kullanılmıştır. Bu sebeple 0,1 M 10 mL stok glikoz hazırlanarak kullanılacak konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Glikoz çözeltisinin hazırlanmasında 0,45 µm filtre ile 3 kere filtre edilmiş 0,1 M PBS kullanılmıştır. Yeni hazırlanmış glikoz çözeltisi mutarotasyon göstereceği için hazırlanan çözelti 1 gün + 4 °C'de bekledikten sonra kullanılmıştır (Silva vd. , 2006).

3.2. Yöntem

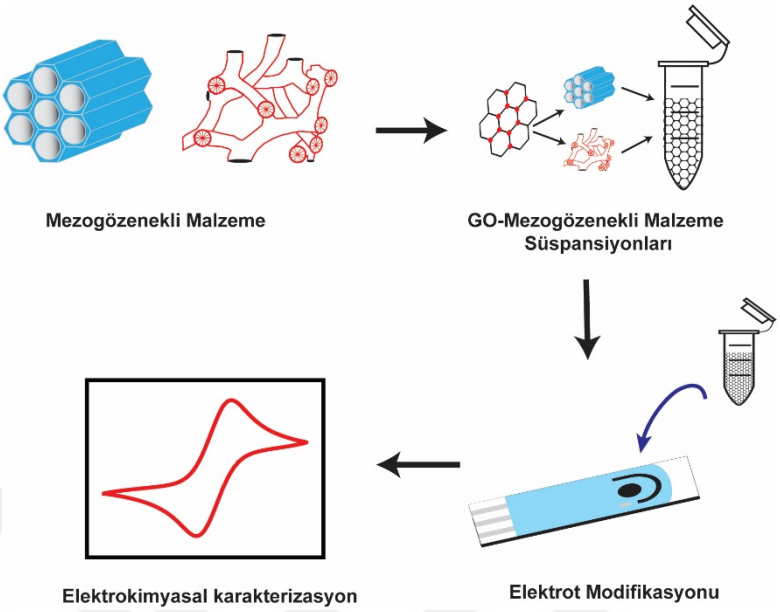
3.2.1. Elektrot Yüzeyinin Stabilizasyonu

SPE'ler PBS içerisinde hazırlanmış 0.1 M KCl ile 0 – (-2) V aralığında 1 mV potansiyel adımı ve 20 mV/s tarama hızında LSV tekniği kullanılarak yüzeyin elektrokimyasal olarak stabilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamına gerçekleştirilen tüm deneylerde elektrotlar yüzeyleri stabilize edilerek kullanılmıştır.

3.2.2. GO/Mezogözenekli Malzeme Elektrotların Hazırlanması

GO/MGM elektrotları hazırlanması aşamasında GO ve hidrotermal yöntemle sentezlenen (Şimşek ve Şahin, 2021) gözenekli malzemeler kullanılmıştır. MCM-41, GO/MCM-48, GO/SBA-15 ve GO/SBA-GO/MCM-41, GO/MCM-48, GO/SBA-15 ve GO/SBA-16 dispersiyon çözeltileri kütlece 1:1, 1:1.5 ve 1:2 oranlarında saf su içerisinde hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler, 0,1 M KCl ile LSV tekniği kullanılarak elektrokimyasal olarak temizlenmiş SPE'lere, malzeme yoğunluğu 0,15 mg/cm^2 (Şahin, 2020) olacak şekilde, damlatıp kurutularak kaplanmıştır. Damlatıp kurutma tekniği yüzey üzerinde tabaka biriktirerek elektrotu modifiye etmek için hızlı bir tekniktir. Kaplanan elektrot, CV tekniği kullanılarak -0,2 – 0,4 V aralığında 50 mV/s tarama hızında elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işleminde 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 2 mM ferri ferro ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$) redoks probu kullanılmıştır. GO'nun MGM ile karıştırılmasının performansa etkisini gözlemlemek amacıyla

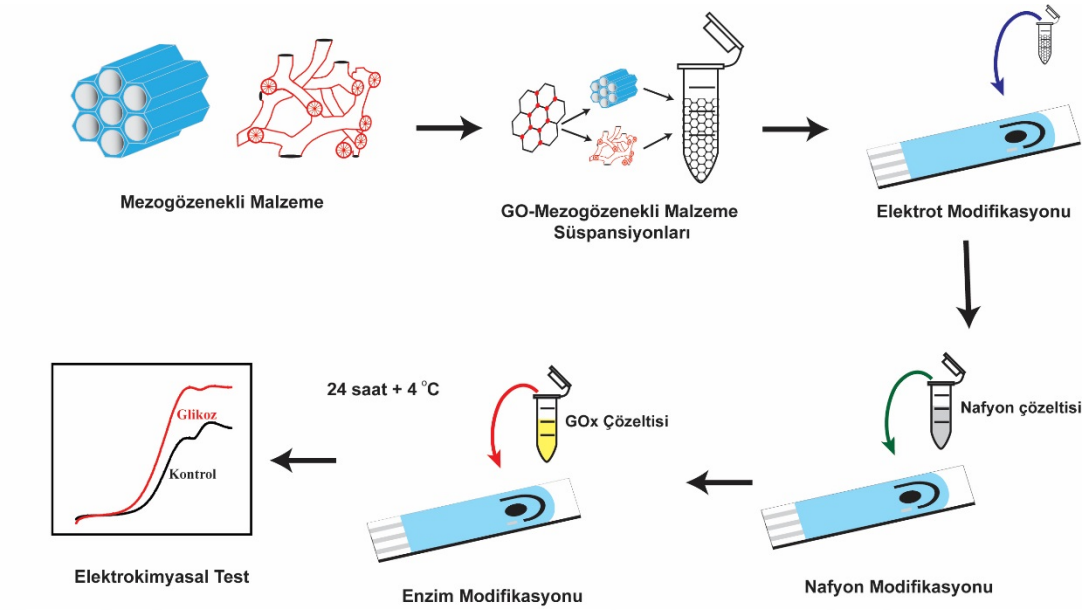
yalnızca GO kaplı bir elektrot ve hiçbir malzeme kaplı olmayan SPE de test edilmiştir. Şekil 3.2.'de GO/MGM elektrotlarının hazırlanışının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3. 2. SPE/GO/MGM elektrotlarının hazırlanışı ve karakterizasyonunun şematik gösterimi.

3.2.3. GO/MGM Elektrotlarına Glikoz Oksidaz Enzimi Tutuklanması

Bir önceki aşamada hazırlanan GO/MGM elektrotlarının CV tekniği ile analizinden her malzeme için en iyi performansı veren kütlece bileşim seçilmiştir. Seçilen disperse çözeltiler (1:1.5 GO/SBA-15, 1:1 GO/SBA-16, 1:1 GO/MCM-41, 1:2 GO/MCM-48) 0.1 M KCl ile elektrokimyasal olarak temizlenmiş elektrotlara malzeme yoğunluğu 0,15 mg/cm^2 olacak şekilde damlatıp kurutma tekniği ile kaplanarak 15 dakika ortam sıcaklığında bekletilmiştir. Elektrotların üzerine 1 µL %0.05 Nafyon-Etanol çözeltisi damlatılarak tekrar 15 dakika ortam sıcaklığında bekletilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 mg/mL) GOx enzimi 0.1 M fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotlar üzerinde 1 µL enzim damlatılarak, +4°C'de 24 saat bekletilerek enzim tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.). Enzim tutuklanması gerçekleştirilen elektrotlar 0.1 M fosfat tamponu (pH:7,4) ile 15 dakika bekletilerek ortam sıcaklığına gelmesi sağlanmış, 3 kez tampon çözelti ile yıkama yapılarak yüzeye zayıf tutunan enzimlerin elektrottan temizlenmesi işlemi yapılmıştır. Elektrokimyasal analizler farklı enzim konsantrasyonları için ayrı ayrı 1 mM FcCOOH ile LSV tekniği kullanılarak kontrol (0 mM glikoz) ve 5 mM glikoz için gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 3. SPE/GO/MGM/GOx elektrotlarının hazırlanışı şematik gösterimi.

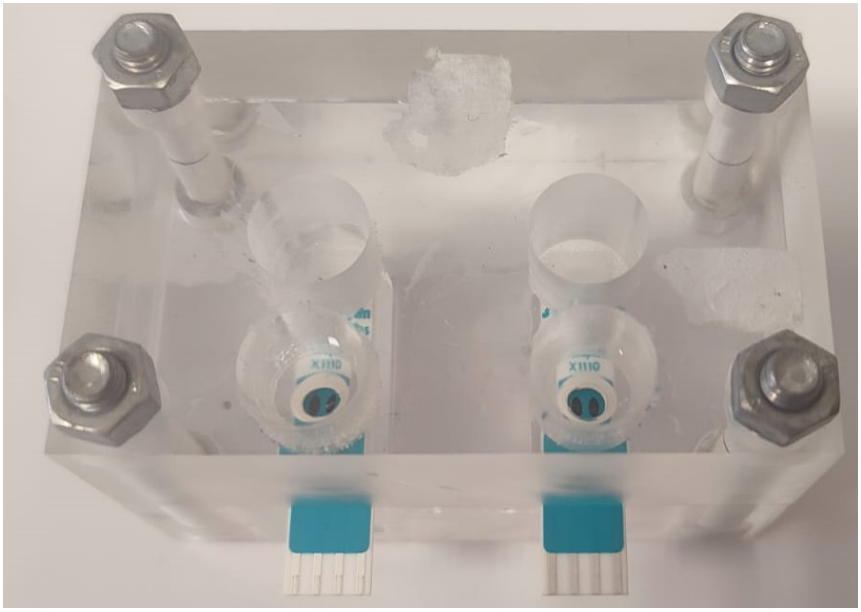
3.2.4. GO/MGM Elektrotlarında Farklı Glikoz Konsantrasyonları Analizi

Elektrotlar bölüm 3.2.3'de anlatılan aşamalar gerçekleştirilerek hazırlanmış olup, enzim optimizasyon çalışmalarında elde edilen LSV analizleri sonuçlarına göre 1 mg/mL GOx konsantrasyonu kullanılmıştır. Elektrotların zamana karşı akım değerleri 0.14 V uygulanarak 0-120 saniye aralığında CA tekniği ile 0,1.3,5,7 mM glikoz için 1 mM FcCOOH mediyatörü kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.5. GO ve GO/MCM-41 Malzemeleri İçin Gün İçi ve Günler Arası Performans Deneyleri

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen güm içi ve günler arası deneyler; bölüm 3.2.4'de iyi performansı gösteren GO/MCM-41 ve GO'nun silika malzeme ile birleşmesinin etkilerini görmek amacıyla yalnızca GO kaplanan elektrotta gerçekleştirilmiştir. Stabil hale getirilmiş yüzeye GO ve GO/MCM-41 kaplandıktan sonra yüzeye %0,05 Nafyon-Etanol çözeltisi damlatılmıştır. Optimizasyon sonuçlarına göre seçilen 1 mg/mL GOx enzimi yüzeye bırakılarak 24 saat + 4 °C'de enzim tutuklanması gerçekleştirilmiştir.

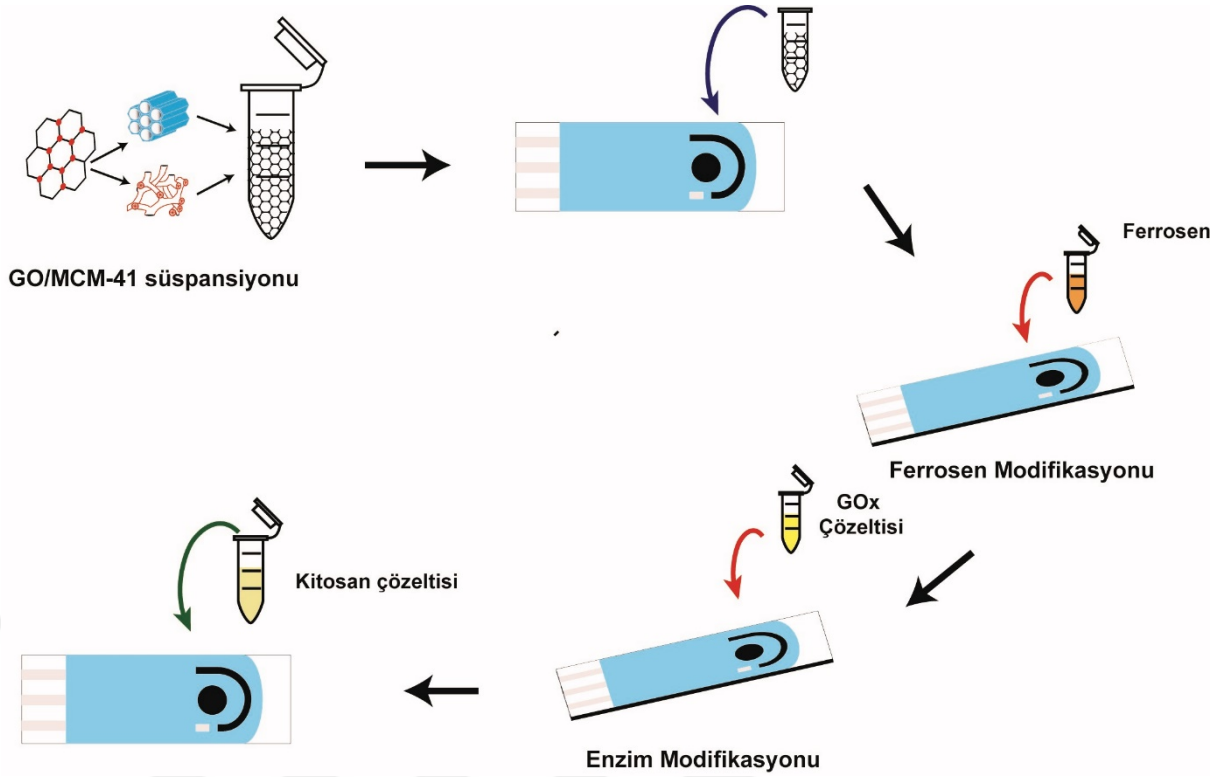
Gün içi deneyler için hazırlanan elektrotlar çıkarıldıktan sonra PBS (pH:7,4) ile yıkanarak ortam koşullarına getirildikten sonra 1 saat aralıklarla 6 kere ölçüm alınmıştır. Elektrot deneyler arasında 0,1 M PBS içerisinde + 4 °C'de bekletilmiştir. Günler arası deneyler 0, 7 ve 14'üncü günlerde 0 mM ve 5 mM glikoz için gerçekleştirilmiştir. Elektrot günler arasında Şekil 3.4.'te gösterilen hücrede 0,1 M PBS içerisinde + 4 °C'de bekletilmiştir.



Şekil 3. 4. Gün içi ve günler arası deneylerde elektrotların saklanma hücresi.

3.2.6. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit Elektrotlarının Modifikasyonu

0,1 M KCl ile temizlenen elektrot yüzeyi üzerine, malzeme yoğunluğu 0,15 mg/cm^2 olacak şekilde GO/MCM-41 süspansiyonu damlatarak kaplama yöntemiyle kaplanmıştır. Elektrot 15 dakika bekletildikten sonra yüzeye DMF içerisinde hazırlanmış 75 mM Fc 5,9 µL (Küçükayar vd. , 2023) kaplanmıştır. Elde edilen SPE/GO/MCM-41 elektrotu üzerine 1 µL 20 mg/mL GOx enzimi bırakılarak 15 dakika ortam koşullarında bekledikten sonra 0,1 M asetik asit içerisinde hazırlanmış %1 g/mL kitosandan 2 µL yüzeye damlatılarak yüzeyde polimer film oluşturulmuştur. Şekil 3.5.'de GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarının hazırlanması şematik olarak gösterilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda enzim performansının en iyi olduğu enzim tutuklanma süresi 4 gün olarak belirlenmiştir. Hazırlanan elektrotlar 4 gün + 4 °C'de enzim tutuklanması gerçekleştirildikten sonra kullanılmıştır.



Şekil 3. 5. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarının hazırlanması şematik gösterimi.

3.2.7. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit Elektrotlarının Performans Analizleri

3.2.7.1. Kalibrasyon Eğrisi Elde Edilmesi

Bölüm 3.2.6.'da anlatılan şekilde modifiye edilen GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarına 4 gün + 4 °C'de enzim tutuklanması gerçekleştirilmiştir. 4. gün çıkarılan elektrot 0,1 M PBS ile 15 dakika bekletilerek ortam sıcaklığına gelmesi sağlandıktan sonra 3 kere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Analiz için hazır hale getirilen elektrotlara 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 50, 75 ve 100 mM glikoz çözeltilerinden 200 µL koyularak CA tekniği ile test edilmiştir ve 4 tekrar ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

3.2.7.2. Girişim Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde hazırlanan biyosensöre glikoz ölçümü esnasında girişim yapabilecek moleküllerin etkisi incelenmiştir. Ürik asit (UA), askorbik asit (AA) ve insülin (Ins) glikoz içeren numunelerde bulunabilecek maddeler olarak seçilmiştir. Bu amaçla 0,15 mM UA, 0,15 nM Ins, 0.45 µM AA'nın girişim etkileri incelenmiştir. Daha sonra bu maddelerle 5 mM glikoz içeren bir karışım oluşturulmuş ve geliştirilen biyosensörün bu karışımdaki glikoza diğer bileşiklere göre seçiciliği değerlendirilmiştir.

3.2.7.3. Gerçek Numune Analizleri

Geliştirilen biyosensörün gerçek numunedeki uygulamasını belirlemek için 3 farklı reçelin glikoz analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kayısı, çilek ve vişne reçellerinin temini ticari olarak üretim yapan KOSKA firmasından sağlanmıştır. Kullanılacak gerçek numunelerin hazırlık aşamasında hassas terazi ile tartılan 10 g reçel 0.1 M PBS ile 100 mL'ye tamamlanarak seyreltilmiştir. 0,1 g/mL reçel çözeltisi 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 6 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında katı-sıvı fazı ayrılan çözeltinin sıvı fazından alınan numuneler 0,45 µm filtreden geçirilmiştir. Kayısı, çilek ve vişne reçelleri için aynı işlemler tekrarlanarak stok çözeltiler elde edilmiştir. Biyosensörün gerçek numunedeki glikozu belirleme analizleri kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

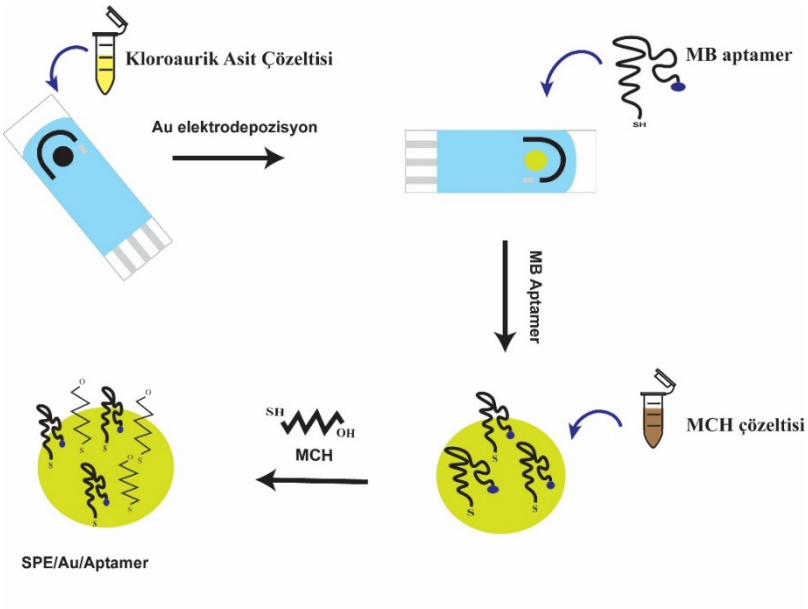
3.2.7.4. Raf Ömrü ve Tekrar Üretilebilirlik Analizleri

Biyosensörün raf ömrünü belirlemek amacıyla 4°C'de saklanan elektrotların ölçümleri 0, 6, 13 ve 27'nci günlerde CA tekniği kullanılarak 5 ve 10 mM glikoz ile alınmıştır. Raf ömrü deneyleri 4 kez tekrar edilmiştir ve yüzde değişimler hesaplanmıştır (n=4). Biyosensörün tekrar üretilebilirliğini incelemek amacıyla; aynı deney koşullarında hazırlanan on farklı elektrot ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen akım değerlerindeki RSD sapmalar hesaplanarak biyosensörün tekrar üretilebilirliği değerlendirilmiştir.

