

T.C.  
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KANSER HÜCRESİ BELİRLENMESİNE YÖNELİK  
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN VE  
ELEKTROKİMYASAL PLATFORMLARIN  
GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YUDUM TEPELİ

OCAK 2015

MUĞLA

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**KANSER HÜCRESİ BELİRLENMESİNE YÖNELİK**  
**ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN VE**  
**ELEKTROKİMYASAL PLATFORMLARIN**  
**GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YUDUM TEPELİ**

**OCAK 2015**

**MUĞLA**

**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**TEZ ONAYI**

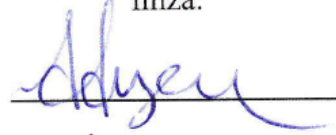
**YUDUM TEPELİ** tarafından hazırlanan **KANSER HÜCRESİ BELİRLENMESİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN VE ELEKTROKİMYASAL PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ** başlıklı tezinin, 12/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**TEZ SINAV JURİSİ**

Prof. Dr. Hediye Şule AYCAN (**Jüri Başkanı**)

Fen Bilgisi Öğretmenliği Ana Bilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

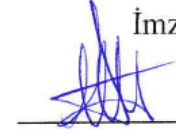
İmza:



Prof. Dr. Ülkü ANIK\*\* (**Danışman**)

Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

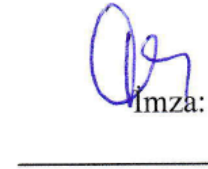
İmza:



Prof. Dr. Suna TİMUR (**Üye**)

Biyokimya Anabilim Dalı,  
Ege Üniversitesi, İzmir

İmza:

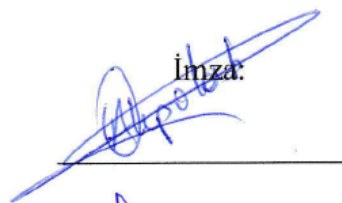


**ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI**

Prof. Dr. Mehmet Uğurlu ✓

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

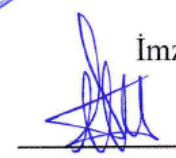
İmza:



Prof. Dr. Ülkü ANIK

Danışman, Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 12/01/2015

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Yudum TEPELİ

12/01/2015



**ÖZET**  
**KANSER HÜCRESİ BELİRLENMESİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL**  
**YÖNTEMLERİN VE ELEKTROKİMYASAL PLATFORMLARIN**  
**GELİŞTİRİLMESİ**

Yudum TEPELİ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ülkü ANIK

Ocak 2015, 67 sayfa

Bu yüksek lisans tezinde, rahim ağzı kanser (HeLa) hücresi belirlenmesi amacı ile ilk kez camımsı karbon pasta elektrot (GCPE) ve PAMAM temelli elektrokimyasal sitosensör ve sentri-sitosensör geliştirilmiştir. Çalışma iki bölümden oluşmaktadır. İlk aşamada GCPE hazırlanarak, kanser hücresine spesifik hale getirilmek için modifiye edilmiştir. Modifikasyon aşamalarının ilkinde, GCPE elektrokimyasal olarak altın nanopartikülle kaplanmıştır. Daha sonra elektrot yüzetine sırası ile sisteamin ve çapraz bağlayıcı olarak da glutraldehit immobilize edilmiştir. Bir tür dendrimer olan PAMAM'ın da yüzeye tutturulmasından sonra son modifikasyon basamağı olarak, hazırlanan yüzeye folik asit immobilize edilmiştir. Elektrot immobilizasyonunun her aşaması, ferrisiyanür medyatörüne karşı voltammogramlar alınarak gözlenmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması folik asit ile ilişkili olduğundan, folik asit ve inkübasyon süresi optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Kanser hücresinin elektrot yüzeyine bağlanması sonucu oluşan akım düşüşü, kanser hücre miktarıyla ilişkilendirilerek tayin gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise; GCPE, biyosentri-voltammetrik çalışma hücresine monte edilmiş ve yukarıda anlatıldığı şekilde modifikasyonu tamamlanmıştır. İlk prosedüre ek olarak; bu çalışma santrifüj basamağını da içerdiğinden, santrifüj parametreleri olan santrifüj hızı ve santrifüj süresi de optimize edilmiştir. Biyosentri-voltammetri yöntemi ön-deriştirme adımını içerdiğinden, bu yöntemle daha duyar sonuçlar alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosentri-voltammetri, sitosentri-voltammetri, HeLa kanser hücresi, sitosensör

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL METHODS AND ELECTROCHEMICAL PLATFORMS FOR FOLLOWING DETERMINATION OF CANCER CELLS

Yudum TEPELİ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ülkü ANIK

January 2015, 67 pages

In this master thesis, glassy carbon paste electrode (GCPE) and PAMAM based electrochemical cytosensor and centri-cytosensor were developed to detect cervical cancer (HeLa) cells for the first time. Present work consists of two chapters. In the first chapter, GCPE was modified to make specific cytosensor for the detection of cancer cells. For this purpose, as a first step GCPE was covered with gold nano particles via electrochemical deposition. Then, cysteamine and as a cross-linking agent glutaraldehyde were immobilized onto electrode surface respectively. After that the immobilization of PAMAM was conducted. As a final step of modification folic acid was attached onto the modified electrode surface. Every step of electrode modification was monitored by following the voltammograms of ferricyanide. Since the attachment of HeLa cancer cells on to electrode surface is due to the folic acid presents, optimization of folic acid amount and incubation time parameters were examined. The amount of cancer cells is indirectly proportional with the current decrease via caused by HeLa cancer cells that are immobilized onto electrode surface. In the second chapter of the thesis, GCPE was mounted onto biocentri-voltammetric working cell and modification steps were repeated as above. Since biocentri-voltammetry involves centrifugation, centrifuge parameters like centrifuge time and centrifuge speed were also optimized. More sensitive results were obtained with biocentri-voltammetry since the method involves preconcentration step prior to voltammetric detection.

**Keywords:** Biocentri-voltammetry, cytocentri- voltammetry, HeLa cancer cell, cytosensor

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamı belirleme, geliştirme ve yürütmem konusunda bana yol gösteren ve hiçbir imkanını esirgemeyen sayın danışmanım Prof.Ülkü ANIK'a,

Çalışma konumu kavramam konusunda yardımlarını benden esirgemeyen sayın Prof. Dr. Suna TİMUR'a ve doktora öğrencisi Bilal DEMİR'e,

Çalışma grubuma adaptasyonumda samimi yardımlarını ve sabırlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım asistan doktora öğrencisi Sema ASLAN ve yüksek kimyager Sinan Cemgil Sultan'a ,

Tezimin yazım ve düzenleme aşamasında bana hep yardımcı olan biricik abim asistan doktora öğrencisi Yusuf TEPELİ'ye ve yardımsever arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Murat BİLTEKİN'e,

Bu süreçte maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen canım anneme, babama ve henüz aramıza katılmayan ama geleceğini duyduğum andan beri mutluluğuma mutluluk katan biricik yeğenim bir TANEM'e sonsuz teşekkürler...

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK VE ÖZETLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Biyosensörler.....	3
2.1.1. Bir biyosensörün işleyiş mekanizması.....	4
2.1.2. Biyokomponent türüne göre biyosensörler.....	4
2.2. Nanoteknoloji Kavramı .....	6
2.2.1. Nanomalzemelerin biyosensörlerde kullanım olanakları .....	6
2.2.2. Altın nanopartiküller (Aunp) .....	7
2.3. Dendrimerler .....	8
2.3.1. Dendrimerlerin sağlık alanında kullanımının önemi .....	11
2.3.2. Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri .....	11
2.4. Kanser Hücrelerine Spesifik Biyomolekül: Folik asit .....	13
2.5. Elektroanalitik Yöntemler .....	14
2.5.1. Voltammetri yöntemi.....	15
2.5.1.1. Döngüsel voltammetri (CV) .....	17
2.5.2. Voltammetride kullanılan elektrotlar.....	19
2.5.2.1. Referans elektrotlar.....	19
2.5.2.2. Yardımcı elektrotlar .....	19
2.5.2.3. Çalışma elektrotları .....	19
2.5.3. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) .....	21
2.5.4. Senti-voltammetri .....	24
2.5.5. Biyosenti-voltammetri.....	25
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>27</b>
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	27
3.2. Kullanılan Elektrotlar .....	29



3.3. Kullanılan Reaktifler .....	30
3.3.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	31
3.3.1.1. Destek elektrolit çözeltisinin hazırlanması .....	31
3.3.1.2. MES tamponunun hazırlanması .....	31
3.3.1.3. Altın çözeltisinin hazırlanması.....	32
3.3.1.4. Sisteamin çözeltisinin hazırlanması .....	32
3.3.1.5. Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanması .....	32
3.3.1.6. PAMAM çözeltisinin hazırlanması.....	32
3.3.1.7. Folik asit çözeltisinin hazırlanması .....	33
3.3.1.8. Analit çözeltisinin hazırlanması .....	33
3.3.2. Sitosensörün fabrikasyonu .....	33
3.3.2.1. Yalın GCPE'un hazırlanması.....	33
3.3.2.2. Yalın GCPE'nun modifiye edilmesi ve sitosensörün oluşturulması..	34
<b>4. SONUÇ.....</b>	<b>36</b>
4.1. Elektrokimyasal Sitosensörün Fabrikasyon Aşamalarının Floresans Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	36
4.2. Elektrokimyasal Sitosensörün Fabrikasyon Aşamalarının Elektrokimyasal Karakterizasyonu .....	38
4.2.1. CV ile elektrokimyasal sitosensörün karakterizasyonu .....	38
4.2.2. EIS ile elektrokimyasal sitosensörün karakterizasyonu.....	40
4.3. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu .....	42
4.3.1. Folik asit derişimi optimizasyonu.....	42
4.3.2. İnkübasyon süresi optimizasyonu .....	43
4.4. Analitiksel Karakteristik.....	45
4.4.1. Doğrudan voltammetrik yöntemle kanser hücrelerinin tayini .....	45
4.4.2. Senti voltammetrik yöntemle kanser hücrelerinin tayini: sitosentri-voltammetri.....	47
4.4.2.1. Santrifüj hızı optimizasyonu.....	47
4.4.2.2. Santrifüj süresi optimizasyonu .....	49
4.4.2.3. Sitosentri-voltammetri ile HeLa kanser hücrelerinin belirlenmesi... 50	
4.4.3. Biyosentri-voltammetrik hücrede santrifüjsüz kanser hücrelerinin tayini .. 52	
4.5. Elektrokimyasal Sitosensörün A549 Hücreleri ile Kontrol Edilmesi .....	53
4.6. Yorum.....	57
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>66</b>