3.2.8. İnsülin Tayini İçin Aptasensör Geliştirilmesi

3.2.8.1. Au Kaplama ve Aptamer Tutuklanması

Çalışmanın bu bölümünde DRP X110 elektrotlar kullanılmıştır. Elektrotların üzerine Au kaplanması elektrodepozisyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 0,1 M KCl ile elektrokimyasal olarak temizlenen elektrotlar kurutulduktan sonra, 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 1 mM $HAuCl_4$ çözeltisi kullanılarak CV tekniği ile Au kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Au kaplanan elektrotlar 0,1 M PBS ile yıkanıp kurutulduktan sonra 0,1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) içerisinde hazırlanmış 10 µM derişimde SH- $(CH_2)_6$ – GGT GGT GGG GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC- $AttoMB_2$ sekansına sahip MB aptameri (MB) yüzeye modifiye edilmiştir. Aptamer yüzeye koyularak bekletilmiş, fosfat tampon çözeltisi ile yıkama yapıldıktan sonra 1 mM merkaptohekzanol (MCH) kullanılarak Au yüzeyi insülinin Au ile etkileşime geçmemesi için bloklanmıştır. Aptasensör geliştirilmesi çalışmasındaki tüm deneyler 23 ± 1 °C'de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 6. SPE/Au/MB Aptamer elektrotlarının hazırlanma şeması.

Şekil 3.6. SPE/Au/MB Aptamer elektrotlarının hazırlanmasını şematik olarak göstermektedir. Çalışmanın bu aşamasında aptamer, MCH ve insülin inkübasyon sürelerinin optimizasyonu iki adımdan oluşmaktadır. Merkezi karma tasarım olarak bilinen tepki yüzeyi yöntemi kullanılmıştır. Birinci adımda aptamer ve MCH inkübasyon sürelerinin elektrot performansına etkisi incelenmiştir. İkinci adımda insülin inkübasyon süresi ile beraber toplam aptasensör performansı optimize edilmiştir. Aptamer, MCH ve insülin inkübasyon süreleri Design Expert 12 programı ve cevap yüzeyi yöntemi ile optimize edilmiştir.

3.2.8.2. Aptamer ve MCH Sürelerinin Optimizasyonu

İlk adımda literatürdeki aptamer immobilizasyon çalışmalarındaki verilere dayanılarak zaman parametreleri; aptamer için 30-240 dakika, MCH için 15-90 dakika ve Ins için de 5-90 dakika olacak şekilde seçilmiştir. Önce insülinin olmadığı, daha sonra insülinin olduğu durumda SWV analizi yapılmış, iki deney sonucunda alınan pik akım değerlerinin arasındaki fark deneysel cevap olarak kullanılmıştır. Bu akım değerlerinin değişiminde aptamer, MCH ve insülin inkübasyon sürelerinin etkisi incelenerek hatayı minimize ederken, akım değerini maksimize eden süreler bulunmuştur. Tablo 3.1'de sistemin aptamer ve MCH için vermiş olduğu inkübasyon süreleri gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Aptamer ve MCH inkübasyon sürelerinin elektrot performansına etkisinin belirlenmesi için Design Expert programı tarafından belirlenen deneyler.

Deney No	Aptamer İnkübasyon Süresi (dak)	MCH İnkübasyon Süresi (dak)
1	135	52,5
2	240	90
3	30	90
4	135	52,5
5	135	15
6	135	52,5
7	240	15
8	30	15
9	135	52,5
10	240	90
11	30	90
12	135	52,5
13	135	90
14	30	15
15	240	15
16	135	52,5
17	30	52,5

3.2.8.3. İnsülin Süresinin Optimizasyonu

Bölüm 3.2.9.2'de aptamer ve MCH inkübasyon sürelerine ek olarak ikinci aşamada insülin inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Bölüm 3.2.9.1'de açıklanan şekilde hazırlanan SPE/Au/APT elektrotları 0,1 M PBS çözeltisi ile yıkanarak insülin inkübasyonu için hazır hale getirilmiştir.

Tablo 3. 2. İnsülin inkübasyon süreleri optimizasyonu için Design Expert programı tarafından belirlenen deneyler.

Deney No	Aptamer İnkübasyon Süresi (dak)	MCH İnkübasyon Süresi (dak)	İnsülin İnkübasyon Süresi (dak)
1	135	52,5	47,5
2	240	90	90
3	30	90	90
4	135	52,5	47,5
5	135	15	47,5
6	135	52,5	90
7	240	15	5
8	30	15	47,5
9	135	52,5	5
10	240	90	47,5
11	30	90	5
12	135	52,5	5
13	135	90	47,5
14	30	15	47,5
15	240	15	90
16	135	52,5	90
17	30	52,5	47,5

3.2.9. SPE/Au/Apt/Ins Elektrotlarının Performans Analizleri

3.2.9.1. Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

Stabil hale getirildikten sonra altın kaplanan ve yüzeye aptamer modifiye edildikten sonra elde edilen SPE/Au/Apt elektrotları optimize edilen süreler doğrultusunda SWV tekniği ile ilk olarak insülin inkübe edilmeden önce 0.1 M PBS içerisinde test edilmiştir. Daha sonra 25 dk boyunca farklı miktarlarda insülin (25 pM, 50 pM, 100 pM ve 150 pM) inkübe edilerek SPE/Au/Apta/Ins elektrodu elde edilmiştir. Elektrot 0.1 M PBS (pH 7.4) kullanılarak 3 kere yıkanmıştır. SPE/Au/Apta/Ins elektrotları 0.1 M PBS içerisinde SWV tekniği kullanılarak test edilmiştir. Aptasensör cevabı olarak insülin inkübe edilmeden önceki ve sonraki iki durum arasındaki akım değişimi alınmıştır. (n=3)

3.2.9.2. Raf ömrü Analizleri

Raf ömrü deneyleri için hazırlanan SPE-Au/Apta/Ins elektrotlar sıfır değeri alındıktan sonra 10 gün boyunca +4 °C'de saklanmıştır. 10 gün sonunda 50 pM insülinle test edilerek referans değere göre akım farkı değerindeki değişim yüzde olarak hesaplanmıştır. (n=3)

3.2.9.3. Girişim Etkisinin Belirlenmesi

Bu nedenle hazırlanan aptasensöre potansiyel girişim yapacak 4 farklı madde insülinle optimize edilen süre boyunca inkübe edilmiş ve akım değerindeki farklar incelenmiştir. Streptavidin, glikoz, trombin ve ürik asit konsantrasyonları sırasıyla 1,5 mM, 50 pM, 0,5 µM ve 0,15 mM olarak belirlenmiştir. Bu değerler 3 katı seyreltilmiş kan içerisinde ortalama bulunacak değerler ve streptavidin için insülinle eş değer olacak şekilde belirlenmiştir.

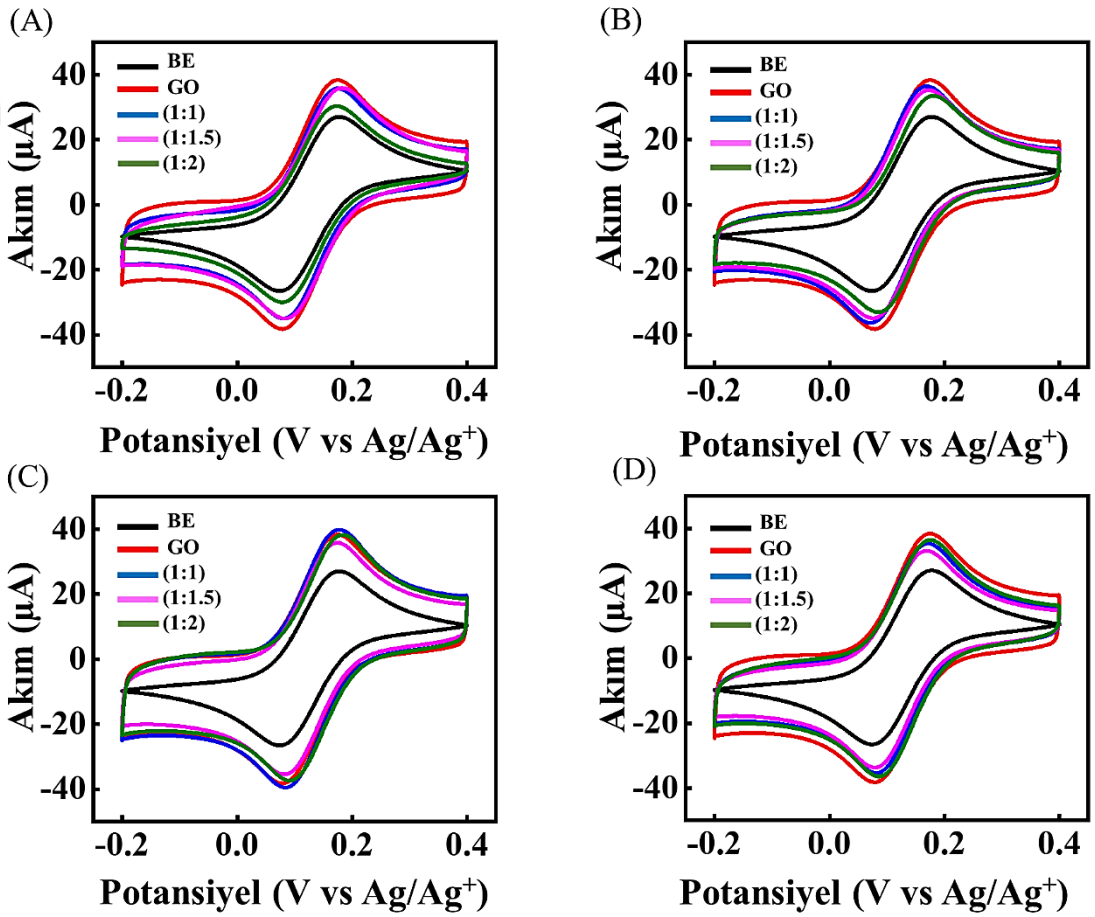
Glikozun kanda yüksek konsantrasyonda bulunması, streptavidin protein modelinin insülinle benzer boyuta sahip olması, trombinin kan örneği alımı esnasında potansiyel bir girişim olarak ortaya çıkabilecek olması ve daha önce insülin için tercih edilmemiş ancak yüksek girişim potansiyeline sahip olduğunun tespit edilmesi sebebiyle ürik asit bu çalışmada girişim yapan maddeler olarak seçilmiştir.

Deneyler kalibrasyon çalışmalarına benzer olarak gerçekleştirilmiş, ilk olarak SPE-Au/Apta/Ins elektrotlar insülin yokken test edilmiş ve daha sonra 50 pM insülin ile aynı anda farklı miktarlarda girişim yapması muhtemel maddeyle inkübe edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

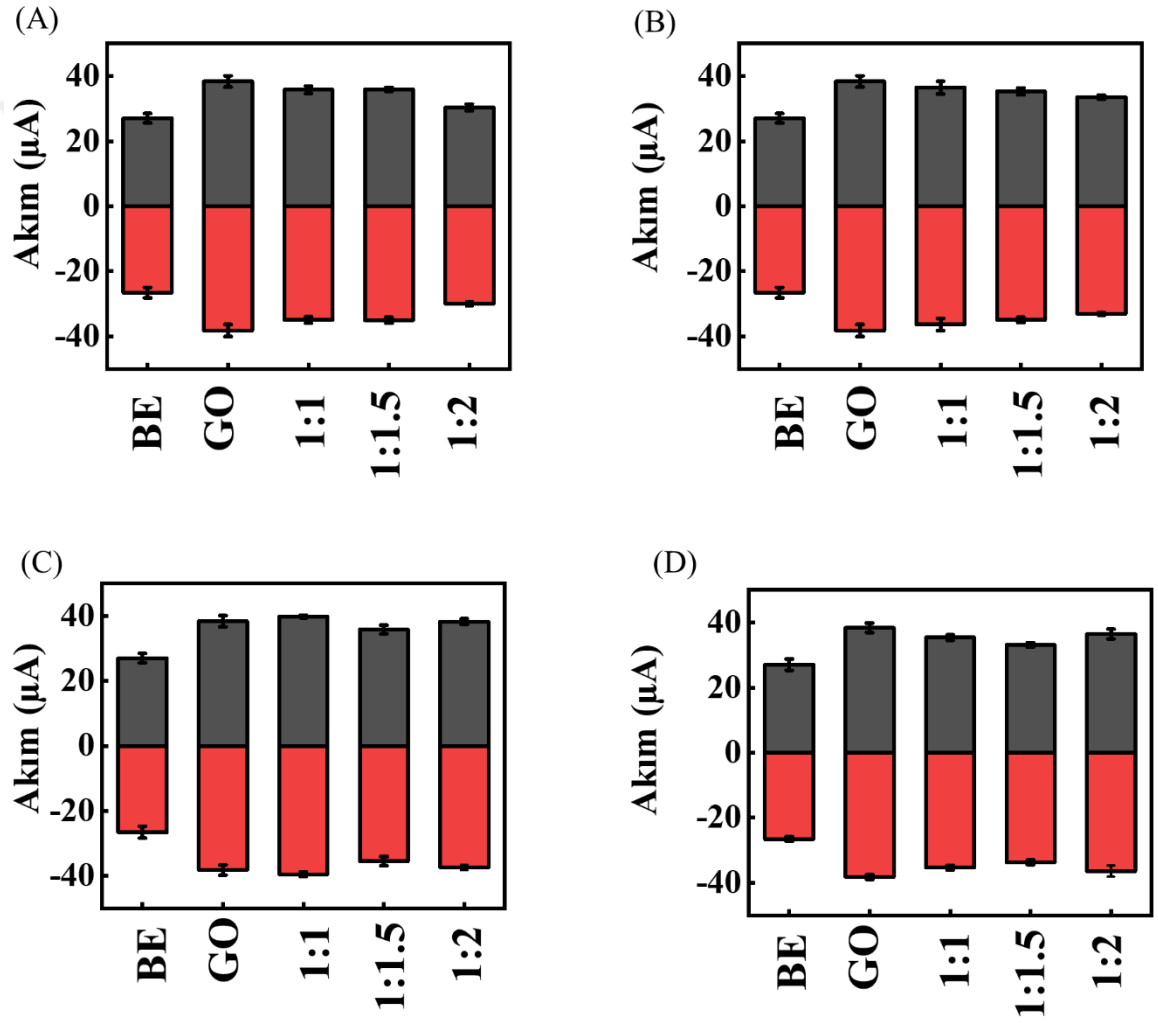
4.1. GO/MGM Elektrotlarının Karakterizasyonu

İlk olarak MGM'ler kullanılarak hazırlanan farklı elektrotların elektrokimyasal performansları CV tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu kapsamda Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde modifiye edilen GO/MGM elektrotları 2 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probu içerisinde 50 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Şekil 4.1'de verilen voltomogramlarda hiçbir malzeme kaplanmamış elektrot (BE), GO kaplanmış elektrot ve GO/MGM kaplanan elektrottan alınan akım değerleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 1. (A) SBA-15 (B) SBA-16 (C) MCM-41 (D) MCM-48 malzemelerinin kütlece 1:1, 1:1.5, 1:2 oranlarında GO ile karıştırılmasıyla hazırlanan çözeltilerin SPE üzerine kaplanmasıyla elde edilen CV eğrileri. CV analizleri 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 2 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probu içerisinde 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. (n=3).

GO ile kaplanan elektrotlarda anodik ve katodik pik akım değerlerinin BE'ye kıyasla artış gösterdiği görülmüştür. Bu artış GO'nun iletkenliğinin kaplanmamış elektrota göre daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışma kapsamında kullanılan GO, elektriksel iletkenliği yüksek %4-10 arasında köşesi oksitlenmiş türde seçilmiştir. Dolayısıyla tamamen oksitlenmiş GO'ya kıyasla daha yüksek bir elektriksel iletkenliğe sahiptir. Diğer yandan, elektriksel olarak yalıtkan olması beklenen silikanın GO ile karıştırılmasıyla elde edilen çözeltiler elektrotlara kaplandığında SPE/GO elektrotuna göre beklenildiği gibi daha düşük akım değerleri elde edilmiştir. Karışımlarda silika miktarının artmasının da daha düşük akım değerleri vererek daha kötü elektrokimyasal performans gösterdiği sonucu elde edilmiştir.