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Tablo 4.1. Farklı kanser hücreleri belirlenmesi çalışmalarının karşılaştırılması ..... 56

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi .....	3
Şekil 2.2. Aunp'nin SEM görüntüsü.....	7
Şekil 2.3. Dendrimerlerin yapısı .....	9
Şekil 2.4. Dendrimerlerde jenerasyon sayısı gösterimi.....	9
Şekil 2.5. Dendrimerlerin yakınsak ve ıraksak sentezi gösterimi .....	10
Şekil 2.6. Pamam denrimerin $G_0$ yapısı .....	11
Şekil 2.7. PAMAM'ın farklı ph'lardaki davranışı .....	12
Şekil 2.8. PAMAM'ın bir DNA ile etkileşimi ve gen transferi.....	12
Şekil 2.9. Folik asidin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.10. Folik asit ile folik asit reseptörü arasındaki afinitenin şematik gösterimi	14
Şekil 2.11. Voltammetrik ölçümlerde kullanılan bir hücrenin ve 3'lü elektrot sisteminin şeması WE: çalışma elektrodu; RE: referans elektrodu, CE: yardımcı elektrot.....	15
Şekil 2.12. Bir voltammogram ve bileşenleri.....	16
Şekil 2.13. Döngüsel Voltammetri potansiyel-zaman grafikleri.....	18
Şekil 2.14. CV voltammogramı ve tarama hızının etkisi .....	18
Şekil 2.15. Voltammetrik çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması .....	20
Şekil 2.16. Farklı maddelerin EIS ölçümü sonucu elde edilen Nyquist eğrileri .....	22
Şekil 2.17. Nyquist eğrisinde oluşan yarım dairelerin bileşenleri .....	22
Şekil 2.18. Randles eşdeğer hücresi .....	23
Şekil 2.19. Senti - voltammetrik hücrenin A) kapalı, B) açık hali, C) şematik gösterim.....	24
Şekil 2.20. Senti - voltammetri çalışmalarında izlenen yol .....	25
Şekil 2.21. Biyosenti - voltammetrik yöntemle dopamin (Dp) belirlenmesi.....	26
Şekil 3.1. $\mu$ - AUTOLAB TYPE III cihazı .....	27
Şekil 3.2. A. PRESİCA XR 205SM-DR model hassa terazi ve B. ORİON STAR SERIES marka pH metre.....	28

Şekil 3.3. SİGMA 3-16 PK model santrifüj cihazı .....	28
Şekil 3.4. Deneysel çalışmaların yapıldığı üçlü elektrot sistemine ait düzenek .....	29
Şekil 3.5. Biyosentri - voltammetrik hücrede üçlü elektrot sistemi.....	30
Şekil 3.6. Yalın GCPE'nin hazırlanması .....	34
Şekil 3.7. Sitosensör modifikasyonunun şematik gösterimi .....	34
Şekil 4.1. Floresans mikroskop ile A. İTO boş yüzey, B. Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ İTO, C. A549 /Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ İTO ve D. HeLa/ Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ İTO görüntüsü .....	37
Şekil 4.2. Floresans mikroskop ile A. Karbon yüzey baskılı elektrot (cSPE) boş yüzey, B. Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ cSPE, C. A549 /Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ cSPE ve D. HeLa/ Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ cSPE görüntüsü .....	37
Şekil 4.3. GCPE üzerine elektrokimyasal yöntemle Aunp kaplanmasını gösteren voltammogram. ....	39
Şekil 4.4. CV ile modifiye elektrodun her tabakasının karakterizasyonu. a; GCPE, b; Aunp/GCPE, c; Cys/Aunp/GCPE, d; Glu/Cys/Aunp/GCPE, e; PAMAM/Glu/Aunp/GCPE, f; Folik A./PAMAM/Glu/Cys/Aunp/GCPE. Karakterizasyon aşamasındaki tüm ölçümler 50 mM [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3/4</sup> 50mM pH:7 PBS'de gerçekleştirilmiştir.....	40
Şekil 4.5. EIS tekniği kullanılarak 0.179 V çalışma potansiyelinde, 10 <sup>-2</sup> Hz ile 10 <sup>5</sup> Hz frekans aralığında ve 5 mV alternatif gerilim uygulanarak modifiye elektrodun karakterizasyonu. a; GCPE, b; Aunp/GCPE, c; Cys/Aunp/GCPE d; Glu/Cys/Aunp/GCPE, e; PAMAM/Glu/Cys/, f; Folik A./PAMAM/Glu/Cys/. Karakterizasyon aşamasındaki tüm ölçümler 50 mM Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3/4</sup> içeren 50 mM pH:7 PBS'de gerçekleştirilmiştir.....	41
Şekil 4.6. A: 1 mM, B: 3 mM, C: 5 mM, D: 10 mM, E: 25 mM ve F: 50 mM derişimde folik asit içeren sitosensörler ile 5x10 <sup>4</sup> hücre/ml içeren HeLa çözültisi kullanılarak 1 saat inkübasyon süresinde bu sitosensörlerin performanslarını gösteren voltammogramlar. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir. ....	42
Şekil 4.7. Folik asidin optimizasyon grafiği .....	43
Şekil 4.8. 25 mM folik asit içeren cytosensörler ile 5x10 <sup>4</sup> hücre/ml içeren HeLa çözültisinin A: 30, B: 60, C: 90 ve D: 120 dk inkübe edildikten sonra bu sitosensörlerin performanslarını gösteren voltammogramlar. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir.....	44
Şekil 4.9. İnkübasyon süresi optimizasyon grafiği .....	44

- Şekil 4.10. Hücre sayısı ile akım farklanması arasındaki ilişkiyi gösteren CV voltammogramları. Hücre miktarları, (A)  $10^6$ , (B)  $10^5$ , (C)  $10^4$ , (D)  $10^3$  (E)  $10^2$  hücre/ml şeklindedir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir. .... 46
- Şekil 4.11.  $10^2$ - $10^6$  hücre/mL aralığında yapılan ölçüm verileri ile elde edilen kalibrasyon grafiği ..... 46
- Şekil 4.12. Santrifüj hızının HeLa belirlenmesine etkisini gösteren voltammogramlar. Ölçümler A)0 rpm, B)300rpm, C)500rpm ve D)1000rpm de 1 dk santrifüj süresinde gerçekleştirilmiştir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir..... 48
- Şekil 4.13. Santrifüj hızının akım değerlerine etkisi..... 48
- Şekil 4.14. Santrifüj süresinin HeLa belirlenmesine etkisini gösteren voltammogramlar. Ölçümler A)0 dk, B) 0.5 dk, C) 1 dk, D) 3dk ve E) 7 dk santrifüj sürelerinde ve 500 rpm de gerçekleştirilmiştir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7, 50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir..... 49
- Şekil 4.15. Santrifüj süresinin akım değerine etkisi..... 50
- Şekil 4.16. HeLa derişimi ile akım farklanmasının doğrusal orantılı olduğunu gösteren biyosentri-voltammetrik voltammetrik ölçümler. Hücre miktarları A)  $5 \times 10^6$ , B)  $7.5 \times 10^5$ , C)  $7.5 \times 10^3$ , D)  $7.5 \times 10^2$  ve E) 8 hücre/ml şeklindedir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7, 50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir. .... 51
- Şekil 4.17. HeLa hücrelerinin biyosentri-voltammetrik yöntemle belirlenebildiği doğrusal aralık..... 51
- Şekil 4.18. HeLa derişimi ile akım farklanmasının doğrusal orantılı olduğunu gösteren Senti-voltammetri hücresinde santrifüj işlem basamağı olmadan yapılan voltammetrik ölçümler. Hücre miktarları (A)  $10^6$ , B) $7.5 \times 10^5$ , C)  $7.5 \times 10^3$ , D)  $7.5 \times 10^2$  ve E) $7.5 \times 10^1$  hücre/ml şeklindedir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir. .... 52
- Şekil 4.19. Biyosentri-voltammetri hücresi kullanılarak santrifüjsüz yapılan ölçümler sonucunda elde edilen HeLa belirlenmesi doğrusal aralığın gösterimi... 53
- Şekil 4.20. Elektrokimyasal sitosensörün spesifikliğinin  $5 \times 10^4$  hücre/ml A549 hücreleri ile test edilmesi ..... 54

- Şekil 4.21. Geliştirilen sitosensörün A549 hücreleri ile denemelerinin CV voltammogramları. A.  $10^6$ , B.  $10^5$ , C.  $10^4$ , D.  $10^3$  ve E.  $10^2$  hücre/ml derişimdeki A549 hücreleri ile kontrol denemeleri pH:7 , 50 mM PBS’de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V’dan -0.1 V’a, tarama hızı 0.05 v/s dir..... 55
- Şekil 4.22. Elektrokimyasal sitosensör ile A549 hücrelerinin etkileşiminden elde edilen kalibrasyon grafiğı..... 55

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aunp	Altın nanopartikül
CPE	Karbon Pasta Elektrot
GCPE	Camımsı Karbon Pasta Elektrot
GCE	Camımsı Karbon Elektrot
CV	Döngüsel Voltammetri
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetrisi
EDC	N'-ethylcarbodiimide hydro-chloride
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
HeLa	Rahim Ağzı Kanser Hücresi
g	Gram
LOD	Tayin Sınırı
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikro Litre
$\mu$ A	Mikro Amper
nm	Nano Metre
NHS	N-Hydroxysuccinimide
Hz	Hertz
PAMAM	Poliamidoamin
RSD	Tekrarlanabilirlik
SAM	Kendiliğinden Tabaka Oluşumu
%	Yüzde

## 1.GİRİŞ

Kentselleşmenin artması, çevresel koşullarda ve hayat koşullarında önemli değişikliklere yol açmıştır. Bu nedenle, kanser tüm dünyada hızla büyüyen bir sağlık problemi haline gelmiştir. Yüksek metastaz evrelerinin çoğunlukla ölüm ile sonuçlandığı göz önünde bulundurulursa, erken aşamada kanser tanısı ve doğru bir tedavi aşaması son derece önemlidir (Guo vd., 2014). Kanser hücrelerini yüksek duyarlılıkta belirlemek için hızlı ve basit tekniklerin geliştirilmesi preklinik çalışmalarda büyük önem taşımaktadır.