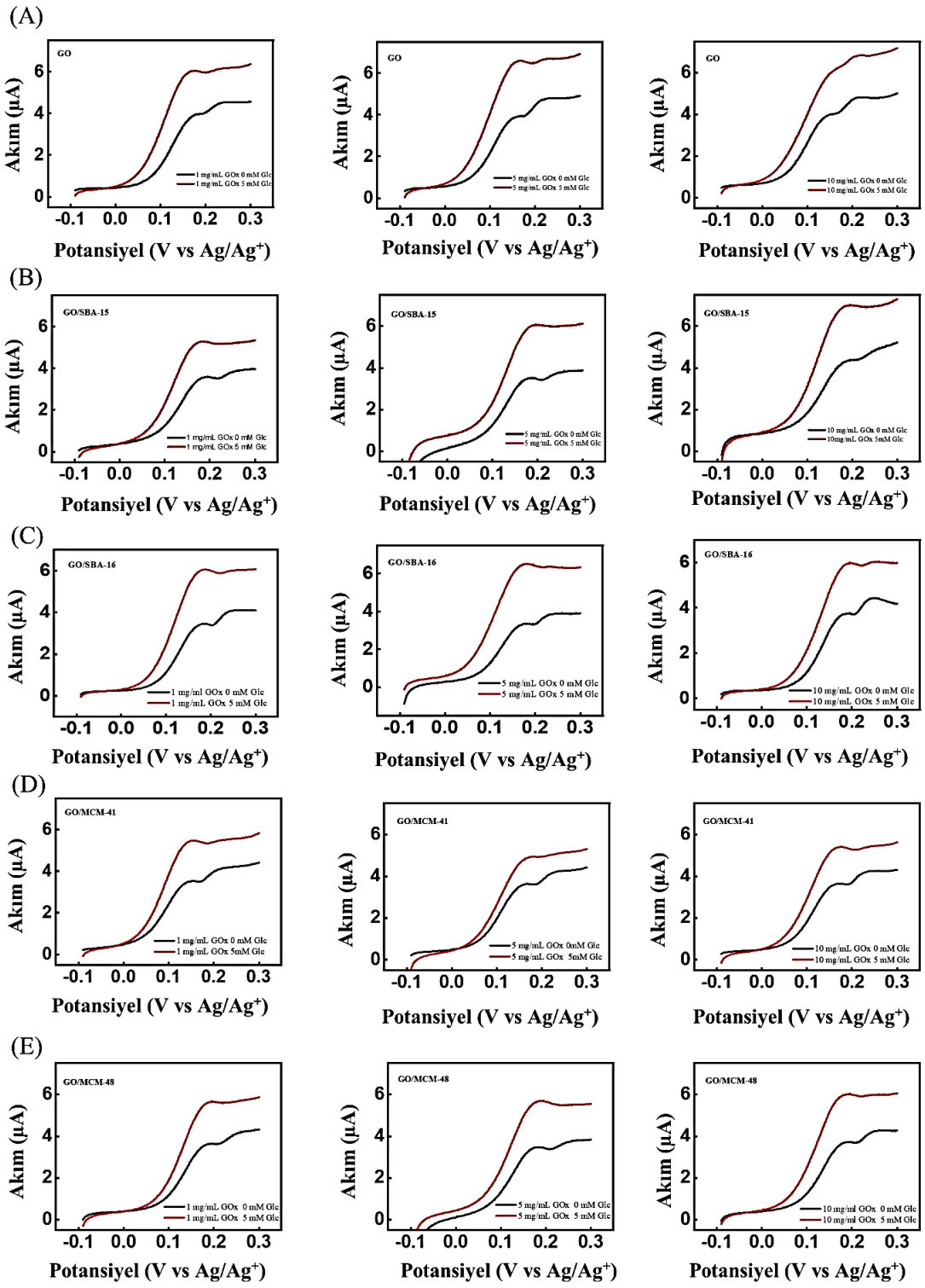
Şekil 4. 2. (A) SBA-15 (B) SBA-16 (C) MCM-41 (D) MCM-48 için Şekil 4.1'de verilen CV eğrilerinden elde edilen anodik-katodik pik akım değerleri ve standart hatalar.

Elde edilen pik akım değerleri ve standart hata verileri karşılaştırılarak elektrokimyasal performans bakımından GO'ya farklı MGM'lerin en az etki ettiği kütlece bileşimler belirlenmiştir. Belirlenen bileşimler daha sonra enzim optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Seçilen kütlece bileşimler; 1:1.5 GO/SBA-15, 1:1 GO/SBA-161:1 GO/MCM-41, 1:2 GO/MCM-48'dir. Diğer silika malzemelere kıyasla kütlece 1:1 GO/MCM-41 modifiye edilmiş elektrotun GO modifiye edilmiş elektrota göre azalmayan davranış gösterdiği görülmüştür ve elde edilen bu karışımda silikanın elektrokimyasal performansa olumsuz etkisinin daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). MCM-41'in bu çalışmada kullanılan diğer silika malzemelerine göre nispeten daha büyük yüzey alanına ve gözenek yükleme kapasitesine sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (Simsek vd. , 2017) ve bu özelliklerinin daha farklı performans göstermesine neden olabileceği değerlendirilmiştir.

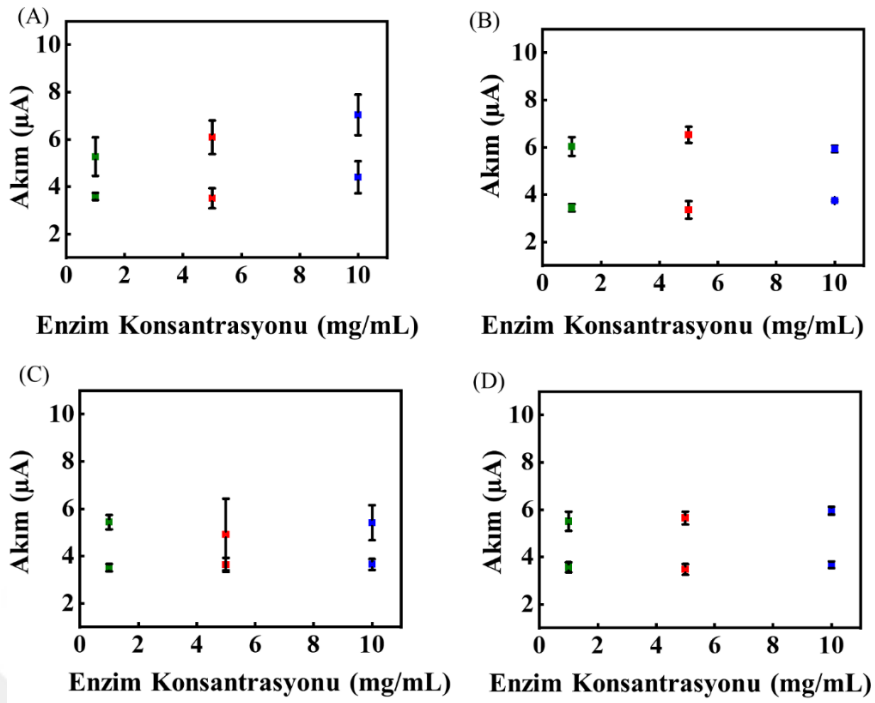
4.2. GO/MGM Modifiye Edilmiş Elektrotlarda Enzim Performansı

Bu bölümde kullanılan enzim tutuklanmış GO/MGM modifiye elektrotlar Bölüm 3.2.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. GO/MGM elektrotlarına 24 saat +4 °C'de GOx enzimi tutuklanması gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan elektrotlar GO/MGM/GOx olarak isimlendirilmiştir. GO/MGM elektrotları için kullanılacak optimum enzim konsantrasyonunun belirlenmesi için hazırlanan elektrotlara farklı enzim konsantrasyonları (1, 5 ve 10 mg/mL) tutuklanmış ve elde edilen LSV eğrileri Şekil 4.3'te verilmiştir. Deneyler optimize edilen mezogözenekli malzeme kütlece birleşimleri kullanılarak (1:1.5 GO/SBA-15, 1:1 GO/SBA-161:1 GO/MCM-41, 1:2 GO/MCM-48) 1 mM FcCOOH içerisinde 0 mM ve 5 mM glikoz için gerçekleştirilmiştir.

Belirlenmiş MGM ile hazırlanan farklı GO/MGM/GOx elektrotlarının LSV eğrilerinden elde edilen pik akımlarının farklı enzim konsantrasyonlarına göre değişimi ise Şekil 4.4'de verilmiştir. Cevaplar incelendiğinde, 0 mM glikoz ve 5 mM glikoz varlığında gerçekleştirilen deneyler sonucunda tüm GO/MGM/GOx elektrotları için 1 mg/mL GOx konsantrasyonu kullanıldığında yüksek akım ve düşük hata elde edildiği görüşmüştür. Enzim konsantrasyonunun artmasının elde edilen akım değerlerine fazla etki etmediği ve bazı malzemeler için -özellikle de etki ettiği durumlarda- yüksek standart sapma değerleri elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle 1 mg/mL GOx konsantrasyonu sonraki deneyler için optimum enzim konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 3. GO/MGM/GOx modifikasyonları için farklı enzim konsantrasyonları (1, 5, 10 mg/mL GOx) analizleri (20 mV/s) (A) GO (B) GO/SBA-15 (C) GO/SBA-16 (D) GO/MCM-41 (E) GO/MCM-48 (n=3).

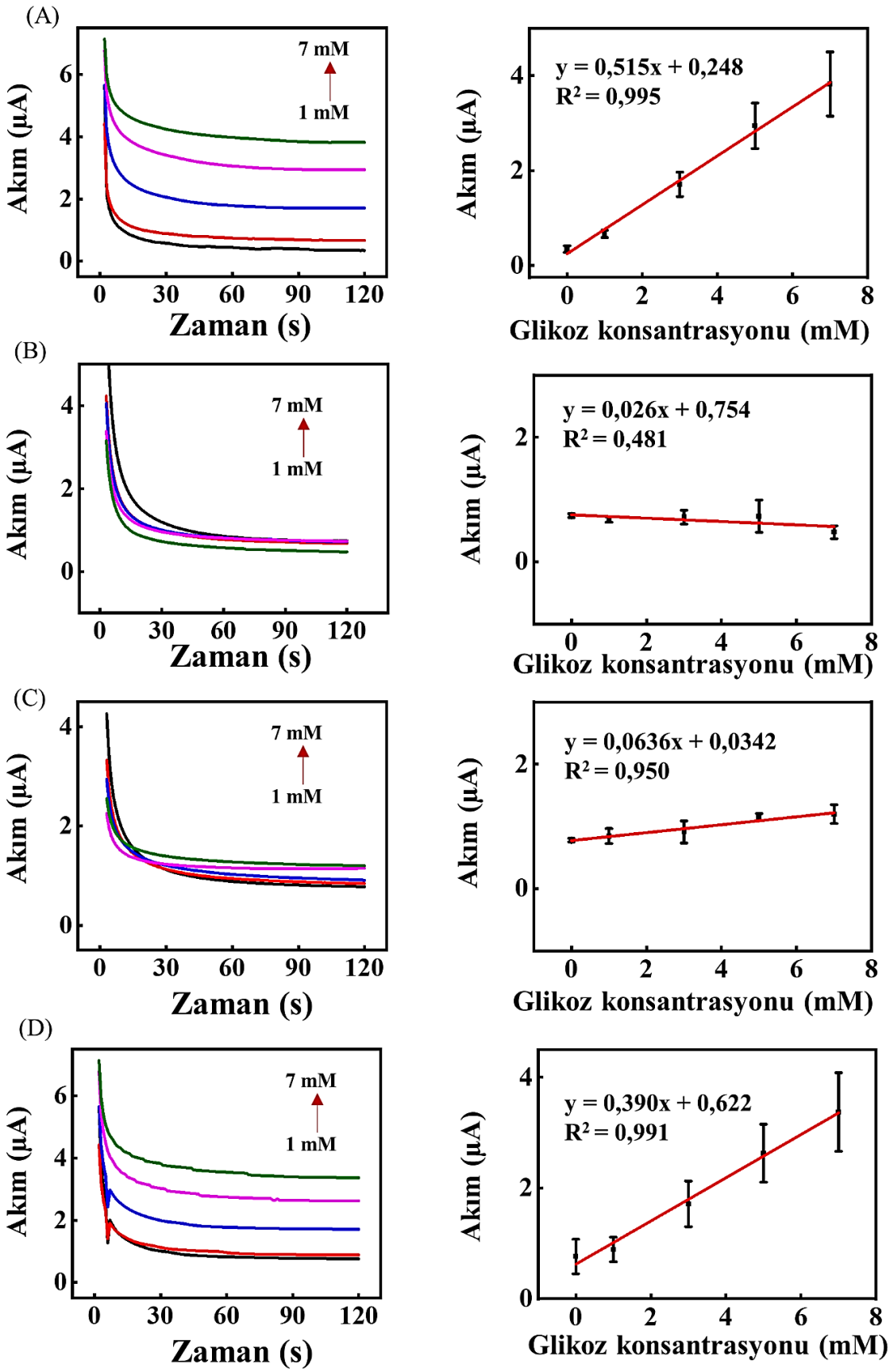


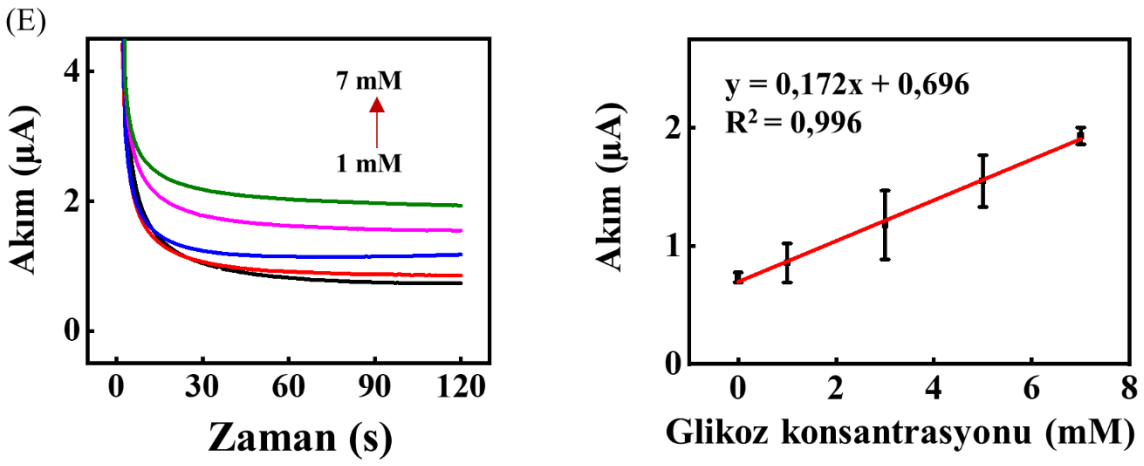
Şekil 4. 4. (A) GO/SBA-15 (B) GO/SBA-16 (C) GO/MCM-41 (D) GO/MCM-48 kaplı elektrotların 1, 5, 10 mg/mL enzim konsantrasyonları pik akım ve standart hata grafikleri.

4.3. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Analizi Sonuçları

Seçili MGM'ler ile hazırlanan GO/MGM/GOx elektrotlarının farklı glikoz konsantrasyonlarında elde edilen zamana karşı akım değişimleri CA yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.5). Uygulanan voltaj GO/MGM/GOx elektrotlarının Şekil 4.3.'de verilen LSV sonuçlarında elde edilen anodik pikten 0,14 V olarak belirlenmiştir. Şekil 4.5'te ise 1, 3, 5, ve 7 mM glikoz konsantrasyonları kullanılarak elde edilen CA deneyleri ve 120 saniyede elde edilen akım değerlerinden elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrileri verilmiştir.

Şekil 4.5.'de verilen CA analizleri incelendiğinde GO/SBA-15/GOx ve GO/SBA-16/GOx elektrotlarının artan glikoz konsantrasyonuna karşı lineer bir cevap artışı göstermediği görülmüştür. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimleri incelendiğinde GO ile hazırlanan elektrotun daha hassas cevap verdiğini göstermektedir. GO/MCM-41 ve GO/MCM-48 ise kendi aralarında benzer sonuçlar göstermekle beraber GO/MCM-48 için elde edilen verilerin standart sapma değerlerinin daha yüksek olduğu ve doğrusal eğrinin eğiminin ise MCM-41'e göre yaklaşık 2,3 kat daha az olduğu görülmüştür. Glikoz konsantrasyonu arttıkça artış gösteren akım değerleri enzimin doğru şekilde tutuklandığını ve GOx ile glikozun reaksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu aşamada GO ile en benzer sonuçları ve en iyi performansı nedeniyle GO/MCM-41 sensör çalışmaları için en uygun malzeme olarak belirlenmiştir.

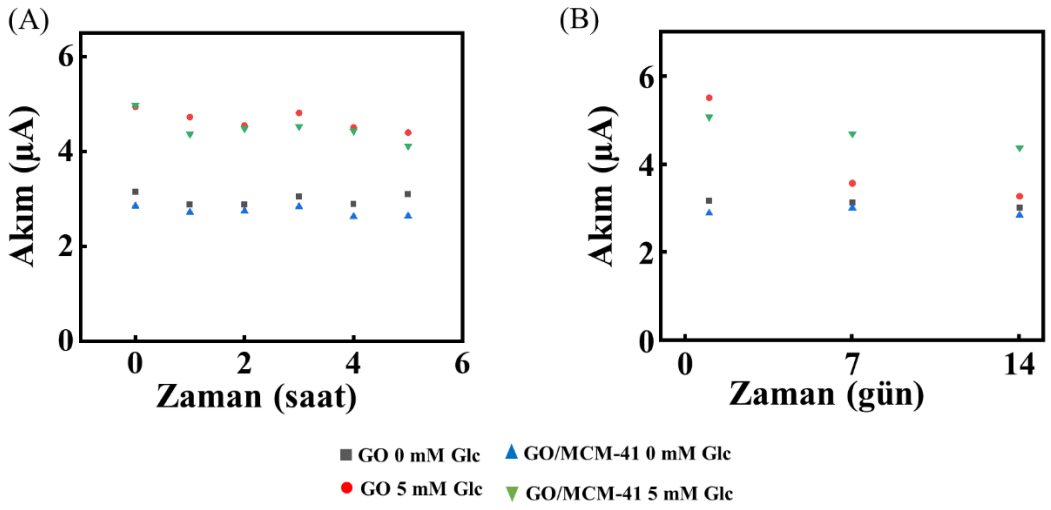

(A)
7 mM
1 mM
Akım (µA)
Zaman (s)
y = 0,515x + 0,248
R² = 0,995
Glikoz konsantrasyonu (mM)
(B)
7 mM
1 mM
Akım (µA)
Zaman (s)
y = 0,026x + 0,754
R² = 0,481
Glikoz konsantrasyonu (mM)
(C)
7 mM
1 mM
Akım (µA)
Zaman (s)
y = 0,0636x + 0,0342
R² = 0,950
Glikoz konsantrasyonu (mM)
(D)
7 mM
1 mM
Akım (µA)
Zaman (s)
y = 0,390x + 0,622
R² = 0,991
Glikoz konsantrasyonu (mM)



Şekil 4. 5. GO/MGM/GOx modifikasyonları için farklı glikoz konsantrasyonları (1, 3, 5, 7 mM glikoz) CA analizleri (0.14 V, 120 saniye) ve kalibrasyon eğrileri (A) GO (B) GO/SBA-15 (C) GO/SBA-16 (D) GO/MCM-41 (E) GO/MCM-48 (n=3).

4.4. GO ve GO/MCM-41 Elektrotları İçin Gün İçi ve Günler Arası Performans Deneyleri

Gün içi ve günler arası deneylerin gerçekleştirilmesinde GO/GOx ve diğer MCM'lere kıyasla en iyi performansı gösterdiği belirlenen GO/MCM-41/GOx elektrotu kullanılmıştır. Bölüm 3.2.5.'te verilen şekilde hazırlanan elektrotlar gün içi deneyler için birer saat aralıklarla 6 analiz ve günler arası deneyler için 1., 7. ve 14. günlerde 0 mM ve 5 mM glikoz varlığında 1 mM FcCOOH ile LSV tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar deney aralarında 0,1 M PBS içerisinde bekletilerek yüzeylerinin kurumaması sağlanmıştır.



Şekil 4. 6. GO/GOx ve GO/MCM-41/GOx elektrotları için (A) gün içi ve (B) günler arası performans deneyleri.

Gün içi deney sonuçları, her iki elektrodun da benzer bir performans sergilediğini ve sonuçların glikoz konsantrasyonundan bağımsız olarak mevcut yanıtta önemli bir değişiklik göstermediğini göstermektedir.

Şekil 4.6. ve Tablo 4.1.'de verildiği üzere GO/MCM-41 elektrotunun performansı günler arası stabilitede GO'ya göre üstündür. GO/GOx ve GO/MCM-41/GOx elektrotlarının gün içi ve günler arası performanslarının değişimini gösteren RSD'lerinin hesaplanmasıyla elde edilen Tablo 4.1. incelendiğinde GO/GOx elektrotu 5 mM için günler arası deneylerde alınan akımda %40,57'lik bir düşüş gösterirken, SPE/GO/MCM-41/GOx için akım değişikliği yaklaşık olarak %13,75'tir. Bunun nedeni, silika bazlı GO kompozitinin kaplama ve enzim stabilitesi için daha uygun bir ortam sağlayabileceğini destekleyen GO/GOx elektrotunun GO/MCM-41/GOx ile karşılaştırıldığında dengesiz davranışı olabilir.