Prelinik ve kanser hücre biyolojisini kapsayan sitolojik testlerde, şu an hala kullanılan geleneksel metotlar, floresans ve radyoaktif belirlemelerdir. Bu teknikler, genellikle geniş kapsamlı deneysel süreç ve karmaşık enstrümantasyon gerektirir ayrıca çok masraflıdır. Bu sebeplerden dolayı, analitik kimyacılar, kanser hücresi belirlenmesinde yeterince duyar yöntemler geliştirmeye yönlenmişlerdir (Wang vd., 2012).

Kanser hücre yapısındaki antijenlerden birisi folik asitin alfa izoformudur. Bu yapı kanser spesifiktir ve normal hücrelere göre, kanser hücre zarındaki miktarı çok fazladır. Bu sebepten dolayı da kanser belirteci olarak kullanılır. Folat reseptörü ile folik asit arasındaki yüksek afinite kanser hücresi belirlenmesi ve tedavisine olanak sağlamaktadır (Wang vd., 2012).

Bu doğrultularda, Yan-Jie Guo ve arkadaşları altın nanoçubukların yüzeylerini folik asit reseptörüne spesifik olacak şekilde modifiye etmişler ve altın nanoçubukların absorpsiyon ve floresans özellikleri sayesinde HeLa kanser hücrelerini yüksek duyarlılıkta belirlemişlerdir. (Guo vd., 2014). Yine benzer bir çalışmada Ruimin Wang ve arkadaşları altın elektrodu altın nanopartiküller ile modifiye edip elektrokatalitik etkisini arttırmış ve folat spesifik bir biyosensör oluşturmuşlardır. Elde edilen biyosensör HeLa kanser hücresine karşı spesifiklik özellik göstermiştir



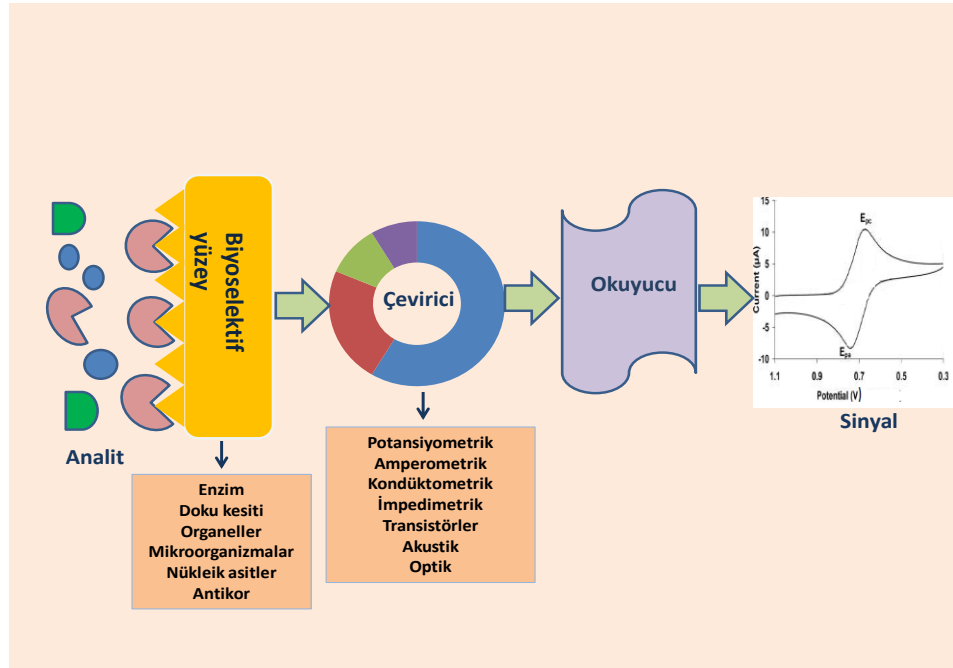
ve yapılan ölçümler sonucunda belirtme alt sınırı 6 hücre/ml olarak saptanmıştır (Wang vd., 2012).

Kanser hüresine özgü ve hücre zarı üzerinde bulunan spesifik yapılar kanser belirlenmesinde çok önemlidir. Örneğin; MCF-7 kanser hüresinin hücre zarı yüzeyinde bulunan c-erbB-2 reseptörleri bu kanser hüresinin seçimli olarak belirlenmesinde kullanılmıştır. Anti-c-erbB-2 spesifik antikor içeren modifiye elektrot kullanılarak antikor-antijen etkileşimine dayalı olarak MCF-7 kanser hüresi 100-10000 hücre/ml belirtme sınırları arasında yüksek duyarlılık ve seçimlilikle tayin edilmiştir. (Timur vd., 2013).

## 2. KAYNAK VE ÖZETLER

### 2.1. Biyosensörler

Biyosensörler, bir biyolojik tanıyıcı ve bir fiziksel iletici içeren analitik cihazlardır. Bu cihazlar analit konsantrasyonu ile orantılı ölçülebilir bir sinyal oluştururlar. (Sharma vd., 2003). Bir biyosensörün şematik gösterimi Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi

Sensör sistemlerinde biyolojik malzemeler kullanıldığında seçimlilik artmakta ve biyolojik afiniteye sahip olduğu molekülü doğrudan tanıma olayı gerçekleştirmektedir (Demirkol ve Timur., 2013). Bir biyosensörün yapısında bulunan biyolojik kısım (biyokomponent); enzim, antikor, mikroorganizma, organel veya yaşayan bir hücre olabilir. Fiziksel iletici kısım ise elektrokimyasal (potansiyometrik, impedimetrik, amperometrik, kondüktometrik, voltammetrik) akustik, optik veya kolorimetrik sistemler olabilir (Holford vd., 2012).

İdeal bir biyosensörün ; seçimli, dayanıklı, tekrarlanabilir, duyarlı , kararlı, geniş tayin aralığına ve kısa yanıt süresine sahip olması beklenir. Bunların dışında kolaylıkla rejenere ve minyatürize edilebilir, pratik ve ekonomik bir sistem olması beklenir.

### **2.1.1. Bir biyosensörün işleyiş mekanizması**

Biyosensörün algılayıcı tabakası ile hedef analit arasında, sensör yüzeyine spesifik bir bağlanma reaksiyonu yada etkileşme sonucunda kimyasal bir reaksiyon gerçekleşir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün yada ortamda bulunan substratın tükenmesi mikro-çevrede bir elektrokimyasal değişime neden olur. Cihazdaki çevirici birim bu değişimi algılar ve elektriksel sinyale çevirir. Bu veriler de elektronik bölüm tarafından okunur ve verilere dönüştürülür (Demirkol ve Timur., 2013).

### **2.1.2. Biyokomponent türüne göre biyosensörler**

Biyosensörler; yapılarındaki biyolojik algılayıcı yüzeyin farklanması ile 5 gruba ayrılır. Bu gruplar ve kapsadığı analiz alanları aşağıda belirtilmiştir (Can, 2010).

- **Enzim biyosensörleri:** Yapılarında biyokomponent elemanı olarak enzimlerin yer aldığı biyosensörlerdir (Timur vd., 2014). Enzim sensörlerinin metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler gibi küçük organik moleküller ve anorganik maddeleri belirlemede kullanılabilirliği mevcuttur.
- **Mikrobiyal biyosensörler:** Yapılarında biyokomponent elemanı olarak mikroorganizmaların yer aldığı biyosensörlerdir (Tkac vd., 2005). Mikrobiyal biyosensörlerin küçük organik, anorganik moleküllerin tayininde, biyolojik oksijen istemi (BOD), toksisite, mutajenite analizlerinde kullanılabilirliği mevcuttur.

- **DNA biyosensörleri (Genosensörler):** Yapılarında biyokomponent elemanı olarak DNA dizilerinin yer aldığı biyosensörlerdir (Sultan ve Anık., 2014). Virüsler, patojen mikroorganizmalar genosensörler kullanılarak belirlenebilir.
- **İmmunosensörler:** Antikor/antijen immünokompleks oluşum reaksiyonu ile hedef analitlerin belirlenmesini harmanlayan tekniklerdir (Luppa vd., 2001). Virüsler, patojen mikroorganizmalar ve ksenobiyotikler immunosensörlerle belirlenebilir.
- **Sitosensörler (Cytosensor):** Hücre belirlemek için tasarlanmış olan biyosensörlere sitosensör (hücre sensörü) adı verilmektedir. Sitosensörler çoğunlukla kanser hücresi belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bir biyosensörün aktif yüzeyi herhangi bir kanser hücresine spesifik olarak modifiye edilirse o kanser hücresini seçimli belirlemeye dayalı bir sitosensör üretilebilir (Liu vd., 2013).

Sitosensör alanında yapılmış elektrokimyasal ve elektrokimyasal olmayan çalışmalar mevcuttur. Lee ve arkadaşları, çoklu SERS nano etiketleri ile kanser hücrelerini etiketleyerek, yüzeylerindeki fenolik yapılar sayesinde göğüs kanseri hücresinin RAMAN spektroskopisiyle belirlenmesini gerçekleştirmiştir (Lee vd., 2014). Başka bir çalışmada yüzey plazmon rezonans (SPR) kullanılarak MCF-7 göğüs kanserlerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada belirtme alt sınırı 500 hücre/ml olarak saptanmıştır (Chen vd., 2014). Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HeLa kanser hücreleri CV ve DPV kullanılarak elektrokimyasal olarak belirlenmiş ve belirtme alt sınırı 300 hücre/ml olarak saptanmıştır (Wang vd., 2014). Li ve arkadaşları ise, MCF-7 hücrelerinin CV ve EIS ile belirlenmesini gerçekleştirmiş ve belirtme alt sınırını 100 hücre/ml olarak saptamışlardır (Li vd., 2011). Diğer bir çalışmada Su ve arkadaşları, kağıt temelli elektrokimyasal sito-aygıtı geliştirmişlerdir. Bu amaçla, altın temelli kağıt elektrot Lösemi kanserine seçimli olacak şekilde modifiye edilmiş ardından EIS ve CV ile kanser hücresi tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada LOD değeri 350 hücre/ml olarak saptanmıştır (Su vd., 2014). Dikkat çeken bir diğer çalışma, Xu ve arkadaşlarının altın elektrot temelli HeLa spesifik bir elektrokimyasal sitosensör geliştirmesidir. Diğer çalışmalarda

olduğu gibi bu çalışmada da HeLa hücresinin belirlenmesi CV ve DPV ile gerçekleştirilmiştir ve LOD değeri 10 huce/ml olarak belirlenmiştir (Xu vd., 2013).

Son olarak; Cheng ve arkadaşları meme kanserini belirlemek amacıyla bir elektrokimyasal sitosensur geliştirmiştir. Camımsı carbon elektrot temelli geliştirilen bu sitosensorde nanomalzeme olarak tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) tercih edilmiştir ve kanser hücresini CV ve DPV ile belirlenmiştir. LOD değeri 620 huce/ml olarak belirtilmiştir (Cheng vd., 2008).

Biyosensurler, anında ve yerinde analiz yapmaya uygun olduğundan endüstriye; proses görüntüleme ve kontrol alanında yaygın kullanıma sahiptir. Bunların yanı sıra biyosensurler, farmasötik endüstriyi, medikal diyagnostik ve çevresel analizler gibi birçok alanda uygulama olanağı bulmaktadır (Karube and Nakanishi, 1994).

## **2.2. Nanoteknoloji Kavramı**

Nanoteknoloji, 1-100 nanometre arasında boyutlara sahip maddelerin anlaşılması ve kontrolü olarak tanımlanabilir (Mamalis, 2006). Bir nanometre (nm), metrenin milyarda biridir. Atomlar 1 nm'den kucuk iken, bazı proteinler dahil olmak üzere pek çok molekül 1 nm ve daha büyük boyutlardadır (Whitesides et al, 2003).

Nanomalzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler olarak sınıflandırılabilirler. (Merkoi, 2007; Yavuz, 2011).

### **2.2.1. Nanomalzemelerin biyosensurlerde kullanım olanakları**

Nanomalzemeler; aşağıda belirtilen özelliklerinden dolayı biyosensur uygulamalarında tercih edilen yapılarıdır.

- Kucuk boyutlu ve buna bağlı olarak yüzey/ hacim oranının büyük olması
- Fiziksel zelliklerinin kimyasal olarak modifiye edilebilmesi (boyut, kompozisyon ve şekil)

- Hedef molekülleri bağlama özelliklerinin farklı olması
- Yapısal sağlamlılık

*Nanomalzemelerin elektroanalizlerde kullanılmalarının sağladığı bazı avantajlar şunlardır:*

Nanomalzemelerin elektrot yüzeyine immobilize edilmeleri, büyük yüzey alanı ve düzgün iletkenlik sağlar. Böylece moleküler ve biyomoleküler analitlerin elektrokimyasal belirlenmesinde duyarlılık artar.

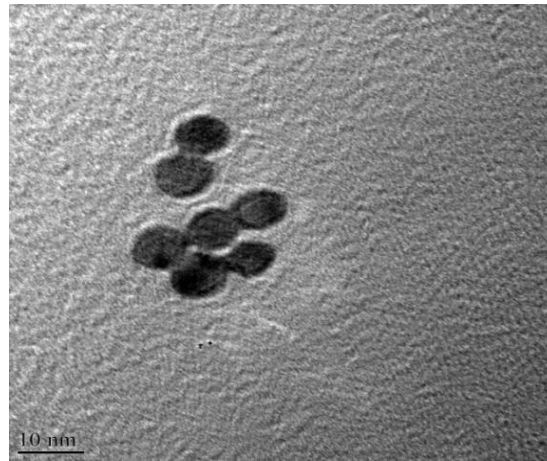
Analitlerin elektrokimyasal tayininde nanopartiküller sinyali artıran etkili işaretleyicilerdir.

Metal nanopartiküller; iletkenlik özellikleri, kontrollü elektrokimyasal fonksiyonları ile biyomalzeme yapılarının tasarlanmasına olanak sağlar (Odacı, 2010).

Nanoteknoloji çağında, daha duyar ve spesifik biyosensörlerin geliştirilmesinde metal nanopartiküller önemli rol oynamaktadır.

### **2.2.2. Altın nanopartiküller (Aunp)**

Kolloidal altın olarak da bilinen Aunp'ler, 3nm ile 200 nm aralığında değişik boyutlarda, ve farklı şekillerde oluşturulabilirler. Yüzey enerjisinden dolayı çoğunlukla küresel yapıyı tercih eden Aunp'ler Şekil 2.2'de görüldüğü gibi yarı küresel olarak kolaylıkla sentezlenebilirler (Doria vd., 2012).



**Şekil 2.2. Aunp'nin SEM görüntüsü**

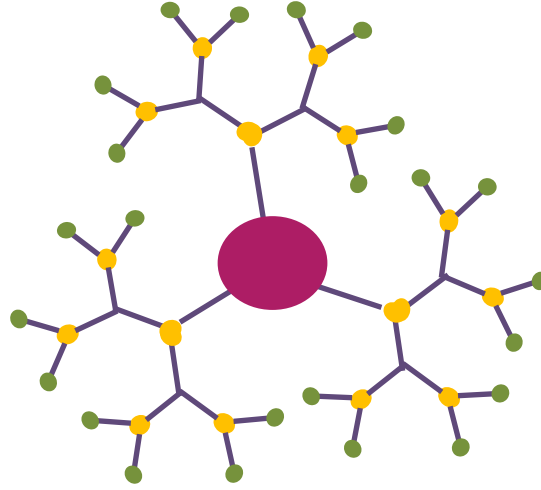
Altın nanopartiküller karakteristik optik özelliklere sahiptir ve sulu çözeltilerde farklı biyoışaretleyicilerle kolaylıkla türevlendirilirler. Ayrıca biyomoleküller için doğal ortamlarına benzer bir ortam sundukları için, biyo-yapıların yüzeye immobilizasyonunda Aunp'ler çokça tercih edilirler (Bharathi ve Nogami, 2001; Xiao vd., 1999). Yapılan bir çok çalışmada, pek çok enzimin Aunp ile immobilizasyonu sonrasında enzimatik ve elektrokimyasal aktivitelerini sürdürdükleri gözlenmiştir (Wang ve Wang, 2004; Zhao vd., 1992; Yıldırım, 2009). Aunp sadece organotiyol gruplarının bağlanabilecekleri alanı arttırmaz aynı zamanda kendiliğinden oluşan tek katmanın (SAM) dayanıklılığını ve yapısını da etkiler ( Liu vd., 2007). Bu avantajlarından dolayı nanopartikül temelli biyosensör uygulamalarında Aunp'lerin kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır (Baptista vd., 2008, Sperling vd., 2008, Boisselier vd., 2009).

### **2.3. Dendrimerler**

Dendrimerler; tekrarlayan, dallanmış, küre şeklindeki geniş moleküllerdir (Cloninger, 2002).

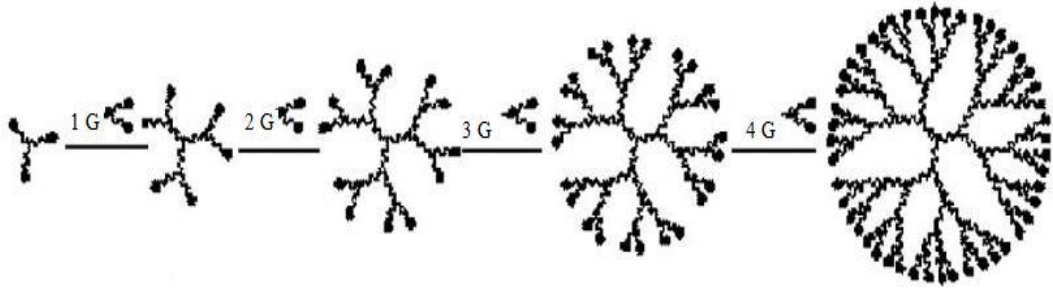
*Dendrimerler;*

- Bir çekirdek
- Çekirdek etrafında dallanma birimleri ve
- Dallanmış fonksiyonel grup olarak da adlandırılan yüzey gruplarından oluşur.