Tablo 4. 1. GO/GOx ve GO/MCM-41/GOx elektrotlarının gün içi ve günler arası performans deneylerinin yüzde değişim değerleri.

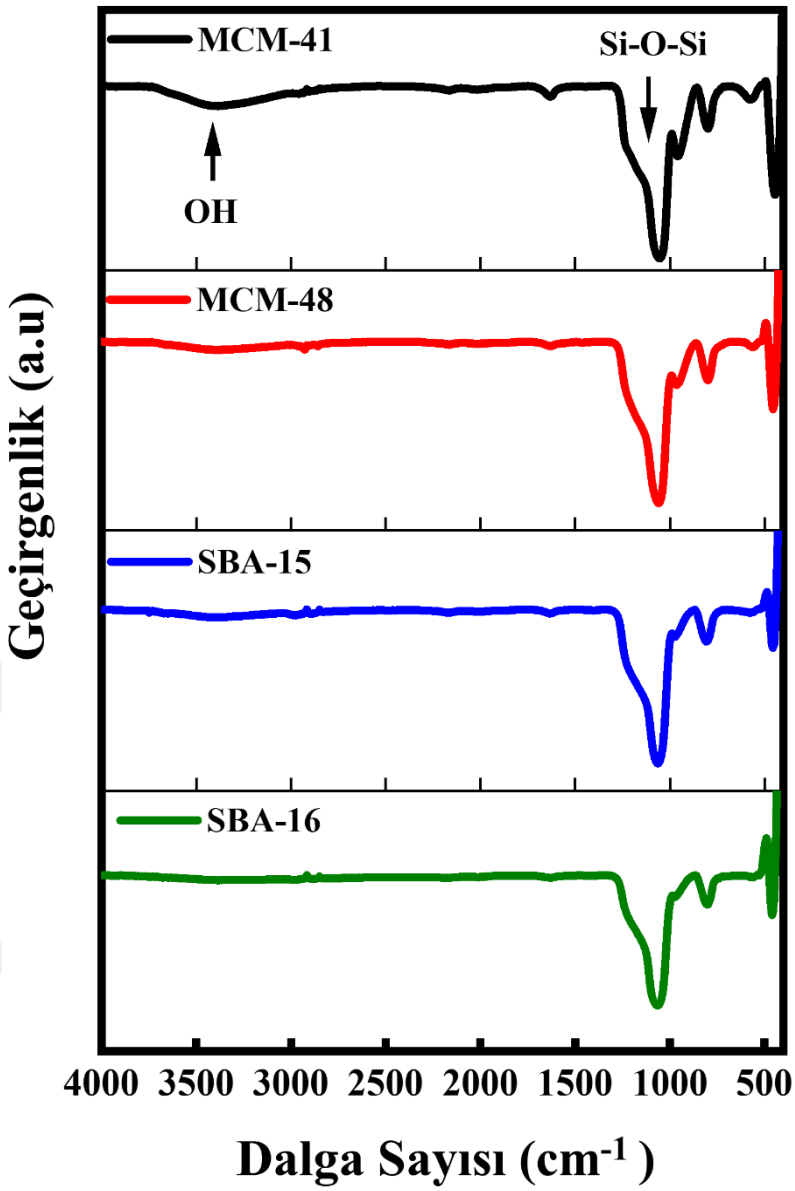
Elektrot	Gün içi % değişim		Günler arası % değişim	
	0 mM Glikoz	**5 mM glikoz**	**0 mM Glikoz**	**5 mM glikoz**
GO	1,45	10,95	4,83	40,57
GO/MCM-41	7,36	17,32	1,61	13,75

4.5. Silika Kaynaklı Mezogözenekli Malzemelerin Karakterizasyon Sonuçları

Çalışmanın bu aşamasında MGM'lere ait fiziksel özellikleri belirlemek amacıyla FT-IR, XRD ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.5.1. FT-IR Analizi Sonuçları

FT-IR analizleri Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki Perkin Elmer marka IR cihazında ATR (Attenuated Total Reflectance) tekniği kullanılarak 4000-300cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen FT-IR analiz sonuçları Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4. 7. Silika kaynaklı MGM'lerin FT-IR analiz sonuçları.

Silika kaynaklı MGM'lerin (MCM-48, MCM-41, SBA-16 ve SBA-15) FT-IR analiz sonuçları incelendiğinde, silika yapısına ait Si-O-Si bağlarına ait bantlar MCM-48 için 1059 cm^{-1} (Huang vd. , 2003; Şimşek ve Şahin, 2021), MCM-41 için 1053 cm^{-1} (Nasiriani vd. , 2023; Villegas vd. , 2017), SBA-16 için 1065 cm^{-1} (Cao vd. , 2016) ve SBA-15 için 1064 cm^{-1} dalga boylarında tespit edilmiştir (Saikia vd. , 2007). MCM-41'in 965 cm^{-1} ve 789 cm^{-1}'deki bantları ise sırasıyla -Si-OH ve -Si-O yapısına karşılık gelir (Colilla vd. , 2010). Ayrıca, MCM-48 için 2927 cm^{-1} ve 2857 cm^{-1} pikleri, CH($CH_2CH_2CH_2NH_2$) yapısının genleşmesini yansıtır (Huang vd. , 2003). Özellikle MCM-41 ve MCM-48'deki 1635 cm^{-1} bandında OH'ı ve -OH gerilmesiyle yapıda bulunan suyun, 3368cm^{-1} civarında geniş bir bant aralığı gösterir (Bhagiyalakshmi vd. ,

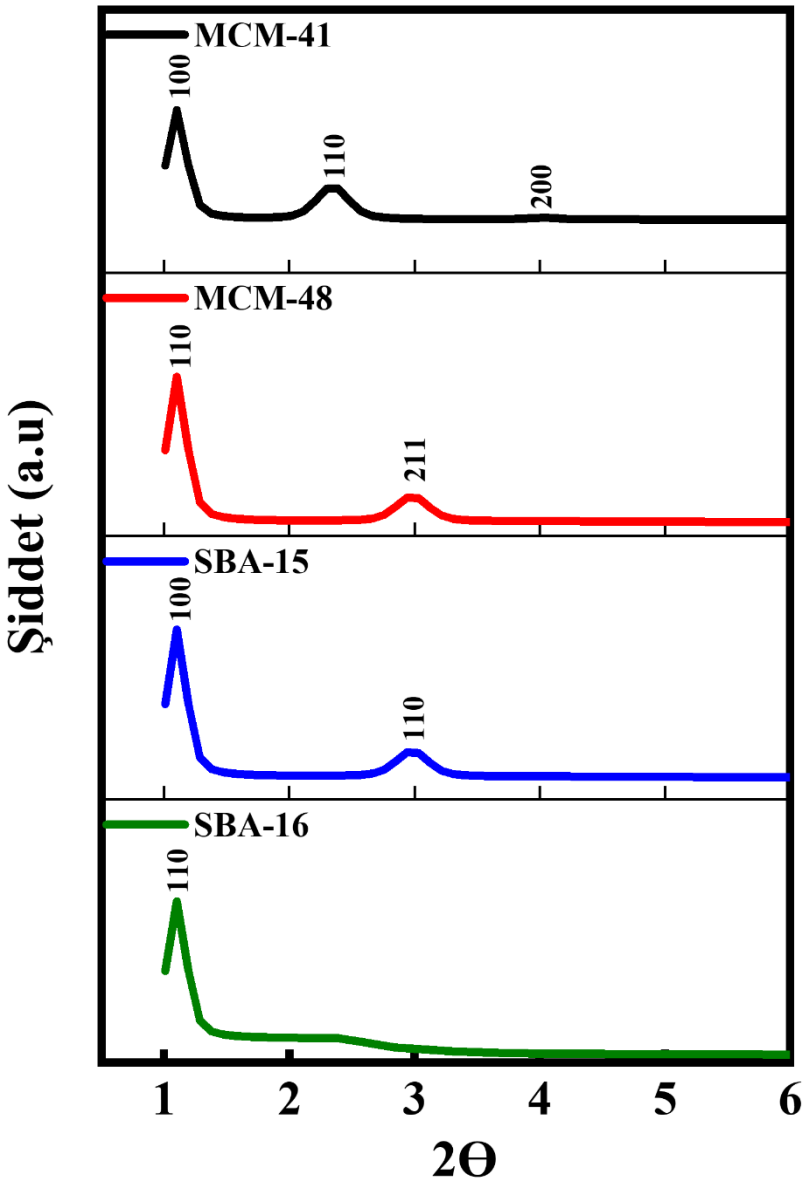
2010). SBA-15'te 3725 cm^{-1} ve MCM-48'de 3749 $cm^{-1'}$ deki pikler ise izole merkez silano (Si–OH) gruplarının O–H'ın simetrik gerilme titreşim moduna aittir (Bhagiyalakshmi vd. , 2010; Mirji vd. , 2007).

4.5.2. XRD Analizi Sonuçları

XRD analizleri, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki Panalytıcal Empyrean HT-XRD cihazıyla 2θ=0°-90° aralığında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen silika kaynaklı gözenekli malzemelere ait düşük açı XRD analiz sonuçları Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Elde edilen XRD sonuçlarına göre MCM-41'in Bragg temel piklerinde literatürle karşılaştırıldığında kaymalar gözlenmesine rağmen d (100), d (110) ve d (200) yansımalarına ait temel Bragg pikleri elde edilmiştir (Anbia ve Moradi, 2009; Veli ve Pinar, 2018). Elde edilen bu temel Bragg tepe değerleri MCM-41'in düzenli bir altıgen yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Bhagiyalakshmi vd. , 2010)

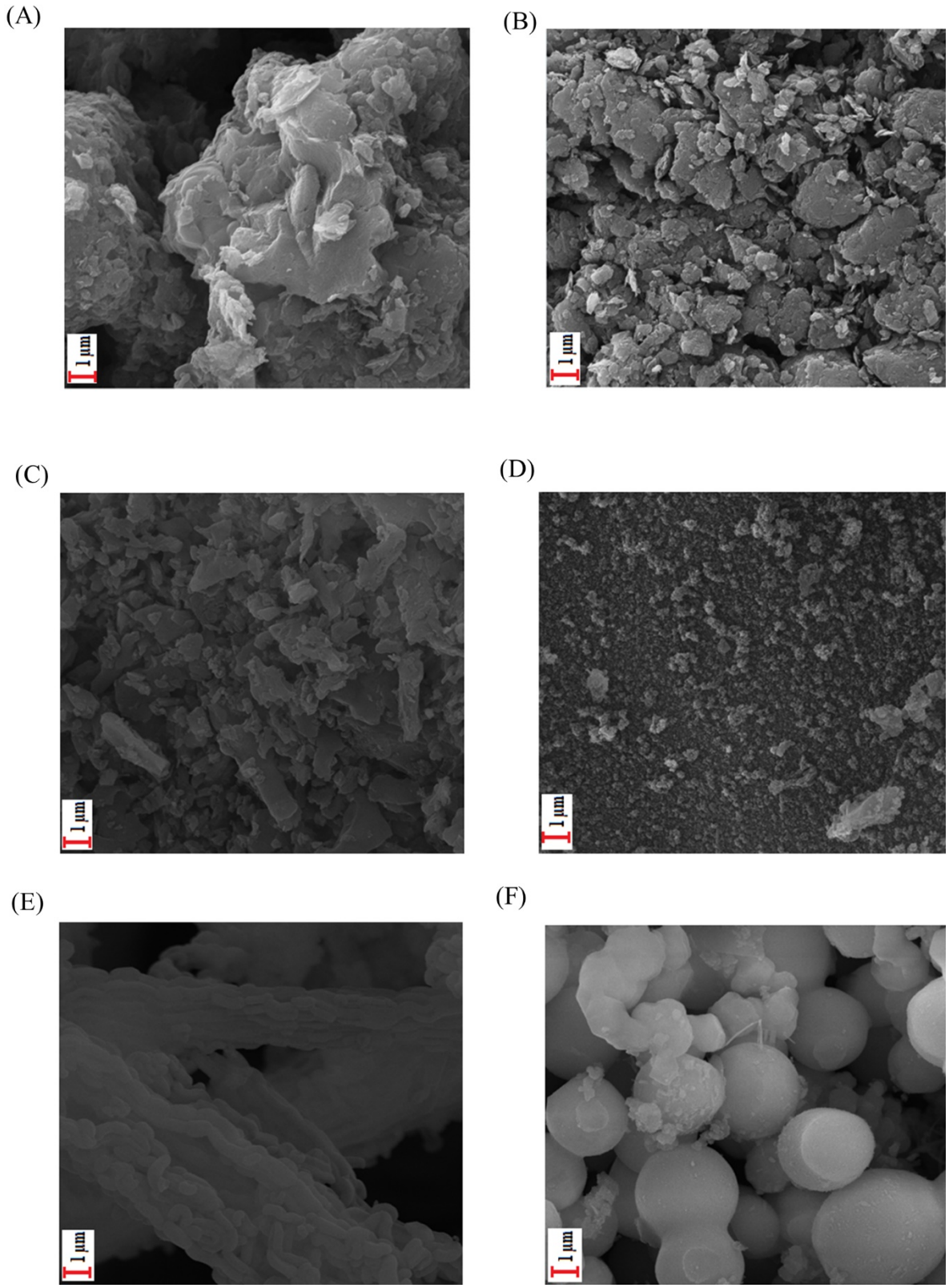
XRD analizlerinde MCM-48'e ait özellikle d (110) ve d (211) temel ana Bragg pikleri literatüre uygun olarak elde edilmiştir (Anbia ve Moradi, 2009; Li vd. , 2023; Veli ve Pinar, 2018). Düşük açılı XRD analizi, SBA-16 destek malzemesinin ana Bragg zirvesinin d (d110) 2Ɵ:0.84'de elde edildiğini göstermiştir (Cao vd. , 2016). SBA-15 için gerçekleştirilen XRD analizi, mezogözenekli yapının ana Bragg zirvelerini gösteren d (100) ve d (110) yansımalarının gözlemlendiğini göstermiştir.



Şekil 4. 8. MGM'lerin düşük açılı XRD analizi sonuçları.

4.5.3. SEM Analizi Sonuçları

Modifiye edilen elektrotlara herhangi bir elektrokimyasal analiz işlemi gerçekleştirilmeden SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.9.'da SEM analizi sonuçları verilmiştir. SEM görüntüleri literatürle uyumludur.



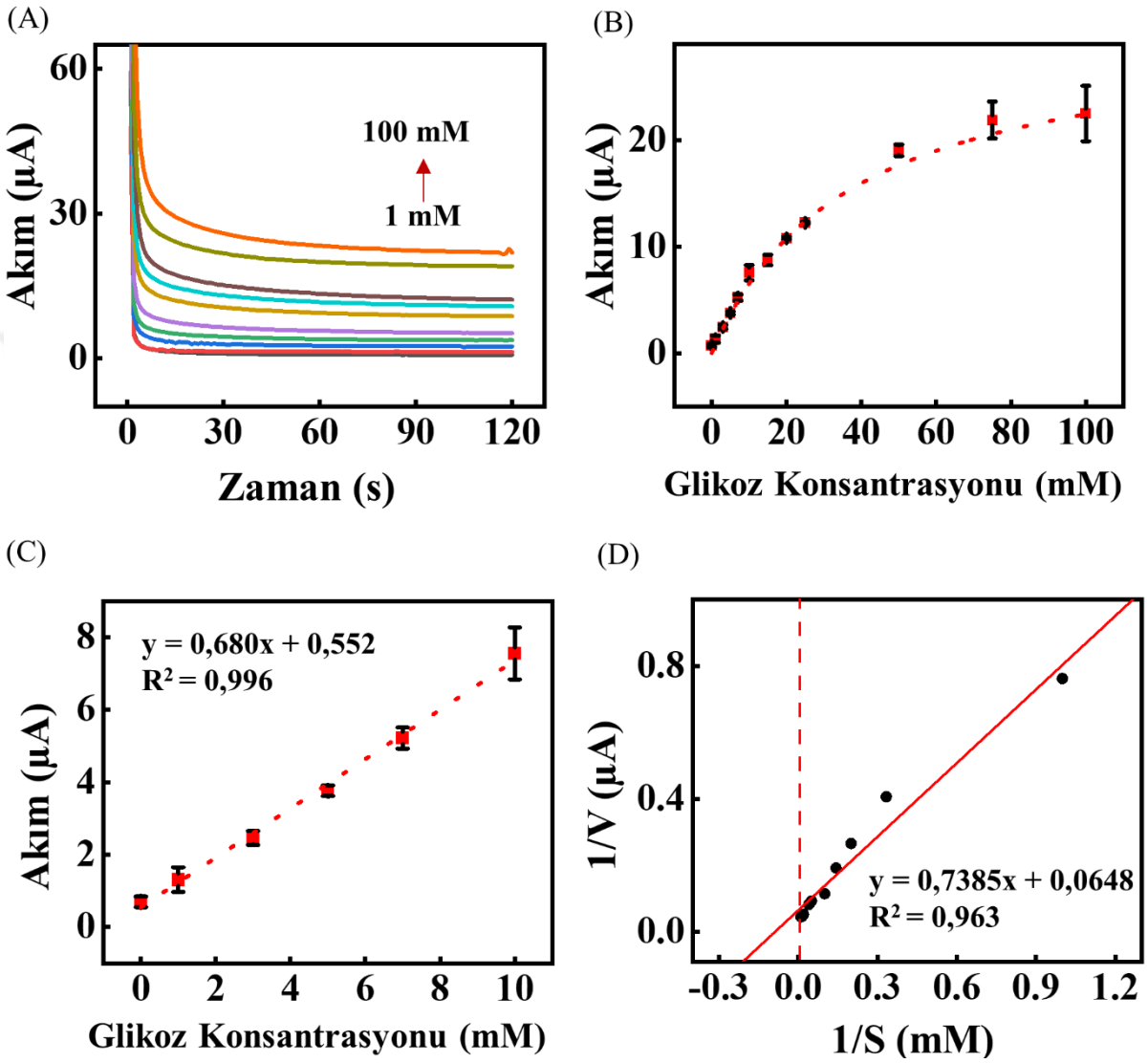
Şekil 4. 9. Elektrotların SEM analizi sonuçları (A) GO (B) GO/MCM-41 (C) MCM-41 (D) MCM-48 (E) SBA-15 (F) SBA-16.

Gerçekleştirilen SEM analiz sonuçlarına göre, MCM-48'e ait kübik yapı (Schumacher vd. , 2000; Şimşek ve Şahin, 2019). MCM-41'e ait hekzagonal yapı (Schumacher vd. , 2000), SBA-16'ya ait küresel yapı (Veli ve Pinar, 2018) (Cao vd. , 2016) ve SBA-15'e ait buğday zincir yapılar (Sayari vd. , 2004) doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçların literatürle uyumlu oldukları gözlenmiştir. GO'nun SEM görüntüsü daha önce bildirilen özelliklerle aynıdır (Dikin vd. , 2007). GO/MCM-41 karışımının SEM analizi sonucu ufalanmış GO tabakalarının MCM-41'in altıgen yapısının etrafına sarıldığını göstermektedir. Böylece MCM-41 parçacıklarının elektriksel iletkenlik sağlayacak GO ile kaplandığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar elektrokimyasal analiz sonuçlarında da doğrulanmıştır.