Şekil 2.3. Dendrimerlerin yapısı

Çok fazla dallanmaya sahip bu yapılar istenilen şekilde hazırlanabilmelerinden dolayı avantajlıdır. Dallanma birimleri dendrimerlerin tekrarlı bir şekilde büyümesini sağlamaktadır. Dendrimerlerin polimerizasyon derecesi, gerçekleştirilen tekrarlama döngü sayısını ifade eden jenerasyon sayısı (G) kavramıyla belirtilir. Jenerasyon sayısı çekirdekten dış yüzeye doğru ilerleyen dallanma noktaları sayısının hesaplanması ile kolayca tespit edilebilir (Bulut ve Akar, 2012).



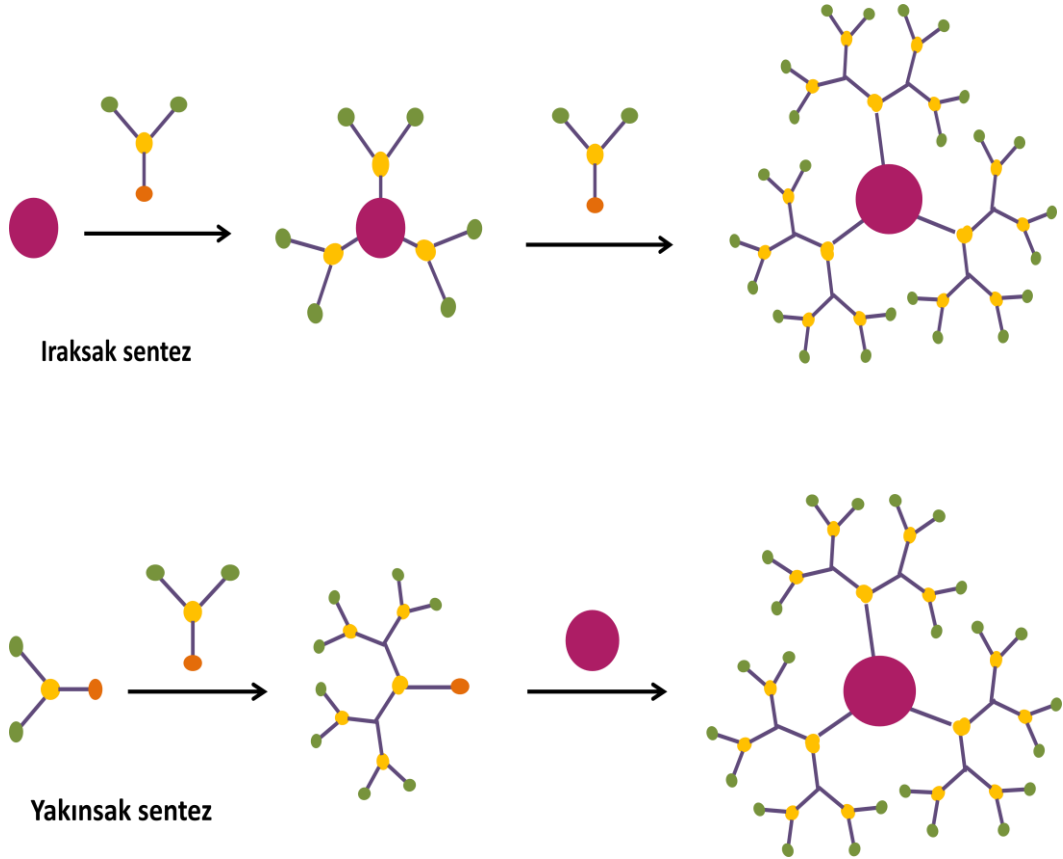
Şekil 2.4. Dendrimerlerde jenerasyon sayısı gösterimi

Dendrimerler çeşitliliğini uç fonksiyonel gruplarla sağlamaktadırlar. Yüzeyle karbonhidratların eklenmesi sonucu glikodendrimerler, aminoasitlerin eklenmesi sonucu peptid dendrimerler ve metallerin eklenmesi sonucu ise metalodendrimerler oluşturulur (Demirkol ve Timur, 2013).

Dendritik bir yapı; iraksak ve yakınsak olmak üzere iki farklı şekilde sentezlenebilir. Iraksak sentezde, çekirdekten başlanarak tek tek her bir jenerasyon sentezlenirken; yakınsak sentez yüzeyden başlar ve dendrimer parçalarının çekirdek ile birleşmesiyle



sentez tamamlanır. Her iki yöntemde de parçacığın çapı ve dolayısıyla yüzeydeki reaktif noktaların sayısı artar ve bu durum dendrimerlerin yüzey taşıyıcısı olarak kullanılmasında büyük avantaj sağlamaktadır (Wells ve Bradly, 1998).



Şekil 2.5. Dendrimerlerin yakınsak ve ıraksak sentezi gösterimi

Dendrimerler; toksik ve immünojenik olmadıklarından; bağırsak, kan doku, hücre membranı gibi biyobariyer olarak kullanılabilirliklerinden ve spesifik yapıların hedeflenebilmesi gibi avantajlarından dolayı özellikle ilaç taşıyıcı molekül olarak sıklıkla tercih edilmektedirler.

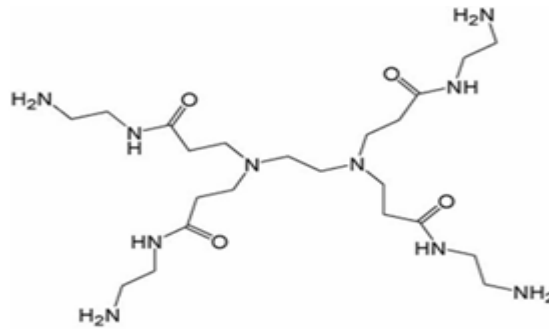
### 2.3.1. Dendrimerlerin sağlık alanında kullanımının önemi

Dendrimerler; büyük oranda kontrol edilebilir kimyasal yapıları, eş özellikteki yüzey grupları ve mükemmel kapsülleme özelliklerinden dolayı tıpta ilaç taşıma uygulamalarında oldukça fazla tercih edilmektedir. İlaç dendrimer üzerine bağlanarak hedef yapıya gönderilebildiği gibi, yapı içerisine kapsülleme yapılarak da ilaç taşınımı gerçekleştirilebilir. Bunun yanı sıra,

- Genetik tedavilerde DNA moleküllerinin hedef hücreye taşınımında,
- HIV ve benzeri gibi cinsel yolla bulaşan hastalıklara karşı ilişki sırasında aktif korumada,
- Dendrimer kullanılarak anti kanser ilaçları yapımın da da aktif olarak kullanılırlar (Bulut ve Akar, 2012).

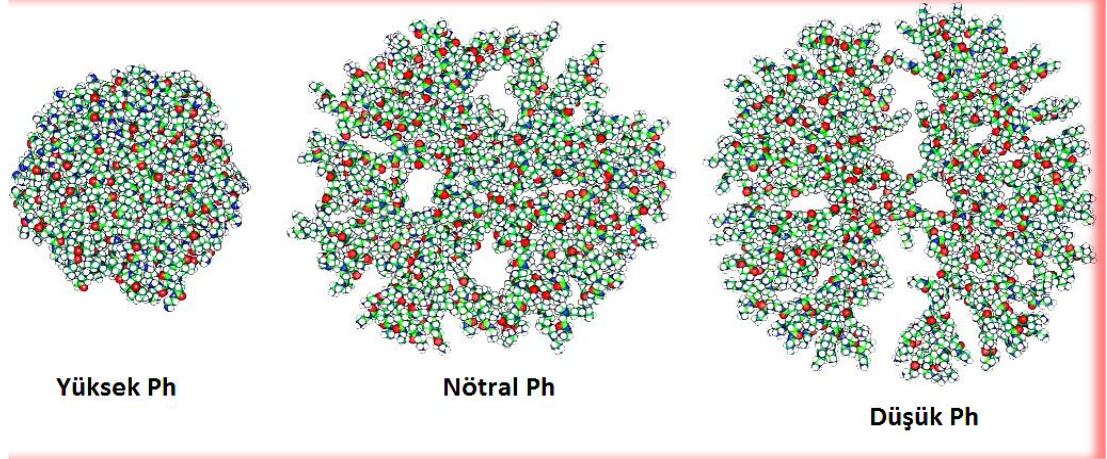
### 2.3.2. Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri

PAMAM dendrimerlerinin çekirdek yapısı amonyaktan oluşmaktadır. PAMAM dendrimerleri; nanoboyutlu ve düzgün oluşumlu küresel yapıya sahip, aşırı dallanmış sentetik polimerlerdir. Klasik polimerlerden farkı, moleküler yapısının homojen, molekül ağırlığının düşük ve yüksek fonksiyonlu uç yapılara sahip olmasıdır (Buczowski vd., 2011).