4.6. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit Elektrotlarının Performans Deney Sonuçları

4.6.1. Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

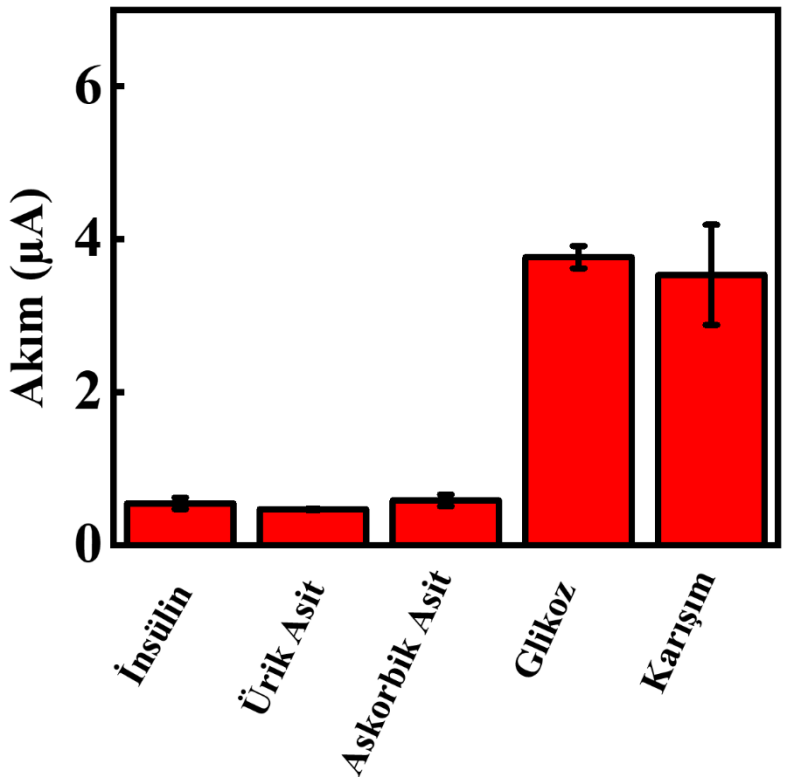
Hazırlanan elektrotlar test edilecek glikoz konsantrasyonu PBS içerisinde hazırlanarak 120 saniye 0,14 V potansiyel uygulanarak akım cevapları elde edildi.



Şekil 4. 10. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun (A) Farklı glikoz konsantrasyonlarında alınan zamana karşı akım grafiği (B) Akım değişimi ile elde edilen Michaelis-Menten grafiği (C) Kalibrasyon eğrisi (D)GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun Lineweaver ve Burk grafiği.

Şekil 4.10 (A) GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun zamana karşı akım voltomogramını vermektedir. Glikoz konsantrasyonu arttıkça akım doğrusal şekilde artmaktadır. CA analizlerinden elde edilen akım değişimi gösteren Şekil 4.10 (B)'de 10 mM

glikozdan sonra akım cevapları doğrusallıktan sapmaya başlayarak Michelis-Menten kinetiğini vermiştir. Regresyondan elde edilen V_{max} değeri 30,75 µA, K_m değeri 37,08 mM'dır. Kalibrasyon eğrisi 0-10 mM glikoz aralığı için Şekil 4.10 (C)'de verilmiştir. Tespit limiti LOD 0,516 mM hesaplanmıştır. Şekil 4.10.(D)'de Lineweaver ve Burk yöntemi ile elde edilen grafikten, V_{max} değeri 15,43 µA, K_m değeri 11,39 mM olarak hesaplanmıştır.



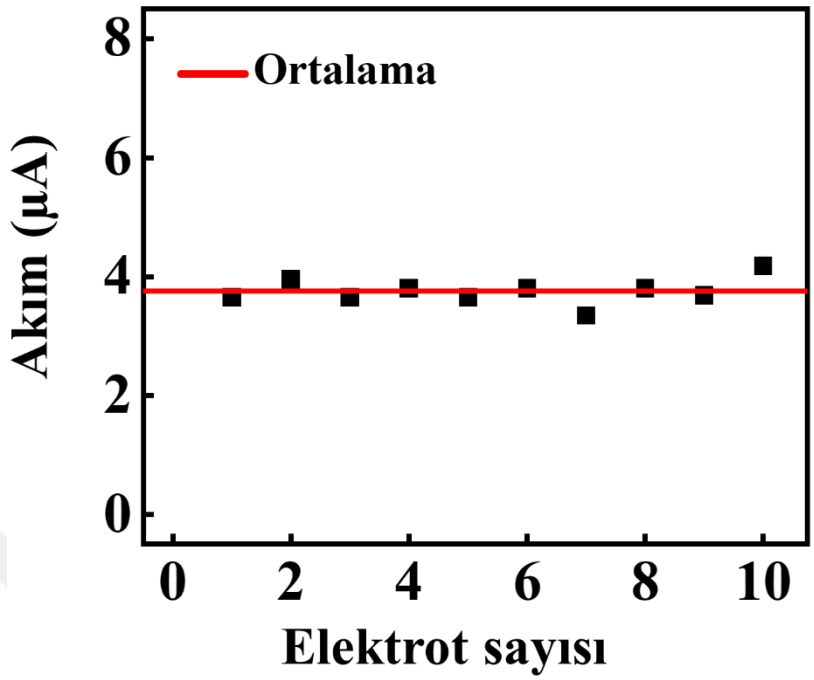
Şekil 4. 11. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotuna girişim maddelerinin etkisi.

GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotu optimize edilen şartlarda hazırlandıktan sonra girişime neden olabilecek insülin, ürik asit, askorbik asit maddelerine ve içerisinde 5 mM glikoz bulunan karışıma elektrotun verdiği akım cevapları Şekil 4.11'de verilmiştir. Karışım içerisinde test edilen 5 mM glikoz ve tek başına test edilen 5 mM glikoz akım cevapları karşılaştırıldığında alınan akım hata değeri aralığındadır. Girişim maddelerinden ayrı ayrı alınan akım cevapları ve karışım içerisinde alınan cevap incelendiğinde geliştirilen elektrotun glikoza seçici olduğu ve girişim maddelerinden etkilenmediği görülmektedir.

4.6.3. Tekrar Üretilebilirlik Analizleri

Biyosensörlerin farklı zamanlarda ve farklı yerlerde aynı sonuçları üretmesi, elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırır. Tekrar üretilebilir biyosensörler, standartlaştırılmış test

yöntemleri ve elde edilen sonuçların kolayca karşılaştırılabilirliğini sağlayarak, sonuçların tutarlılığına ve güvenilirliğine katkıda bulunur.

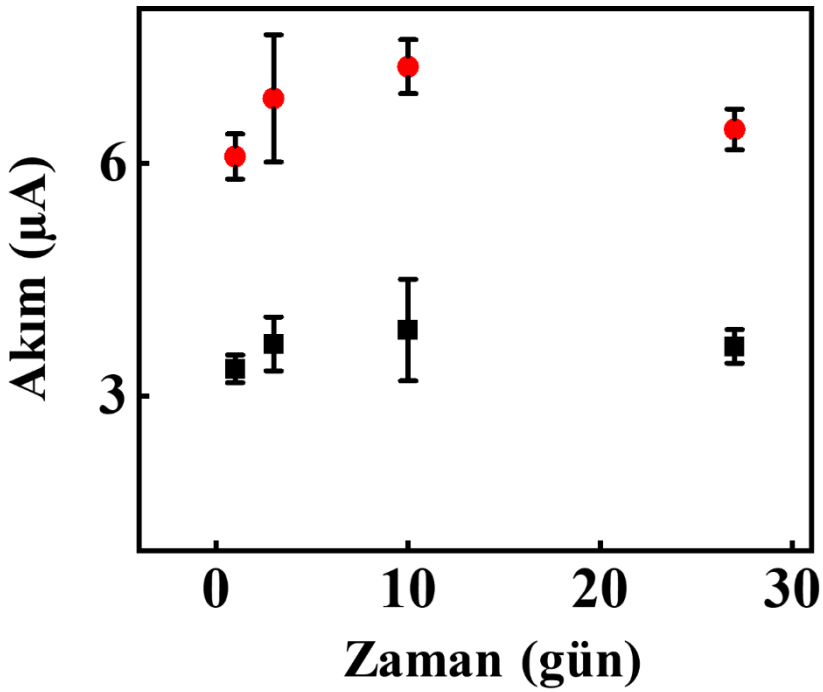


Şekil 4. 12. Farklı zamanlarda hazırlanan 10 farklı GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun akım cevabı.

Şekil 4.12'de SPE/GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun farklı zamanlarda hazırlanmış 10 farklı elektota 5 mM glikoz varlığında verdiği akım cevapları gösterilmektedir. Elde edilen akım cevaplarından hesaplanan RSD değeri %5,84'dür. Bu RSD değeri elektrotun tekrar üretilebilir olduğunu göstermektedir.

4.6.4. Raf Ömrü Analizleri

Biyosensörün raf ömrü, ne kadar uzun süre boyunca güvenilir sonuç verdiğini göstermesi açısından önemlidir. Raf ömrü boyunca biyosensörün performansının tutarlı kalması, sonuçların güvenilirliğini artırır. Şekil 4.13'te GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarının 1., 3., 10. ve 27. günlerde 5 mM ve 10 mM glikoza karşı akım cevapları verilmiştir.



Şekil 4. 13. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotlarının 1., 3., 10. ve 27. Günlerde 5 mM ve 10 mM glikoza verdikleri akım cevapları.

Farklı GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotları Bölüm 3.2.6'da anlatılan şekilde hazırlandıktan sonra enzim tutuklanması için +4 °C'de optimize edilen tutuklanma süresi olan 4 gün kuru şekilde bırakılmıştır. 4. Gün sonunda alınan akım 1. gün cevabı olarak kabul edilmiştir. Ayrı ayrı hazırlanan elektrotlar 3, 10 ve 27 gün boyunca muhafaza edilerek 5 mM ve 10 mM glikoz için verdikleri akım cevapları CA analizi ile alınmıştır ve 1. Günün akım cevaplarıyla karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırılma Tablo 4.2'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde 5 mM glikoz için 1. gün alınan cevaba karşı 3., 10. ve 27. gün alınan akım cevaplarındaki değişim %10'un altındadır. 10 mM glikozda farklılık biraz daha artmıştır. Bu da kalibrasyon eğrisi göz önünde bulundurulduğunda elektrotun 10 mM glikozdan sonra doyma eğiliminde olması ile açıklanabilir.

Tablo 4. 2. GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun günler arası performans değişimi.

Günler	RSD 5 mM	RSD 10 mM
1-3. gün	6,44	8,20
1-10. gün	9,82	12,29
1-27. gün	5,86	3,95

4.6.7. Gerçek Numune Analizleri

Gerçek numune deney sonuçları Tablo 4.3.'te verilmiştir. Deneyler gerçekleştirilirken bilinmeyen konsantrasyonda bir reçel numunesi hazırlanarak ölçüm alınmış, sonra bu numuneye 2, 4 ve 6 mM glikoz eklenerek analiz yapılmıştır. Hesaplamalarda kalibrasyon eğrisi denkleminden faydalanılarak bilinmeyen örneğin konsantrasyonu bulunmuştur. Eklenen glikoz konsantrasyonlarına karşı biyosensörün verdiği yanıt geri kazanım hesaplaması ile verilmiştir. Sensörün geri kazanım değerleri %90'ın üzerinde bulunmuştur.

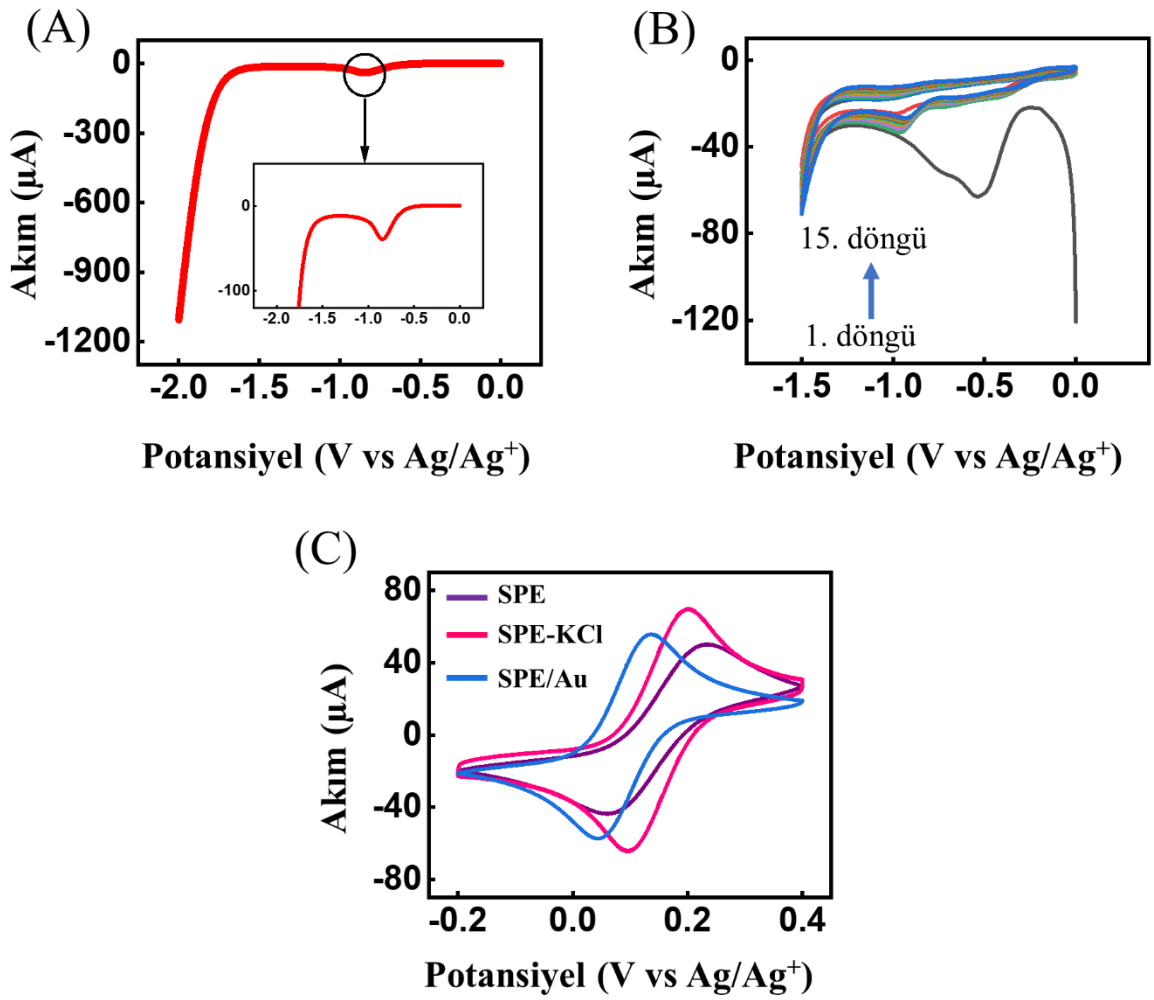
Tablo 4. 3. Vişne, diyabetik vişne ve diyabetik çilek reçeli numuneleri için kalibrasyon eğrisinden elde edilen glikoz konsantrasyonu ve geri kazanım hesaplamaları.

Vişne Reçeli	Bulunan Glikoz (mM)	Geri Kazanım (%)
Örnek	5,90	
Örnek+2	7,71	97,59
Örnek+4	9,68	97,77
Örnek+6	11,48	96,47

Diyabetik Vişne Reçeli	Bulunan Glikoz (mM)	Geri Kazanım (%)
Örnek	5,73	
Örnek+2	7,42	95,98
Örnek+4	9,28	95,37
Örnek+6	10,98	93,60

Diyabetik Çilek Reçeli	Bulunan Glikoz (mM)	Geri Kazanım (%)
Örnek	1,85	
Örnek+2	4,61	119,77
Örnek+4	6,47	110,62
Örnek+6	7,71	98,23

4.7. Elektrot Yüzeyi Stabilizasyonu ve Altın Kaplanması

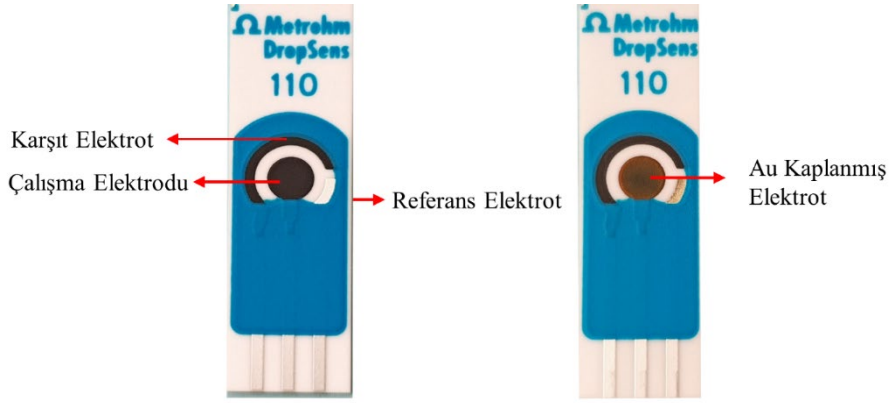


Şekil 4. 14. (A) 0,1 M KCl içerisinde gerçekleştirilen elektrokimyasal yüzey stabilizasyonu (B) SPE elektrot üzerine Au kaplanmasını gösteren CV eğrileri (0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış $HAuCl_4$) (C) 2 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$içerisinde SPE'nin KCl ile yüzey temizlenmesi gerçekleştirilmeden önceki (mor), KCl ile yüzey temizlendikten sonra (pembe) ve temizlenmiş elektrota Au kaplandıktan sonrasında (mavi) alınan CV eğrileri.