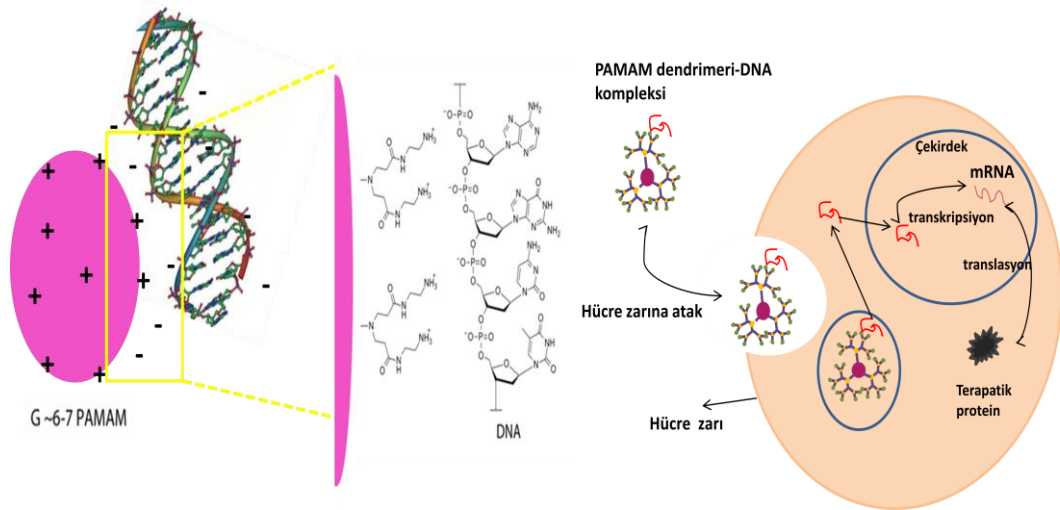
Şekil 2.6. Pamam denrimerin G<sub>0</sub> yapısı

Fonksiyonel yüzey grupları sayesinde hidrofilik (suda iyi çözünür) hale gelebilirler. Şekil 2.7’de gösterildiği gibi; PAMAM dendrimerleri, proton derişiminin çok yüksek olduğu ortamlarda etkinliğini gösteremezken, ortam pH’sı arttıkça dallanmış yapı görünümü ve yapısal etkinliği artar (Lee vd., 2002).



Şekil 2.7. PAMAM'ın farklı pH'lardaki davranışı

PAMAM dendrimerlerin toksik ve immunojenik özellik taşıyamaları, biyobozunur ve çok fonksiyonlu olmaları; ilaç taşıma, gen transfeksiyonu, tümör terapisi ve tanısal uygulamalarda çok önemli bir role sahip olmalarını sağlamıştır (Azar vd., 2013). Şekil 2.8’de PAMAM’ın DNA ile bir araya gelmesi ve sonrasında hücre membranında geçerek gen transferi gerçekleştirilmesi gösterilmiştir.

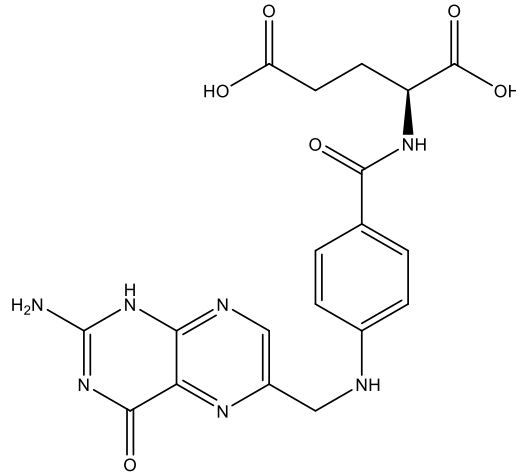


Şekil 2.8. PAMAM'ın bir DNA ile etkileşimi ve gen transferi

PAMAM dendrimerlerinin çekirdekleri etilendiamin, 1,4-diaminobütan, 1,6-diaminohekzan, 1,12-diaminododekan ve sistamin gibi farklı kimyasal gruplardan oluşabilmektedir. Bu tez kapsamında sistamin çekirdeğe sahip PAMAM dendrimerleri kullanılmıştır.

#### 2.4. Kanser Hücrelerine Spesifik Biyomolekül: Folik asit

Folik asit, B vitamini ailesinin bir üyesidir. Nükleik asit ve aminoasitlerin biyosentezine katılarak hücrenin yaşamı için temel bir rol oynar. Bu madde suda mızrak şeklinde kristallenen portakal sarısı renginde bir katıdır ve ısıtılmakla erimez, fakat 250 °C'de esmerleşerek bozunur. Serbest asit halinde az, fakat sodyum tuzu halinde suda çok çözünür. Bazik ve nötr çözeltilerinde ısıya pek dayanıklı değildir (Leamon vd., 2004).



Şekil 2.9. Folik asidin kimyasal yapısı

Folik asit; meme, yumurtalık, karaciğer, akciğer, boyun, beyin ve miyeloid gibi birçok insan karsinoma hücrelerinde fazlaca bulunan edilen folik asit reseptörünün belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Folat, folat reseptörü ile arasındaki yüksek afiniteden dolayı tedavi ve teşhiste kargo olarak işlev görür (Liu, vd., 2007).



Şekil 2.10. Folik asit ile folik asit reseptörü arasındaki afinitenin şematik gösterimi

## 2.5. Elektroanalitik Yöntemler

Maddelerin elektrokimyasal özelliklerini analiz amacıyla kullanılan yöntemlere *Elektroanalitik Yöntemler* denir. Elektroanalitik yöntemler, diğer analitik yöntemlere göre, birçok üstünlüğe sahiptir. Bunlar;

- Değişik yükseltgenme basamağına sahip türlerin eş zamanlı olarak kolayca saptanabilmesi,
- Yöntemlerin uygulanmasını sağlayan ekipmanların ve yazılımların diğer yöntemlere göre çok daha ucuz ve kullanışlı olmaları,
- Birçok elektroanalitik yöntemin aynı cihazda uygulanabilirliğinin olmasıdır (Tural vd., 2010).

Aşağıda elektroanalitik yöntemler ve ölçülen büyüklük cinsinden bir karşılaştırma yapılmıştır.

Potansiyometri.....	Analit derişimine karşı potansiyel
Kronopotansiyometri.....	Zamana karşı potansiyel
Elektrogravimetri.....	Toplanan fazın ağırlığı
Kondüktometri.....	İletkenlik

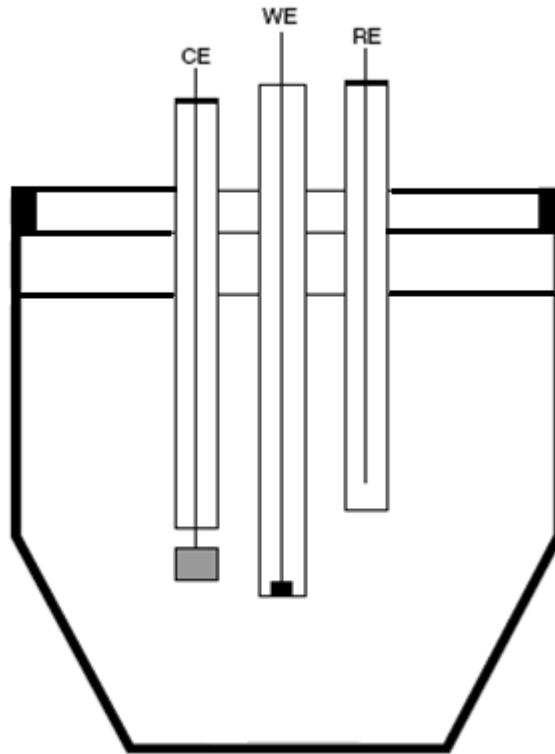
Polarografi, voltammetri.....Akım-potansiyel

Amperometri.....Analit derişimine karşı akım şiddeti

Kulometri.....Akım miktarı(Coulomb)

### 2.5.1. Voltammetri yöntemi

Polarize bir çalışma elektrodunun, değişen potansiyele karşı gösterdiği farklı akım değerleri ile analit derişimi arasındaki ilişkinin incelendiği elektroanalitik yöntemlere *voltammetri* denir. Voltammetri, akım-gerilim ve derişim ilişkilerinin incelendiği bir analiz yöntemidir. Akım-gerilim eğrileri, çalışma ve referans elektrot olmak üzere ikilli ya da çalışma, referans ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrotlu sistemlerle elde edilir.



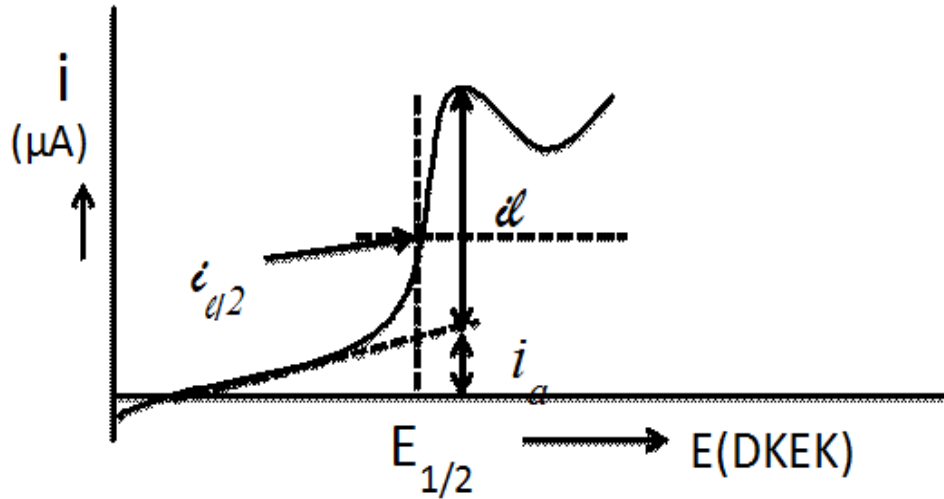
Şekil 2.11. Voltammetrik ölçümlerde kullanılan bir hücrenin ve 3'lü elektrot sisteminin şeması

WE: çalışma elektrodu; RE: referans elektrodu, CE: yardımcı elektrot

Voltammetrik yöntemler kullanılan akım türlerine ve çalışma elektroduna bağlı olarak isimlendirilir. Bunlar, doğru akım voltammetrisi, doğru akım polarografisi, alternatif akım voltammetrisi, alternatif akım polarografisi, kare dalga akım voltammetrisi, puls voltammetrisi, differansiyel puls voltammetrisi, döngüsel voltammetridir.

Voltammetrik yöntemlerde çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda akım oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Bu yöntemle herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışının incelenmesi, elektrota uygulanabilecek gerilim aralığının sınırlarına, kullanılan çalışma elektroduna, kullanılan çözücü ve destek elektrolitin türüne bağlıdır (Özcan, 2008; Çubukçu, 2008; Çevik, 2009; Can, 2010; Yavuz, 2011).