Şekil 4.14. (A)'da çalışma kapsamında tüm deneyler öncesinde gerçekleştirilen yüzey stabilizasyonuna ait LSV analizi verilmiştir. -0,8 V (vs Ag/Ag^+) potansiyelde tipik oksijen indirgenme reaksiyonu literatürle uyumlu olarak elde edildiği görülmektedir (Rowley-Neale vd. , 2017)

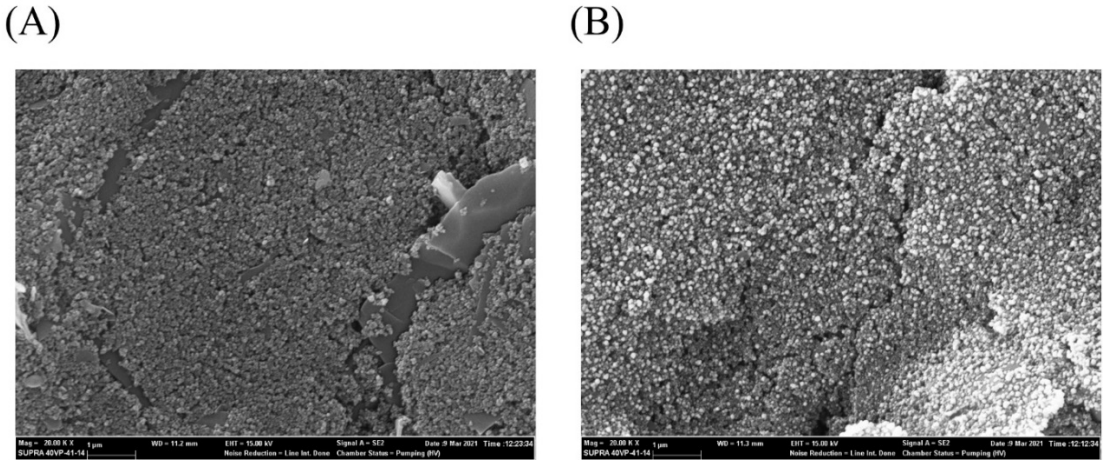
Şekil 4.14. (B)'de yüzeyi stabilize edilmiş elektrota 50 mV/s tarama hızında kaplanan $HAuCl_4$'ün CV eğrileri verilmiştir. CV incelendiğinde 2 farklı katodik indirgenme piki öne çıkmaktadır. Bunlardan bir tanesi Au^{3+}/Au^+ indirgenmesine ait ~(-0.5 V) civarında görünen pik ve diğeri ise Au^+/Au^0 indirgenmesine ait ~(-0.8) V'da başlayan piktir (De Sa vd. , 2011). Bu

pikler azalan bir eğilim göstermektedir bu da çözeltide bulunan Au^{3+} iyonlarının elektrot üzerine birikim olduğunu doğrulamaktadır. Şekil 4.15'de verilen SPE'nin altın kaplanmadan önceki ve sonraki görüntüleri de elektrot yüzeyinde altının bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 15. Altın kaplanmış elektrot yüzeyinde gözlenen değişim.

Şekil 4.14. (C)'de ise SPE'nin yüzeyi temizlenmeden önceki, temizlendikten sonraki ve $HAuCl_4$ kaplandıktan sonraki CV eğrileri verilmektedir. SPE'ler 0,1 M KCl ile temizlendikten sonra pik akımının arttığı ve yükseltgenme-indirgenme piklerinin birbirine yaklaştığı ve daha tersinir davrandığı görülmektedir. Yüzeye Au kaplanması sonrası pik voltajı daha negatif bir değere kaymış fakat tersinir davranışın değişmediği görülmüştür.



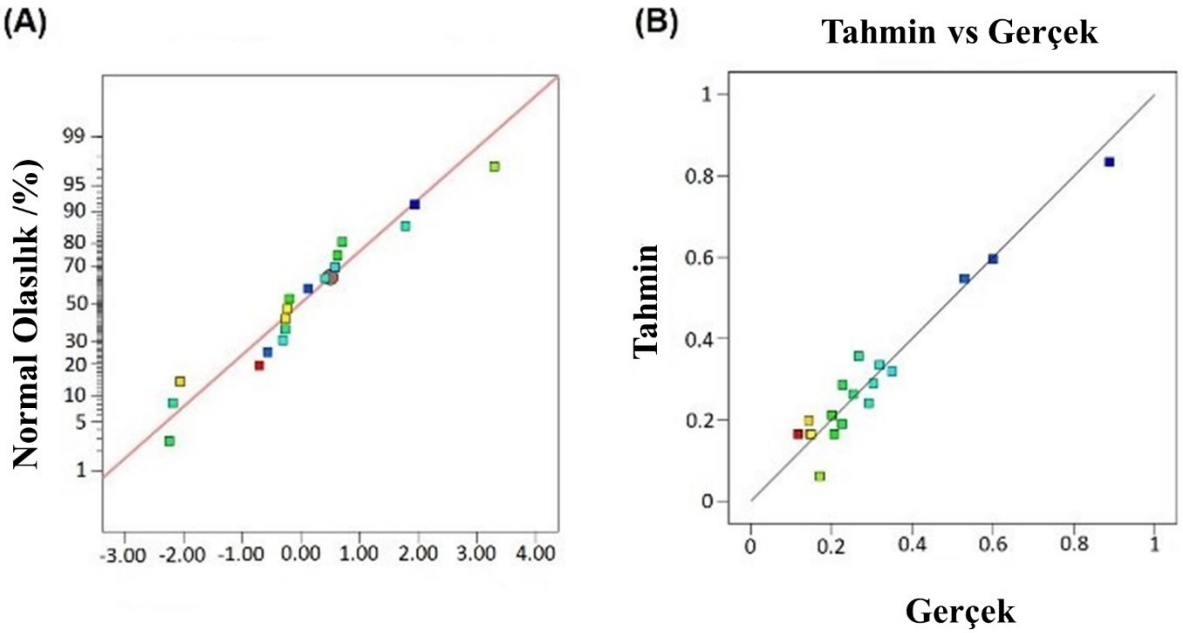
Şekil 4. 16. (A) SPE SEM analizi görüntüsü (B) SPE/Au elektrotu SEM analizi görüntüsü.

SEM görüntüleri Au depozisyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği ve elektrodepozisyon sonrası Au birikiminin nanoparçacık formasyonunda gerçekleştiği görülmektedir. SPE ve SPE/Au'ya ait SEM görüntüleri literatürle uyumludur (Amin vd. , 2014;

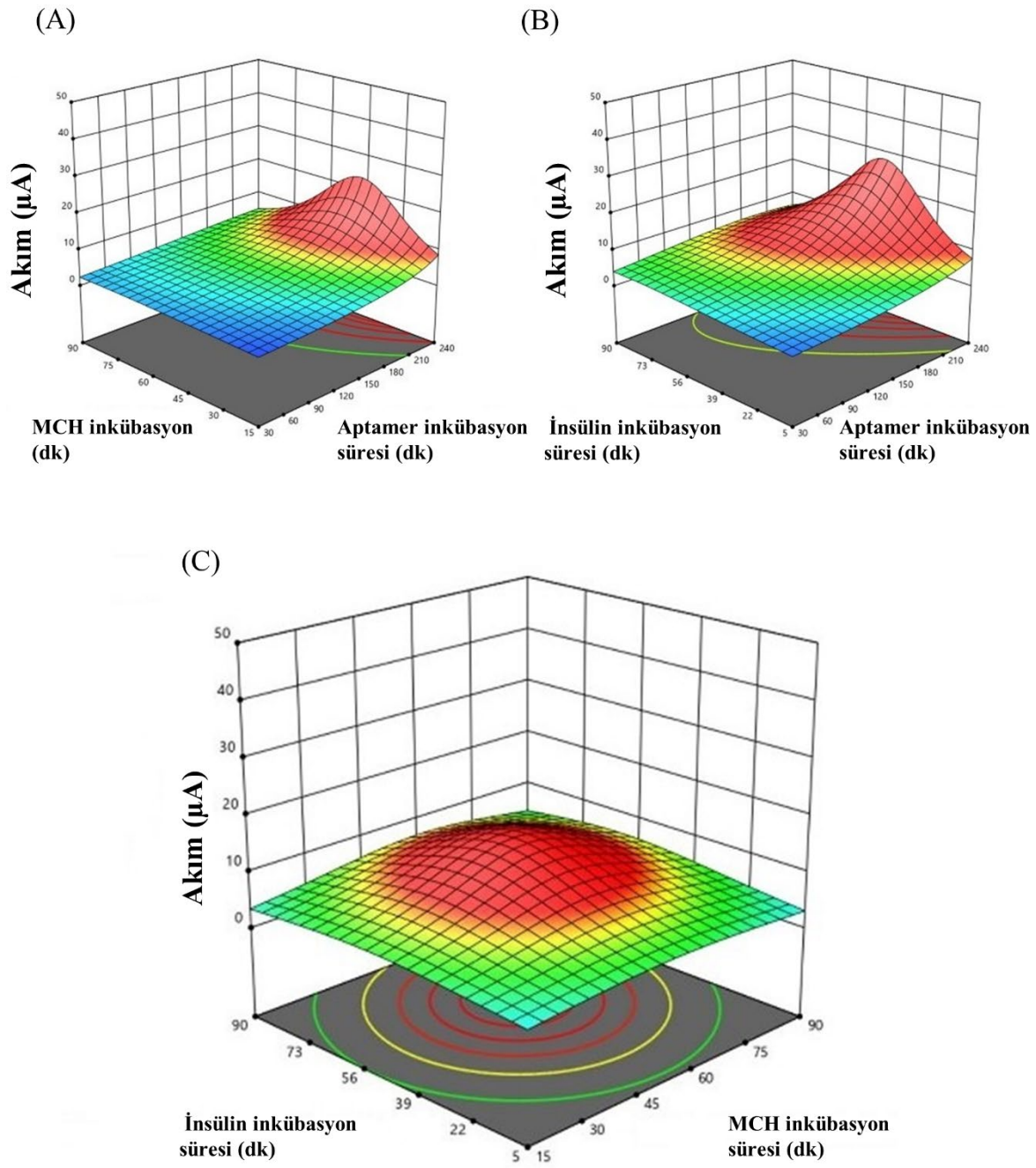
Stine, 2019). Ayrıca, EDX analizleri sonucu SPE elektrotta kütlece C oranı %70,5 ± 5,1 ve kütlece O oranı %4,2 ± 0,9 bulunmuştur. SPE/Au elektrotta ise altın parçacıkların bulunduğu bölgede Au'nun kütlece oranı %98,3 ± 6,7 ve O oranı %1,7±2,4, Au parçacıkların nispeten az olduğu bölgede Au kütlece %46,6 ± 1,0, C kütlece %52,6 ± 4,8 ve O kütlece %0,8 ± 0,4 olarak bulunmuştur.

4.7. En Uygun Aptamer, MCH ve İnsülin İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesi

Design Expert tarafından belirlenen deneyler gerçekleştirilerek programa girişi yapılmış ve deney sonuçlarının analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz iki adımdan oluşmaktadır. İlk adımda sadece aptamer ve MCH inkübasyon sürelerinin elektrot performansına etkisi incelenmiştir. Daha sonra bu ilişkiye insülin inkübasyon süresi de eklenerek toplam aptasensör performansı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Artık analiz ve tahmin edilene karşı gerçek değerler grafikleri, deneysel verilerin modelle iyi bir korelasyonunu gösteren Şekil 4.17. (A) ve (B)'de görülmektedir.



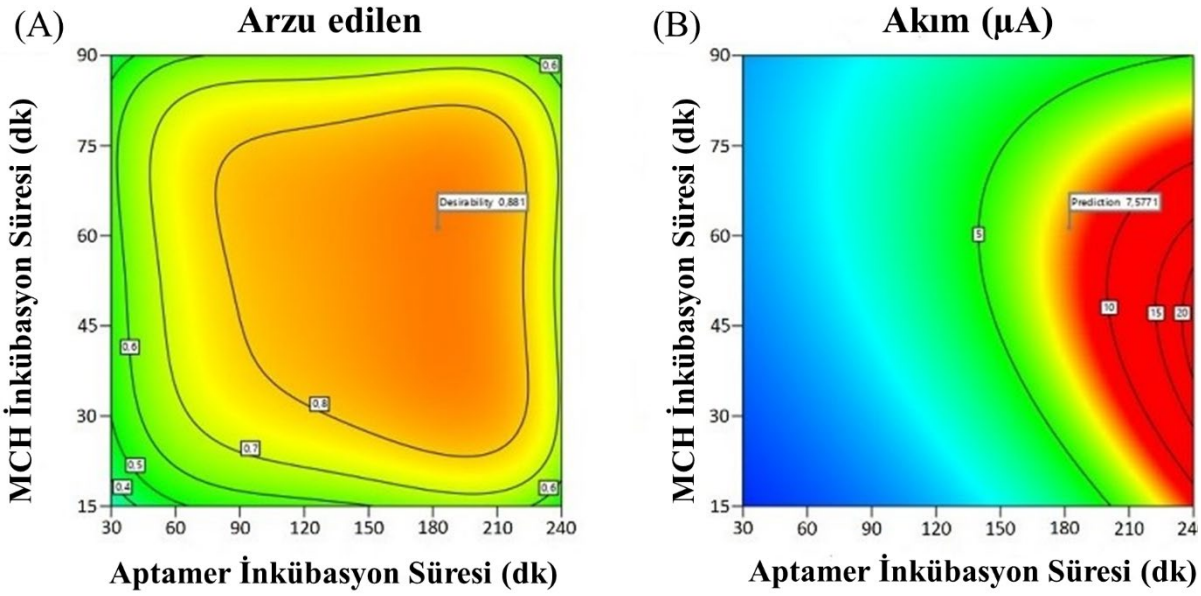
Şekil 4. 17. (A) Design Expert ile hesaplanan artık (residual) analizi (B) Tahmin edilen verilerin modele olan uygunluğu.



Şekil 4. 18. **(**A) MCH inkübasyon sürelerinin MCH inkübasyon süresi ile ilişkisi (B) RSM sonuçlarına göre İnsülin inkübasyon sürelerinin aptamer inkübasyon süresi ile ilişkisi ve (C) RSM sonuçlarına göre İnsülin inkübasyon sürelerinin MCH inkübasyon süresi ile ilişkisi.

İnsülin inkübasyonu için RSM kullanıldığında elde edilen akım değişimi optimizasyon sonuçları Şekil 4.18. (A), (B) ve (C)'de verilmiştir. İnsülin inkübasyon süresi ile MCH inkübasyon süresi ilişkisi incelendiğinde insülin için 40 dakikada ile MCH için 60 dakika civarında immobilizasyon sürelerinin maksimum sinyal değişimi için uygun olduğu

görülmektedir. Bununla birlikte, aralarındaki ilişki daha önemli olan aptamer ve insülin inkübasyon sürelerinde ise bu kez insülin inkübasyonu 40 dakika civarındayken, aptamer inkübasyonu için 180 dakika ve üzeri olması durumunun akım değişimini maksimize ettiği görülmektedir.



Şekil 4. 19. RSM tercih edilebilirlik ve model sonuçları.

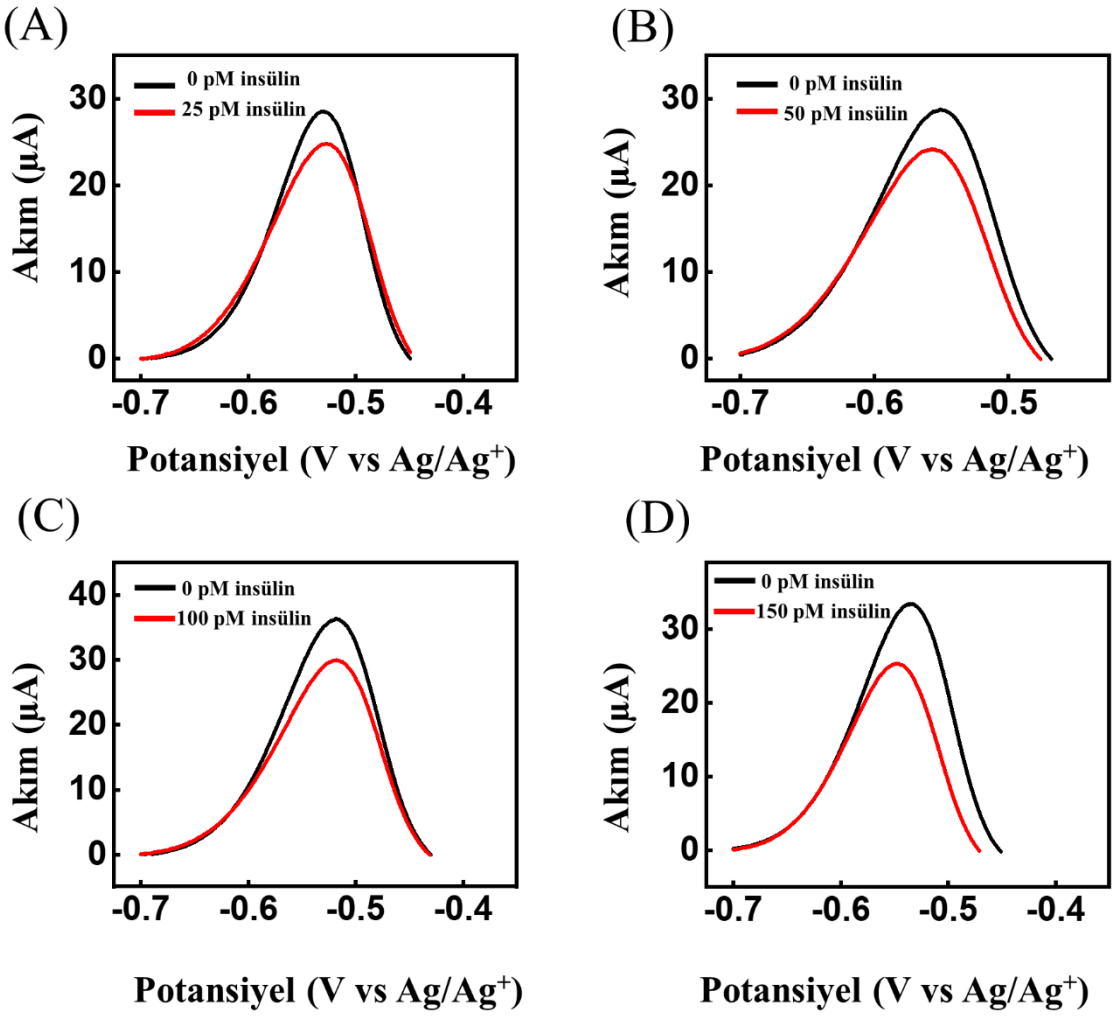
Optimum değerler belirlenirken, aptamer ve MCH inkübasyon süreleri sınır değerler arasında bırakılırken, test süresini ve modelin önerdiği sonucun hatasını minimize edilmesi amaçlanmıştır. Bunun temel sebebi, aptamer ve MCH inkübasyon süreleri sensörün üretimiyle alakalıyken, insülin inkübasyonu ölçüm zamanını doğrudan etkilemektedir. Bu sayede üretimde güvenilirliği artırılırken test süresi düşürülmüştür. Bir diğer yaklaşım tercih edilebilirlik modelinin de RSM'ye eklenmesidir. Bu durumda hem aptasensör cevabının maksimize edilmesi hem de istatistiki olarak tercih edilebilirliği maksimize eden sonucun (d=0.88) elde edilmesi sağlanmıştır. Şekil 4.19'da görüldüğü üzere tercih edilebilirlik sonuçları dahil edildiğinde RSM sonuçları aptamer ve MCH inkübasyonu için sırasıyla 180 ve 60 dakikalık sürelerin uygun olduğunu ortaya koymuştur. RSM yöntemi optimizasyon sonuçlarına göre aptamer inkübasyon süresi 180 dk, MCH inkübasyon süresi 60 dk ve insülin inkübasyon süresi 25 dk olarak belirlenmiştir.

SPE/Au/Apta ve insülin inkübe edilen SPE/Au/Apta aptasensör model sonuçları karşılaştırıldığında, aptamer ve MCH için inkübasyon süresi aynı çıkarken modellerin istatistiki değerlendirmeleri bir miktar farklı çıkmıştır. Bu durum insülin inkübasyonunun ardından

aptasensör cevabını etki eden bazı düzensizliklerin sonucu olarak yorumlanabilir. Çalışmanın, aptasensöre ait analitik parametrelerin incelendiği basamaklarında bu durum göze çarpmakta ve tekrarlanabilirliğin bir miktar azalması ile kendini göstermektedir.

4.8. SPE/Au/Apt/Ins Elektrotlarının Performans Analizleri

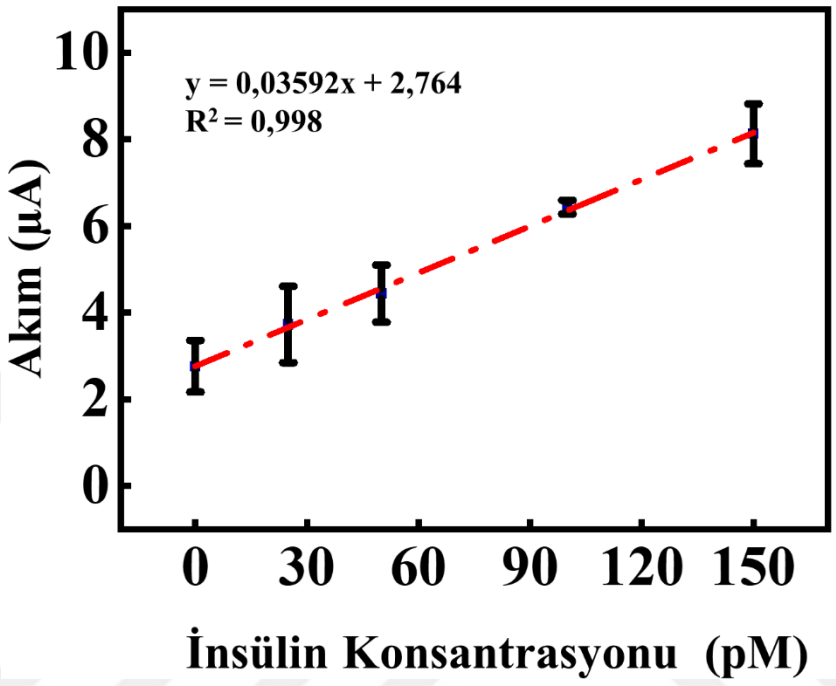
4.8.1. Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi



Şekil 4. 20. Hazırlanan SPE/Au/Apt ve SPE/Au/Apt/Ins elektrotların (A) 25 pM, (B) 50 pM, (C) 100 pM ve (D) 150 pM insülin konsantrasyonu için insülin olmayan duruma göre değişimini gösteren SWV voltamogramları 0,1 M PBS içinde.

Şekil 4.20.'de farklı insülin miktarları için gerçekleştirilen SWV deneylerinden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Görüldüğü üzere (-0.50) – (-0.55) aralığında MB yükseltgenmesine ait bir pik elde edilmiştir ve bu noktada elde edilen pik akım değeri farklı miktarlarda insülin eklendiğinde bu miktarlarla orantılı olarak azalmıştır. Bu da ilk durumda MB probunun aptamerin pozisyonuna bağlı olarak Au yüzeyine daha yakın olduğunu, insülin

bağlanması sonrasında ise bu elektron transfer mesafesinin arttığını göstermektedir. Bu durumda hazırlanan aptasensörün on-off (açık-kapalı) mantığıyla çalıştığı görülmektedir. Ortamda insülin yokken MB probun elektrot yüzeyine daha yakın konumlandığı ve elektrotla arasındaki mesafenin aptamer-insülin etkileşiminden sonra elektrokimyasal sinyal şeklinde algılanamayacak mesafeye uzaklaştığı düşünülmektedir.

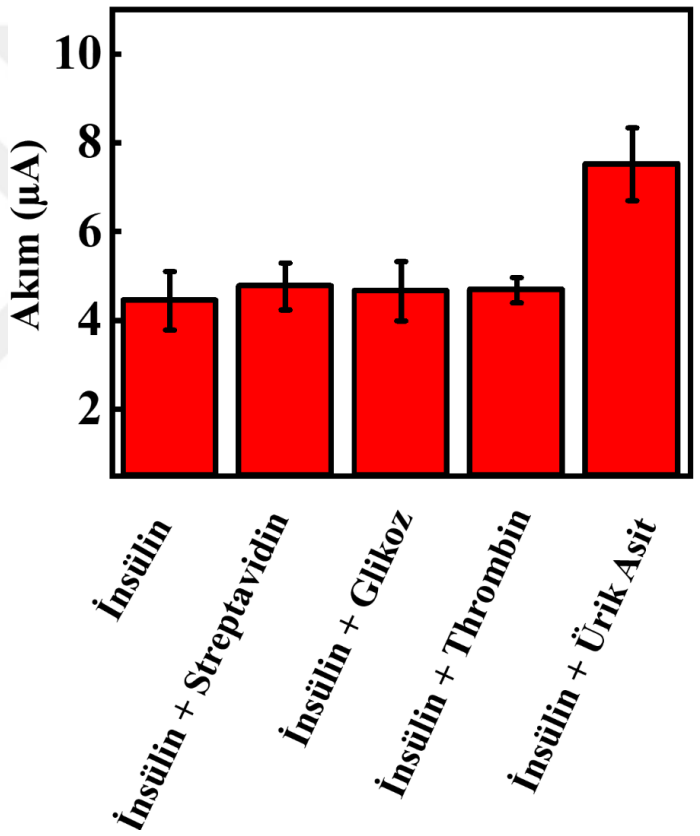


Şekil 4. 21. SPE/Au/Apt/Ins elektrotu kalibrasyon eğrisi.

MB proba ait insülin olan ve olmayan durumda oluşan pik akım değerleri arasındaki fark alınarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi elde edilirken deneyler en az 3 numune (N=3) olacak şekilde tekrar edilmiş, ortalamaları alınarak standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Şekil 4.21'de elde edilen kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir. Aptasensör kalibrasyonu sonrası LOD tekrar edilen veriler arasından en büyük σ değeri baz alınarak %95 güven aralığında 3σ olacak şekilde hesaplanmış ve 18, 45 pM olarak bulunmuştur.

4.8.2. Girişim Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4.22'de 50 pM insülin varlığında test edilen çeşitli maddelerle (streptavidin, glikoz, trombin, ürik asit) gerçekleştirilen girişim deneylerinin sonuçları sunulmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, kan içerisindeki miktarlarıyla orantılı olarak kullanılan veya insülinle etkileşim potansiyeli olan maddelerin aptasensör cevabını anlamlı şekilde etkilemediği belirlenmiştir. Denemeler neticesinde yalnızca ürik asidin, diğer maddelere kıyasla daha yüksek bir etkileşim gösterdiği gözlemlenmiştir. Mevcut literatürde ürik asidin, kanda bulunan askorbik asit ve C-proteini gibi önemli bileşenlerle ciddi etkileşimlere girebileceği belirtilmiştir (Luong vd. , 2021). Bu çalışmada da literatüre uyumlu olarak ürik asidin, aptasensör cevabını etkileyebilecek bir madde olarak rol oynayabileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 22. Aptasensör performansına girişim maddelerinin etkisi (insülin: 50 pM, streptavidin: 50 pM, glikoz: 1,5 mM, Trombin: 0,5 µM ve ürik asit: 0,15 mM).

4.8.3. Raf Ömrü Analizleri

Geliştirilen aptasensörde yapılan raf ömrü deneyleri sonucunda 10 gün sonunda aptasensörün 50 pM insülin için elde edilen cevabında %8 (4,1 ± 1,1 µA – N=3) değişim olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında ilk aşamada silika kaynaklı mezogözenekli destek malzemelerin, enzim tutuklanması için uygunluğu ve elektrokimyasal biyoelektronik sistemlerdeki performansı incelenmiştir. MCM-41, MCM-48, SBA-15 ve SBA-16 mezogözenekli silika malzemelerine GO ile iletkenlik kazandırılmıştır. GO ile MGM'ler kullanılarak kütlece farklı oranlarda saf su içerisinde (1:1, 1:1.5 ve 1:2; süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlarla SPE üzerine kaplama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş GO/MGM elektrotlarına GOx enzimi tutuklanarak glikoza karşı verdiği yanıtlar incelenmiştir. GO'ya kıyasla optimum sonucu veren elektrot GO/MCM-41 seçilerek enzimatik biyosensör uygulamalarında kullanılabilirliği incelenmiştir. Mediyatör GO/MCM-41 malzemesi kaplandıktan sonra kuruyan yüzeye kaplanmıştır. Burada GO/MCM-41 malzemesinin ultra saf su içerisinde hazırlanması sebebiyle Fc çözelti içerisine dahil edilerek kullanılmamıştır. Hazırlanan elektrot yüzeyine enzim kaplandıktan sonra kitosan ile polimer film oluşturulmuştur. Elde edilen GO/MCM-41/Fc/GOx/Chit elektrotunun LOD değeri 0,516 mM olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan LOD değeri geliştirilen biyosensörün oldukça hassas tespit yapabileceğini göstermektedir. Tekrar üretilebilirliği 5 mM glikoz konsantrasyonuna on farklı zamanda vermiş olduğu yanıtın bağıl standart hatası %5,84 olarak bulunmuştur. Geliştirilen elektrotun 3. gün verdiği yanıtın 1. güne karşı standart bağıl hatası %6,44, 7. gün için %9,82 ve 27. gün için %5,86 olarak bulunmuştur. Biyosensörün seçiciliği ise potansiyel girişim yapabilecek ürik asit, askorbik asit ve insülin gibi maddelerin cevaba etkisi ile değerlendirilmiştir. Bu maddelerin cevaba anlamlı bir etki etmediği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada diyabet hastaları için büyük öneme sahip insülinin kanda bulunan miktarlarını test edebilecek elektrokimyasal bir aptsensör geliştirilmiştir. İnsülin için literatürde rapor edilmiş olan aptamer kullanılarak karbon ve Au yüzeye tutuklanabilecek ve on-off ölçüm sağlayabilecek problarla modifiye edilmiş aptamerler belirlenmiştir. Bu belirlenen aptamerler öncelikle karbon yüzeye tutuklanarak aptasensör hazırlanılmaya çalışılmış fakat çapraz bağlanma reaksiyonunda aptamerler üzerinde fazla sayıda bulunan serbest amino gruplarının modifikasyonu olumsuz etkilemesi sonucu bu yöntemden verimli bir sonuç elde edilememiştir. Bu sebeple elektrot yüzeyi Au ile kaplanmış ve tiyol modifiye edilmiş aptamerler Au yüzeyine tutuklanarak aptasensör başarıyla geliştirilmiştir. Aptasensörün geliştirilme aşamasında önemli rol oynayan aptamer, MCH ve insülin inkübasyon süreleri Design Expert 12 programı kullanılarak optimize edilmiş ve minimum hata ve test süresini verecek modifikasyon süreleri sırasıyla 180 dk, 60 dk ve 25 dk olarak seçilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan

aptasensör için farklı insülin konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. T-testi sonucunda elde edilen verilere göre kalibrasyon eğrisinin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Geliştirilen aptasensörün lineer çalışma aralığı 25 – 150 pM ve LOD değeri 18,45 pM %95 güven aralığında 3σ olacak şeklinde hesaplanarak olarak bulunmuştur. Bu aralık ve LOD değerleri literatürde verilen insülinin kandaki miktarını (yaklaşık 150 pM) tayin edebilmek için yeterli olmaktadır (Yagati vd. , 2016). Ayrıca, geliştirilen aptasensörün en düşük RSD sapma değeri ve yüzde hassasiyeti %9,5 ve %6,4 olarak bulunmuştur. Aptasensörün analitik performans parametreleri proje önerisinde belirtilen hedef değerleri karşılamaktadır. Son olarak geliştirilen aptasensör için girişim ve raf ömrü deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre aptasensör için belirlenen girişimlerden anlamlı veya önlenmesi zor bir etki görülmemiştir. Raf ömrü deneyleri sonucunda ise 10 gün sonunda aptasensör cevabında %8 değişim olduğu görülmüştür. Girişim ve raf ömrü deneylerinden elde edilen verilere göre de proje önerisinde belirlenen hedefler karşılanmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında hassas insülin tayini için elektrokimyasal sinyal aç-kapa aptasensör geliştirilmesi ve mezogözenekli silika malzemelere iletkenlik kazandırılarak biyoelektronik uygulamalarda kullanılabilirliği değerlendirilerek hassas bir enzimatik biyosensör geliştirilmesi başarıyla tamamlanmış ve ileriye yönelik umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen aptasensörün gerçek uygulamalarda ne kadar etkili olduğunu göstermek için çalışma yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, gelecek çalışmalarda klinik örneklerde insülin tespiti için kullanılabilirliğini test etmeyi, gıda analizinde kullanılabilirliğini değerlendirmeyi ve uzun süreli raf ömrü çalışmaları yapılabilir. Çalışma kapsamında geliştirilen sensörlerin hassasiyetini, seçiciliğini, kararlılığını ve tekrar üretilebilirliğini geliştirmek, modifikasyon süresini ve maliyetini azaltmak için farklı problar, mediyatörler, polimer filmler ve nanomalzemeler kullanarak farklı modifikasyon yöntemleri optimize edilebilir.

KAYNAKÇA

Amin, S., Soomro, M. T., Memon, N., Solangi, A. R., Qureshi, T. ve Behzad, A. R. (2014). Disposable screen printed graphite electrode for the direct electrochemical determination of ibuprofen in surface water. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 1*, 8-13.

Anbia, M. ve Moradi, S. E. (2009). Removal of naphthalene from petrochemical wastewater streams using carbon nanoporous adsorbent. *Applied Surface Science, 255*(9), 5041-5047.

Andersen, L., Dinesen, B., Jørgensen, P., Poulsen, F. ve Røder, M. (1993). Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma. *Clinical Chemistry, 39*(4), 578-582.

Asha, K., Suryanarayana, N., Venkatesha, M. ve Narayan, K. (2020). *Modelling and Analysis of Nanosphere Biosensor.* Paper presented at the 2020 IEEE International Conference on Electronics, Computing and Communication Technologies (CONECCT).

Babiker, A. ve Al Dubayee, M. (2017). Anti-diabetic medications: How to make a choice? *Sudanese journal of paediatrics, 17*(2), 11.

Baino, F., Fiorilli, S. ve Vitale-Brovarone, C. (2017). Composite biomaterials based on sol-gel mesoporous silicate glasses: A review. *Bioengineering, 4*(1), 15.

Berna, G., Leon-Quinto, T., Ensenat-Waser, R., Montanya, E., Martin, F. ve Soria, B. (2001). Stem cells and diabetes. *Biomedicine & pharmacotherapy, 55*(4), 206-212.

Bhagiyalakshmi, M., Yun, L. J., Anuradha, R. ve Jang, H. T. (2010). Synthesis of chloropropylamine grafted mesoporous MCM-41, MCM-48 and SBA-15 from rice husk ash: their application to CO 2 chemisorption. *Journal of Porous Materials, 17*, 475-484.

Bisswanger, H. (2017). *Enzyme kinetics: principles and methods*: John Wiley & Sons.

Cao, Z., Du, P., Duan, A., Guo, R., Zhao, Z., lei Zhang, H., . . . Chen, Z. (2016). Synthesis of mesoporous materials SBA-16 with different morphologies and their application in dibenzothiophene hydrodesulfurization. *Chemical Engineering Science, 155*, 141-152.

Catanante, G., Mishra, R. K., Hayat, A. ve Marty, J.-L. (2016). Sensitive analytical performance of folding based biosensor using methylene blue tagged aptamers. *Talanta, 153*, 138-144.

Chanarsa, S., Jakmunee, J. ve Ounnunkad, K. (2022). A sandwich-like configuration with a signal amplification strategy using a methylene blue/aptamer complex on a heterojunction 2D MoSe2/2D WSe2 electrode: Toward a portable and sensitive

electrochemical alpha-fetoprotein immunoassay. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12*, 916357.

Chatterjee, S., Khunti, K. ve Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The lancet, 389*(10085), 2239-2251.

Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., . . . Kuriakose, K. (2017). Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology, 8*, 6.

Chen, L.-F., Guo, P.-J., Zhu, L.-J., Qiao, M.-H., Shen, W., Xu, H.-L. ve Fan, K.-N. (2009). Preparation of Cu/SBA-15 catalysts by different methods for the hydrogenolysis of dimethyl maleate to 1, 4-butanediol. *Applied Catalysis A: General, 356*(2), 129-136.

Chen, X.-F., Zhao, X. ve Yang, Z. (2022). Aptasensors for the detection of infectious pathogens: Design strategies and point-of-care testing. *Microchimica Acta, 189*(12), 443.

Cho, E. J., Lee, J.-W. ve Ellington, A. D. (2009). Applications of aptamers as sensors. *Annual review of analytical chemistry, 2*, 241-264.

Ciesla, U. ve Schüth, F. (1999). Ordered mesoporous materials. *Microporous and mesoporous materials, 27*(2-3), 131-149.

Cleland, W. (1967). Enzyme kinetics. *Annual review of biochemistry, 36*(1), 77-112.

Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., Sánchez-Salcedo, S., Fierro, J. L., Hueso, J. L. ve Vallet-Regi, M. (2010). Synthesis and characterization of zwitterionic SBA-15 nanostructured materials. *Chemistry of Materials, 22*(23), 6459-6466.

Cook, P. F. ve Cleland, W. W. (2007). *Enzyme kinetics and mechanism*: Garland Science.

Cooke, D. W. ve Plotnick, L. (2008). Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. *Pediatrics in review, 29*(11), 374-385.

Cornish-Bowden, A. (2013a). *Fundamentals of enzyme kinetics*: John Wiley & Sons.

Cornish-Bowden, A. (2013b). The origins of enzyme kinetics. *FEBS letters, 587*(17), 2725-2730.

Cornish-Bowden, A. (2014). *Principles of enzyme kinetics*: Elsevier.

Cornish-Bowden, A. (2015). One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspectives in Science, 4*, 3-9.

Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry, 67*(10), 1699-1723.

Daniel, R. M. ve Danson, M. J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS letters, 587*(17), 2738-2743.

Datta, S., Christena, L. R. ve Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech, 3*, 1-9.

De Sa, A., Eugénio, S., Quaresma, S., Rangel, C. ve Vilar, R. (2011). Electrodeposition of gold thin films from 1-butyl-1-methylpyrrolidinium dicyanamide Au3+ solutions. *Thin Solid Films, 519*(19), 6278-6283.

Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M. ve Schootman, M. (2008). Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Physical therapy, 88*(11), 1254-1264.

Dikin, D. A., Stankovich, S., Zimney, E. J., Piner, R. D., Dommett, G. H., Evmenenko, G., . . . Ruoff, R. S. (2007). Preparation and characterization of graphene oxide paper. *nature, 448*(7152), 457-460.

Eliasson, B. (2003). Cigarette smoking and diabetes. *Progress in cardiovascular diseases, 45*(5), 405-413.

Ellington, A. D. ve Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature, 346*(6287), 818-822.

Frankum, S. ve Ogden, J. (2005). Estimation of blood glucose levels by people with diabetes: a cross-sectional study. *British Journal of General Practice, 55*(521), 944-948.

Gibson, T. D. (1999). Biosensors: The stabilité problem. *Analusis, 27*(7), 630-638.

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. ve Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors, 8*(3), 1400-1458.