Voltammetrik ölçüm sonucunda elde edilen akım-potansiyel grafiklerine *voltammogram* denir. Artık akım, limit (sınır) akım ve yarı dalga potansiyeli voltammogramı niteleyen 3 önemli unsurdur.



Şekil 2.12. Bir voltammogram ve bileşenleri

**Artık akım**,  $i_a$  ile gösterilir. Sığasal akım ve faradayik akım bir araya gelerek artık akımı oluşturur. **Sığasal akım** elektrot ile çözelti arasında oluşan çift katmandan kaynaklanır. **Faradayik akım** ise, analit dışında destek elektrolitte bulunan elektroetkin safsızlıklardan kaynaklanır.

**Limit(sınır) akım**,  $i_l$  ile gösterilir ve voltammogramda görünen maksimum akım değerinden artık akımın çıkarılması ile elde edilen değerdir. Bu akım elektrot yüzeyinde elektroetkin türün derişiminin sifıra gittiği andaki akım değeridir ve potansiyelden hemen hemen bağımsızdır.

**Yarı dalga potansiyeli** ise, limit akımın yarısına karşılık gelen değerdir ve  $E_{1/2}$  ile gösterilir.

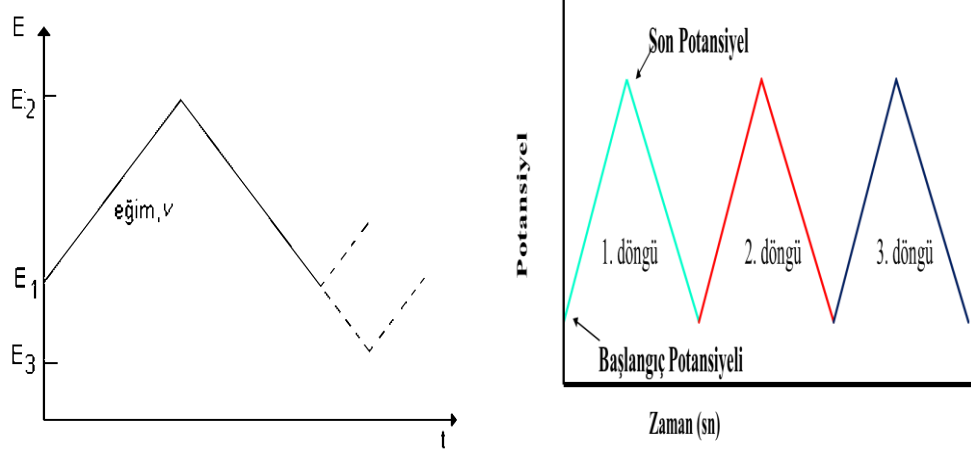
İlk geliştirilen voltammetrik-polarografik yöntem doğru akım polarografisidir. Bu yöntemden sonra duyarlılığı arttırmak veya elektrokimyasal mekanizmayı açıklamak için alternatif akım voltammetrisi, kare dalga voltammetrisi, normal puls voltammetrisi/polarografisi, differansiyel puls voltammetrisi ve sıyırma voltammetrisi gibi yöntemler geliştirilmiştir (Tural vd,2010).

Bu tez kapsamında sadece döngüsel voltammetri kullanıldığı için bu yöntemle ilgili daha ayrıntılı bilgi verilecektir.

#### *2.5.1.1. Döngüsel voltammetri (CV)*

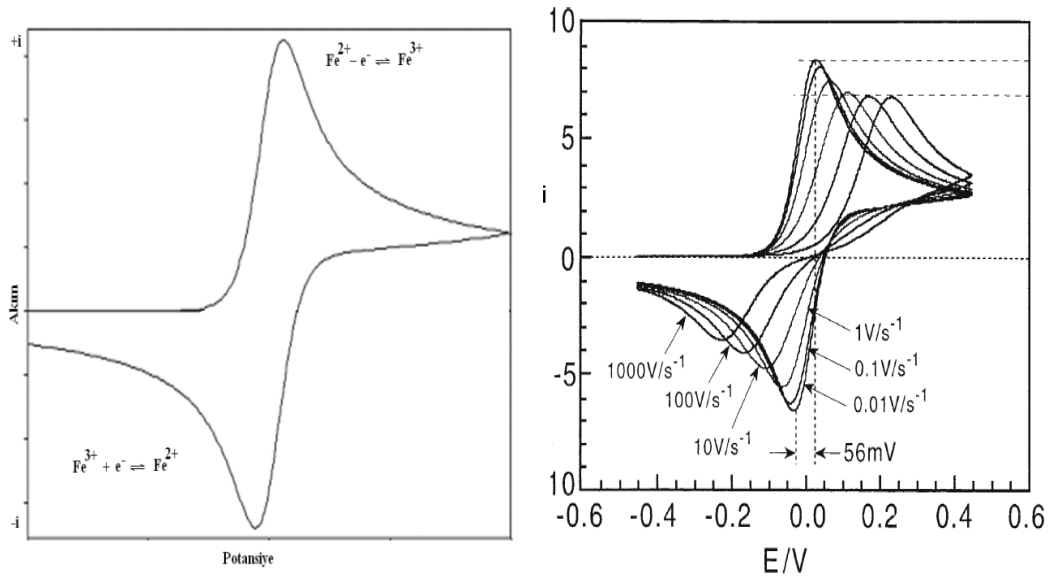
CV küçük bir elektroda zamanla doğrusal olarak değişen bir potansiyel uygulamasını içerir. Başlangıç potansiyeli olarak genellikle redoks tepkimesinin olmadığı bir potansiyel değeri seçilir ve potansiyel redoks tepkimesinin gerçekleştiği yönde  $E_1$  ve  $E_2$ (ya da  $E_3$ ) sınırları arasında belli bir hızda ( $v$ ) Şekil 2.13'de gösterildiği gibi taranır. Tercihen birkaç döngü halinde de ölçüm alınabilir.





**Şekil 2.13. Döngüsel Voltammetri potansiyel-zaman grafikleri**

Maddelerin; elektroetkinliklerinin ve elektrot yüzeyinin incelenmesi, ince yapıların aydınlatılması, modifiye elektrot yüzeyi hazırlanması, polimer ve metalik film oluşumu, nano ve mikro ölçekte elektrot yüzeyi hazırlanması ve tepkime mekanizmasının aydınlatılmasında döngüsel voltammetri önemli bir yere sahiptir.



**Şekil 2.14. CV voltammogramı ve tarama hızının etkisi**

Döngüsel voltammogramlarda akım-potansiyel değişimi pik şeklindedir. Pik yüksekliğinin tarama hızına bağlılığında gidilerek, adsorpsiyon, difüzyon ve eşleşmiş homojen kimyasal tepkimelerin rolü açıklanabilir (Tural vd., 2010)

## 2.5.2. Voltammetride kullanılan elektrotlar

### 2.5.2.1. Referans elektrotlar

Bu amaçla **polarlanmayan** ikinci sınıftan metal-metal iyonu elektrotları kullanılır. Referans elektrotlar ancak küçük akım şiddetlerinde polarlanmazlar. Akım şiddeti arttıkça ideal konumdan saparlar.  $Ag/AgCl$  ve  $Hg/Hg_2Cl_2$ (doygun) (*kalomel*) en çok kullanılan referans elektrotlarıdır (Tural vd., 2010).

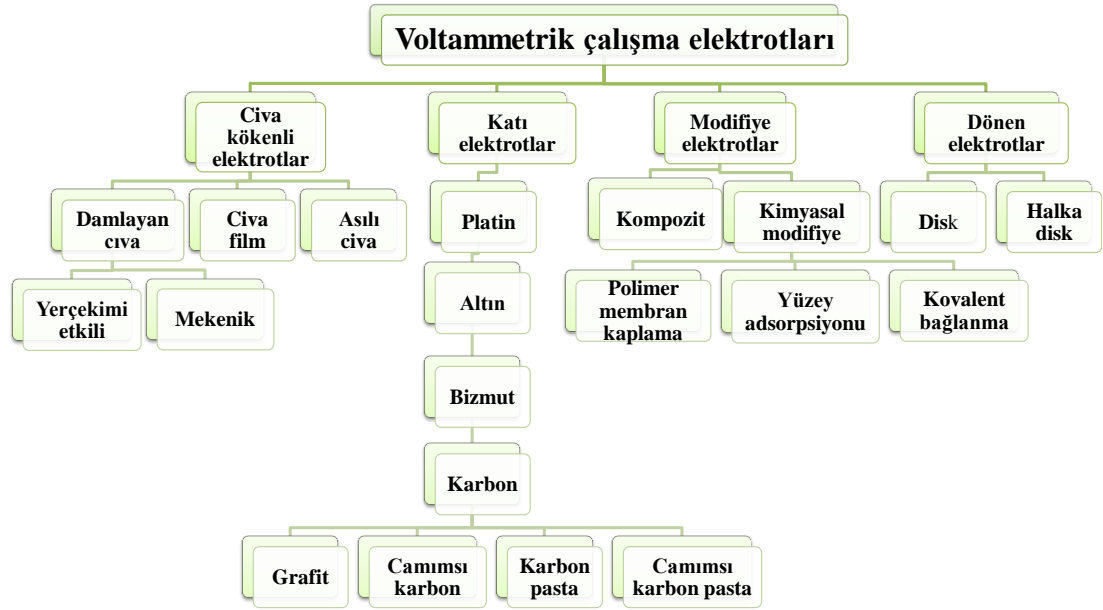
### 2.5.2.2. Yardımcı elektrotlar

İki elektrotlu sistemlerde, polarlanmayan referans elektrot üzerinden akım geçtiği için yüksek akımlarda referans elektrot ideallikten sapar ve polarlanma meydana gelir. Diğer yandan çözelti direncinin büyük olduğu durumlarda, bu direnci yenmek için yüksek potansiyel uygulamak gerekir. Bu iki sebepten dolayı, çalışma

elektrodunun polarizasyon potansiyeli yanlış algılanır. Bu sorun sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözümlenir. Akım, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında saptanır. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların soy metal olmaları gerekir (Tural vd., 2010).