Gu, R., Duan, Y., Li, Y. ve Luo, Z. (2023). Fiber-Optic-Based Biosensor as an Innovative Technology for Point-of-Care Testing Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria To Defend Food and Agricultural Product Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71*(29), 10982-10988. doi:10.1021/acs.jafc.3c02067

Haire-Joshu, D., Glasgow, R. E. ve Tibbs, T. L. (1999). Smoking and diabetes. *Diabetes care, 22*(11), 1887-1898.

Hamad, F. R. B., Rahat, N., Shankar, K. ve Tsouklidis, N. (2021). Efficacy of stem cell application in diabetes mellitus: promising future therapy for diabetes and its complications. *Cureus, 13*(2).

Hamilton, B. K., Gardner, C. R. ve Colton, C. K. (1974). Effect of diffusional limitations on lineweaver-burk plots for immobilized enzymes. *AIChE Journal, 20*(3), 503-510.

Hasanzadeh, M., Shadjou, N., Eskandani, M. ve de la Guardia, M. (2012). Mesoporous silica-based materials for use in electrochemical enzyme nanobiosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 40*, 106-118.

Haxha, S., Pedersen-Bjergaard, U., Philbert, B., Lindhardt, T., Hoejberg, S., Schjerning, A., . . . Bang, C. (2020). Diabetes mellitus is associated with higher risk of third degree atrioventricular block–a Danish nationwide registry study. *European Heart Journal, 41*(Supplement_2), ehaa946. 0360.

Hermann, T. ve Patel, D. J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *science, 287*(5454), 820-825.

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. ve Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology, 6*, 185-205.

Huang, H. Y., Yang, R. T., Chinn, D. ve Munson, C. L. (2003). Amine-grafted MCM-48 and silica xerogel as superior sorbents for acidic gas removal from natural gas. *Industrial & Engineering Chemistry Research, 42*(12), 2427-2433.

Inagaki, S., Guan, S., Fukushima, Y., Ohsuna, T. ve Terasaki, O. (1999). Novel mesoporous materials with a uniform distribution of organic groups and inorganic oxide in their frameworks. *Journal of the American Chemical Society, 121*(41), 9611-9614.

Isaksson, A., Hultberg, B., Masson, P., Landels, E. ve Fensom, A. (1993). Enzyme immunoassay of beta-hexosaminidase A and B in serum: carrier detection of GM2-gangliosidoses, and equivalence of enzyme activity and enzyme protein reactivity. *Clinical chemistry, 39*(7), 1412-1415.

Jain, U., Chauhan, N. ve Saxena, K. (2023a). Chapter 3 - Fundamentals of sensors and biosensors: An overview. In L. Singh ve D. Mahapatra ve S. Kumar (Eds.), *Multifaceted Bio-Sensing Technology* (Vol. 4, pp. 31-44): Academic Press.

Jain, U., Chauhan, N. ve Saxena, K. (2023b). Fundamentals of sensors and biosensors: An overview. *Multifaceted Bio-Sensing Technology*. 31-44.

Jamal, A., Tharkar, S., Babaier, W. S., Alsomali, S. F., Alsulayhim, A. S., Alayuni, M. A., . . . Batais, M. (2021). Blood glucose monitoring and sharing amongst people with diabetes and their facilitators: cross-sectional study of methods and practices. *JMIR diabetes, 6*(4), e29178.

Karthik, V., Selvakumar, P., Senthil Kumar, P., Vo, D.-V. N., Gokulakrishnan, M., Keerthana, P., . . . Rajeswari, R. (2021). Graphene-based materials for environmental applications: a review. *Environmental Chemistry Letters, 19*(5), 3631-3644.

Karyakin, A. A., Gitelmacher, O. V. ve Karyakina, E. E. (1995). Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose. *Analytical Chemistry, 67*(14), 2419-2423. doi:10.1021/ac00110a016

Karyakin, A. A., Kotel'nikova, E. A., Lukachova, L. V., Karyakina, E. E. ve Wang, J. (2002). Optimal Environment for Glucose Oxidase in Perfluorosulfonated Ionomer Membranes: Improvement of First-Generation Biosensors. *Analytical Chemistry, 74*(7), 1597-1603. doi:10.1021/ac0155409

Kaur, H. ve Shorie, M. (2019). Nanomaterial based aptasensors for clinical and environmental diagnostic applications. *Nanoscale Advances, 1*(6), 2123-2138.

Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre, 45*(1), 1-13.

Kharroubi, A. T. ve Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes, 6*(6), 850.

Kresge, a. C., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. ve Beck, J. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *nature, 359*(6397), 710-712.

Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H. ve Aminabhavi, T. M. (2023). A Short Review on Miniaturized Biosensors for the Detection of Nucleic Acid Biomarkers. *Biosensors, 13*(3), 412. Retrieved from https://www.mdpi.com/2079-6374/13/3/412

Küçükayar, Ş. F., Şimşek, V., Caglayan, M. O., Üstündağ, Z. ve Şahin, S. (2023). The effect of different immobilization strategies on the electrochemical performance of enzymatic carbonaceous electrodes developed using carbonized biomass sources. *Microchemical Journal, 193*, 109023.

Larsson, S. C., Scott, R. A., Traylor, M., Langenberg, C. C., Hindy, G., Melander, O., . . . Markus, H. S. (2017). Type 2 diabetes, glucose, insulin, BMI, and ischemic stroke subtypes: Mendelian randomization study. *Neurology, 89*(5), 454-460.

Lee, C. H., Jin, E. S., Lee, J. H. ve Hwang, E. T. (2020). Immobilization and stabilization of enzyme in biomineralized calcium carbonate microspheres. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8*, 553591.

Li, H., Cao, M., Cao, L., Zhao, R., Song, Z., Meng, W., . . . Chen, L. (2023). Design, fabrication, and characterization of a polymer-based waveguide Bragg grating for blood glucose monitoring. *Applied Physics Letters, 123*(3).

Lineweaver, H. ve Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society, 56*(3), 658-666.

Liu, J., Bao, S. ve Wang, X. (2022). Applications of graphene-based materials in sensors: A review. *Micromachines, 13*(2), 184.

Lockwood, D., Frey, M. L., Gladish, N. A. ve Hiss, R. G. (1986). The biggest problem in diabetes. *The Diabetes Educator, 12*(1), 30-33.

Luong, A.-D., Roy, I., Malhotra, B. D. ve Luong, J. H. (2021). Analytical and biosensing platforms for insulin: a review. *Sensors and Actuators Reports, 3*, 100028.

Määttä, K. R., Kamal-Eldin, A. ve Törrönen, A. R. (2003). High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(23), 6736-6744.

Madsen, O. D. (2005). Stem cells and diabetes treatment. *Apmis, 113*(11-12), 858-875.

Martin, R. S., Gawron, A. J., Lunte, S. M. ve Henry, C. S. (2000). Dual-electrode electrochemical detection for poly (dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry, 72*(14), 3196-3202.

Mayorga Martinez, C. C., Treo, E. F., Madrid, R. E. ve Felice, C. C. (2011). Real-time measurement of glucose using chrono-impedance technique on a second generation biosensor. *Biosensors and Bioelectronics, 29*(1), 200-203. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.08.018

Mehrvar, M. ve Abdi, M. (2004). Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Analytical Sciences, 20*(8), 1113-1126. doi:10.2116/analsci.20.1113

Michaelis, L. ve Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z, 49*(333-369), 352.

Ming, T., Luo, J., Liu, J., Sun, S., Xing, Y., Wang, H., . . . Yang, Z. (2020). based microfluidic aptasensors. *Biosensors and Bioelectronics, 170*, 112649.

Mirji, S., Halligudi, S., Mathew, N., Jacob, N. E., Patil, K. ve Gaikwad, A. (2007). Adsorption of methanol on mesoporous SBA-15. *Materials Letters, 61*(1), 88-92.

Moehlenbrock, M. J. ve Minteer, S. D. (2017). Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. *Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols*. 1-7.

Murakami, Y., Kikuchi, J.-i., Hisaeda, Y. ve Hayashida, O. (1996). Artificial enzymes. *Chemical reviews, 96*(2), 721-758.

Nag, A., Mitra, A. ve Mukhopadhyay, S. C. (2018). Graphene and its sensor-based applications: A review. *Sensors and Actuators A: physical, 270*, 177-194.

Nasiriani, T., Nazeri, M. T. ve Shaabani, A. (2023). Cobalt phthalocyanine conjugated SBA-15 mesoporous silica via the Ugi four-component reaction: A potential heterogeneous

catalytic nanocomposite for CO2 fixation reaction. *Microporous and mesoporous materials, 354*, 112514.

Nguyen, H. H. ve Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology, 26*(6), 157-163.

O'Sullivan, C. K. (2002). Aptasensors – the future of biosensing? *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372*(1), 44-48. doi:10.1007/s00216-001-1189-3

Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., . . . Makaroff, L. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice, 128*, 40-50.

Olokoba, A. B., Obateru, O. A. ve Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal, 27*(4), 269.

Ozougwu, J., Obimba, K., Belonwu, C. ve Unakalamba, C. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol, 4*(4), 46-57.

Palazzuoli, A. ve Iacoviello, M. (2023). Diabetes leading to heart failure and heart failure leading to diabetes: epidemiological and clinical evidence. *Heart Failure Reviews, 28*(3), 585-596.

Peña-Bahamonde, J., Nguyen, H. N., Fanourakis, S. K. ve Rodrigues, D. F. (2018). Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences. *Journal of nanobiotechnology, 16*, 1-17.

Prante, M., Segal, E., Scheper, T., Bahnemann, J. ve Walter, J. (2020). Aptasensors for point-of-care detection of small molecules. *Biosensors, 10*(9), 108.

Ramachandran, A. (2014). Know the signs and symptoms of diabetes. *The Indian journal of medical research, 140*(5), 579.

Raoufi, A. M., Tang, X., Jing, Z., Zhang, X., Xu, Q. ve Zhou, C. (2018). Blood glucose monitoring and its determinants in diabetic patients: a cross-sectional study in Shandong, China. *Diabetes Therapy, 9*, 2055-2066.

Rodriguez-Stanley, J., Zilioli, S., Idalski Carcone, A., Slatcher, R. B. ve Ellis, D. A. (2023). Naturalistically observed interpersonal problems and diabetes management in older adolescents and young adults with type 1 diabetes. *Psychology & health, 38*(2), 214-229.

Rodriguez, J.-M. G., Hux, N. P., Philips, S. J. ve Towns, M. H. (2019). Michaelis–Menten graphs, Lineweaver–Burk plots, and reaction schemes: Investigating introductory biochemistry students' conceptions of representations in enzyme kinetics. *Journal of Chemical Education, 96*(9), 1833-1845.

Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. ve Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews, 39*(5), 1747-1763.

Rowley-Neale, S. J., Smith, G. C. ve Banks, C. E. (2017). Mass-producible 2D-MoS2-impregnated screen-printed electrodes that demonstrate efficient electrocatalysis toward the oxygen reduction reaction. *ACS applied materials & interfaces, 9*(27), 22539-22548.

Rusling, J. F. ve Forster, R. J. (2021). Biosensors Designed for Clinical Applications. *Biomedicines, 9*(7), 702. Retrieved from https://www.mdpi.com/2227-9059/9/7/702

Saikia, L., Srinivas, D. ve Ratnasamy, P. (2007). Comparative catalytic activity of Mn (Salen) complexes grafted on SBA-15 functionalized with amine, thiol and sulfonic acid groups for selective aerial oxidation of limonene. *Microporous and mesoporous materials, 104*(1-3), 225-235.

Samal, S., Mohanty, R. P., Mohanty, P. S., Giri, M. K., Pati, S. ve Das, B. (2023). Implications of biosensors and nanobiosensors for the eco-friendly detection of public health and agro-based insecticides: A comprehensive review. *Heliyon*.

Sayari, A., Han, B.-H. ve Yang, Y. (2004). Simple synthesis route to monodispersed SBA-15 silica rods. *Journal of the American Chemical Society, 126*(44), 14348-14349.

Scheller, F. W., Schubert, F., Neumann, B., Pfeiffer, D., Hintsche, R., Dransfeld, I., . . . Zaitsev, S. Y. (1991). Second generation biosensors. *Biosensors and Bioelectronics, 6*(3), 245-253. doi:https://doi.org/10.1016/0956-5663(91)80010-U

Schumacher, K., Ravikovitch, P. I., Du Chesne, A., Neimark, A. V. ve Unger, K. K. (2000). Characterization of MCM-48 materials. *Langmuir, 16*(10), 4648-4654.

Sercan, D. ve Altay, F. (2018). Biosensors from the first generation to nano-biosensors. *International Advanced Researches and Engineering Journal, 2*(2), 200-207.

Shaw, J. E., Sicree, R. A. ve Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice, 87*(1), 4-14.

Sheldon, R., Schoevaart, R. ve Van Langen, L. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation, 23*(3-4), 141-147.

Silva, A. M., da Silva, E. C. ve da Silva, C. O. (2006). A theoretical study of glucose mutarotation in aqueous solution. *Carbohydrate research, 341*(8), 1029-1040.

Simsek, V., Degirmenci, L. ve Murtezaoglu, K. (2017). Esterification of lauric acid with glycerol in the presence of STA/MCM-41 catalysts. *International Journal of Chemical Reactor Engineering, 15*(2), 20150176.

Solanki, P. R., Kaushik, A., Agrawal, V. V. ve Malhotra, B. D. (2011). Nanostructured metal oxide-based biosensors. *NPG Asia Materials, 3*(1), 17-24.

Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. ve Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 27*(2), 108-117. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004

Stine, K. J. (2019). Biosensor applications of electrodeposited nanostructures. *Applied Sciences, 9*(4), 797.

Suib, S. L. (2017). A review of recent developments of mesoporous materials. *The Chemical Record, 17*(12), 1169-1183.

Suresh, R., Rajendran, S., Khoo, K. S. ve Soto-Moscoso, M. (2023). Enzyme Immobilized nanomaterials: An electrochemical bio-sensing and biocatalytic degradation properties toward organic pollutants. *Topics in Catalysis, 66*(9-12), 691-706.

Sýs, M., Bártová, M., Mikysek, T. ve Švancara, I. (2023). Electrodeposited Carbonyl Functional Polymers as Suitable Supports for Preparation of the First-Generation Biosensors. *Sensors, 23*(7), 3724. Retrieved from https://www.mdpi.com/1424-8220/23/7/3724

Şahin, S. (2020). A simple and sensitive hydrogen peroxide detection with horseradish peroxidase immobilized on pyrene modified acid-treated single-walled carbon nanotubes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 95*(4), 1093-1099.

Şimşek, V. ve Şahin, S. (2019). Characterization and catalytic performance evaluation of a novel heterogeneous mesoporous catalyst for methanol–acetic acid esterification. *Journal of Porous Materials, 26*, 1657-1665.

Şimşek, V. ve Şahin, S. (2021). Silika Kaynaklı Mezo-gözenekli Malzemelerin Enzimatik Elektrokimyasal Sistemlerde Kullanımının İncelenmesi.

Tetyana, P., Shumbula, P. M. ve Njengele-Tetyana, Z. (2021). Biosensors: design, development and applications. In *Nanopores*: IntechOpen.

Theofilis, P., Oikonomou, E., Tsioufis, K. ve Tousoulis, D. (2023). Diabetes mellitus and heart failure: epidemiology, pathophysiologic mechanisms, and the role of SGLT2 inhibitors. *Life, 13*(2), 497.

Tuerk, C. ve Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *science, 249*(4968), 505-510.

Ulbrecht, J. S., Cavanagh, P. R. ve Caputo, G. M. (2004). Foot problems in diabetes: an overview. *Clinical Infectious Diseases, 39*(Supplement_2), S73-S82.

Uniyal, A., Srivastava, G., Pal, A., Taya, S. ve Muduli, A. (2023). Recent Advances in Optical Biosensors for Sensing Applications: a Review. *Plasmonics, 18*(2), 735-750. doi:10.1007/s11468-023-01803-2

Vasilescu, A., Hayat, A., Gáspár, S. ve Marty, J. L. (2018). Advantages of carbon nanomaterials in electrochemical aptasensors for food analysis. *Electroanalysis, 30*(1), 2-19.

Velasco-Garcia, M. N. ve Mottram, T. (2003). Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering, 84*(1), 1-12. doi:https://doi.org/10.1016/S1537-5110(02)00236-2

Veli, S. ve Pinar, A. (2018). Characterization and catalytic performance of modified sba-16 in liquid phase reaction. *International Journal of Chemical Reactor Engineering, 16*(8), 20170246.

Verma, M. L., Sukriti, Dhanya, B., Saini, R., Das, A. ve Varma, R. S. (2022). Synthesis and application of graphene-based sensors in biology: a review. *Environmental Chemistry Letters, 20*(3), 2189-2212.

Villegas, M. F., Garcia-Uriostegui, L., Rodríguez, O., Izquierdo-Barba, I., Salinas, A. J., Toriz, G., . . . Delgado, E. (2017). Lysine-grafted MCM-41 silica as an antibacterial biomaterial. *Bioengineering, 4*(4), 80.

Waldrop, G. L. (2009). A qualitative approach to enzyme inhibition. *Biochemistry and Molecular Biology Education, 37*(1), 11-15.

Wang, J. (2001). Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis, 13*(12), 983-988. doi:https://doi.org/10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::AID-ELAN983>3.0.CO;2-#

Wang, J., Wang, F. ve Dong, S. (2009). Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine based on aptamer switch. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 626*(1-2), 1-5.

Wang, X., Makal, T. A. ve Zhou, H.-C. (2014). Protein immobilization in metal–organic frameworks by covalent binding. *Australian Journal of Chemistry, 67*(11), 1629-1631.

Westman, E. C. (2021). Type 2 diabetes mellitus: a pathophysiologic perspective. *Frontiers in nutrition, 8*, 707371.

WHO. (2023). Diabetes. Retrieved from. Retrieved from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes

Wingard, D. L. ve Barrett-Connor, E. (1995). Heart disease and diabetes. *Diabetes in America, 2*(1), 429-448.

Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.-J. ve Kalisz, H. M. (2000). Conserved arginine-516 of Penicillium amagasakiense glucose oxidase is essential for the efficient binding of β-D-glucose. *Biochemical Journal, 347*(2), 553-559.

Yagati, A. K., Choi, Y., Park, J., Choi, J.-W., Jun, H.-S. ve Cho, S. (2016). Silver nanoflower–reduced graphene oxide composite based micro-disk electrode for insulin detection in serum. *Biosensors and Bioelectronics, 80*, 307-314.

Yoo, E.-H. ve Lee, S.-Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors, 10*(5), 4558-4576. Retrieved from https://www.mdpi.com/1424-8220/10/5/4558

Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T. ve Davies, M. J. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate medical journal, 92*(1084), 63-69.

Zhang, N., Liu, B., Cui, X., Li, Y., Tang, J., Wang, H., . . . Li, Z. (2021). Recent advances in aptasensors for mycotoxin detection: On the surface and in the colloid. *Talanta, 223*, 121729.

Zhao, D., Feng, J., Huo, Q., Melosh, N., Fredrickson, G. H., Chmelka, B. F. ve Stucky, G. D. (1998). Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *science, 279*(5350), 548-552.

Zhao, D., Sun, J., Li, Q. ve Stucky, G. D. (2000). Morphological control of highly ordered mesoporous silica SBA-15. *Chemistry of Materials, 12*(2), 275-279.

Ziegler, C. ve Göpel, W. (1998). Biosensor development. *Current Opinion in Chemical Biology, 2*(5), 585-591. doi:https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80087-2