### 2.5.2.3. Çalışma elektrotları

Voltammetride kullanılan elektrotların hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri önemlidir. Potansiyeli değişen elektrot, indikatör elektrot veya çalışma elektrodu adını alır. Genel olarak, kullanılan çalışma elektrotlarında polarizasyonu arttırmak için yüzey alanları  $1\text{cm}^2$ 'den küçük tutulur. Voltammetride sınırlı sayıda **polarlanabilen elektrot** kullanılır. Voltammetride kullanılan çalışma elektrotları Şekil 2.15'de belirtilmiştir.



Şekil 2.15. Voltammetrik çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması

### **Karbon temelli elektrotlar**

Karbon bazlı elektrotlar hızlı yanıt veren, ekonomik, farklı konfigürasyonlarda ve çaplarda kolaylıkla oluşturulabilen elektrotlardır (Anık Kırgöz vd., 2001). Karbon; geniş bir anodik potansiyel aralığına, düşük elektriksel dirence, düşük artık akıma ve tekrarlanabilir yüzey yapısına sahiptir ve bu yüzden ideal bir elektrot malzemesidir (Tural vd., 2010).

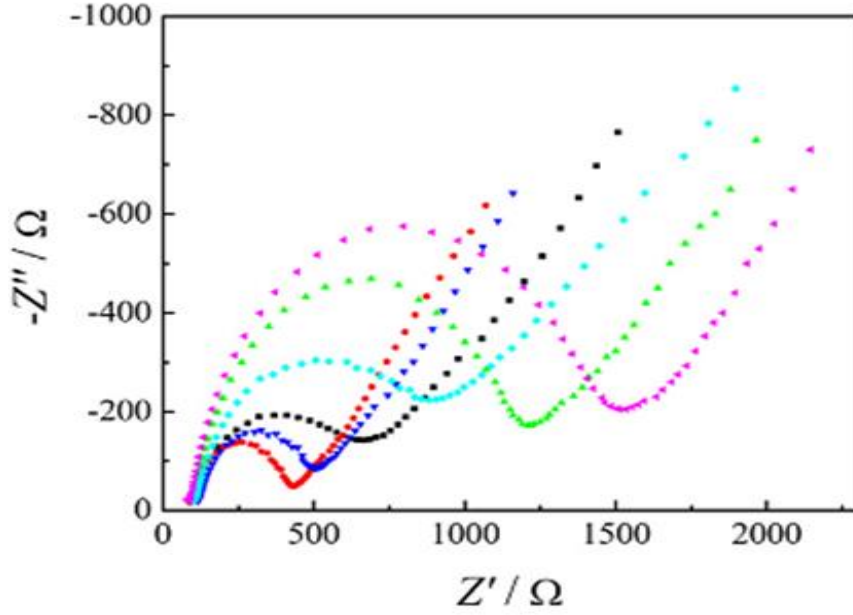
Camımsı karbon elektrot (GCE) ve karbon pasta elektrot (CPE) en yaygın kullanılan karbon elektrotlardır. CPE çok düşük zemin akımına, yenilenme ve modifikasyon kolaylığı içeren kompozit doğası gibi avantajlara sahipken, GCE önemli elektrokimyasal reaktiviteye, iyi mekaniksel katılığa ve ihmal edilebilir gözenekliliğe sahiptir (Anık Kırgöz vd., 2001).

Karbon pasta elektrot kompozit bir karbon elektrottur. Karbon pasta elektrot gibi bir diğerkompozit elektrot da *camımsı karbon pasta elektrot* (GCPE)'tur. Kompozit karbon elektrotlar, toz grafitin veya camımsı karbon mikro partiküllerin mineral yağ gibi organik bir sıvı ile karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır.

Modifiye edici kimyasal doğrudan iletken elektrot malzemesine katılıp, karıştırılarak elektrot hazırlanabilir. Bu elektrotlara *kompozit elektrot* denir. Pasta hazırlandıktan sonra bir tüp (örneğin teflon tüp) içine sıkıştırılarak doldurulur ve elektriksel bağlantı için platin veya bakır bir tel kullanılır. Oldukça geniş bir potansiyel aralığına sahip olan karbon pasta elektrotların yapım ve yenilenmeleri kısa ve kolay olup, yeterli derecede düşük zemin akımına sahiptir (Tural vd., 2010).

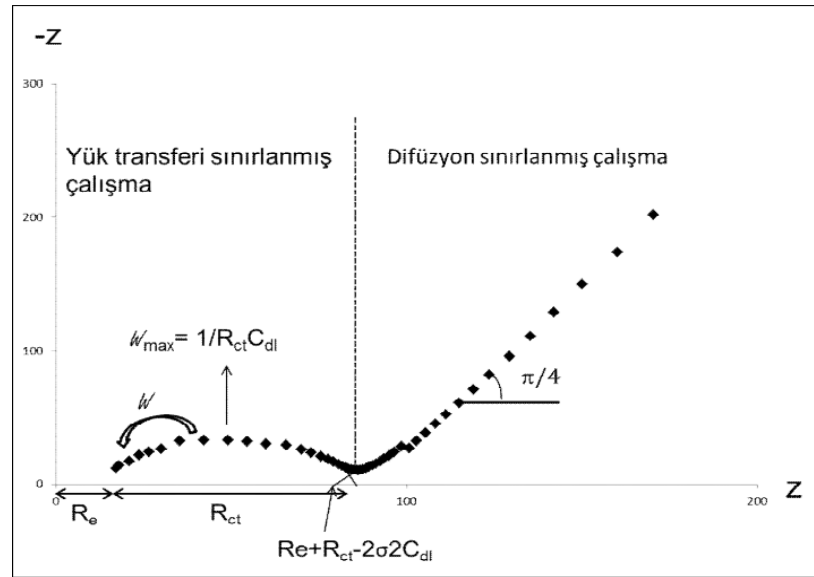
### **2.5.3. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)**

EIS voltammetriden sonra kullanılan etkin bir elektrokimyasal analiz yöntemidir. İmpedans spektroskopisi, elde edilen materyallerin birden fazla elektriksel özelliklerini ortaya çıkarmak için kullanılan sinüsoidal ve küçük genlikli sinyaller sağlayan bir tekniktir (Sun vd., 2010). Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), impedans spektroskopisinin, en önemli alt kategorilerinden bir tanesidir ve elektrokimyanın birden fazla alanında (elektrot kinetikleri, çift tabaka çalışmaları, piller, korozyon, katı hal elektrokimya ve biyoelektrokimya) çok fazla kullanılır. EIS, iletken ya da yarı iletken yüzeylerin kapasitans ya da direnç gibi ara yüzeyler hakkında bilgi sahibi olmak için yapılan araştırmalarda kullanılan çok etkili bir tekniktir.



Şekil 2.16. Farklı maddelerin EIS ölçümü sonucu elde edilen Nyquist eğrileri

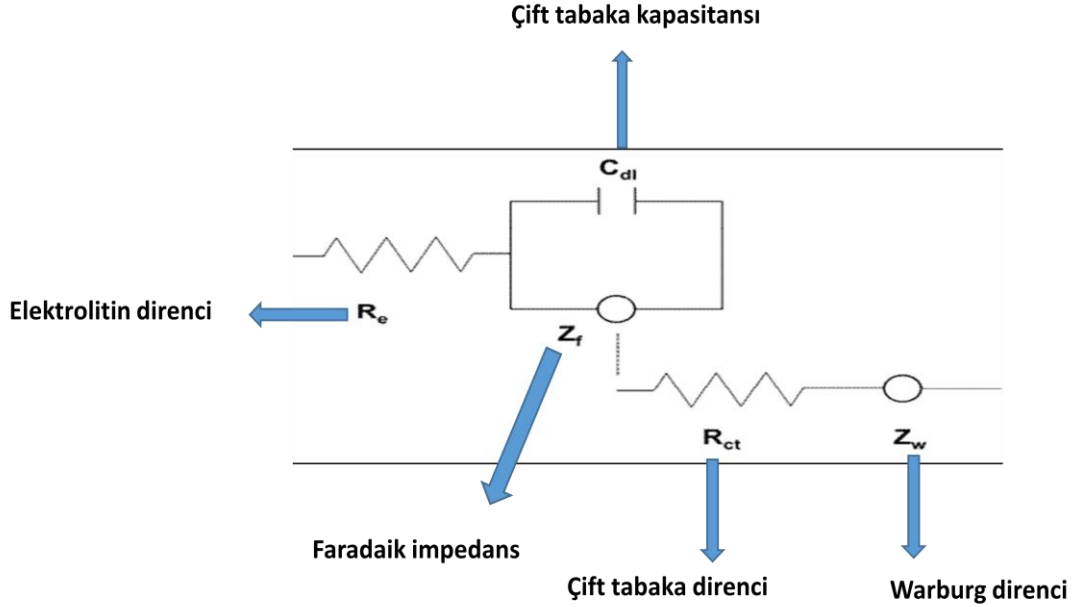
EIS herhangi bir uyarılmanın sahip olduğu frekansın bir fonksiyonu olarak sistemin impedansını ( $Z$ ) ölçer. Elektrokimyasal sistemler ile çalışıldığı zaman elde edilen yanıt uygulanan gerilim, faz ve genlikte meydana gelen farklardan oluşur. Uygulanan gerilimin ölçülen akıma oranı bir impedans sistemidir ( $Z = E / I$ ) ve geniş frekans aralığı boyunca kolaylıkla ölçülebilir. Elde edilen spektrum farklı frekans bölgelerinde baskın olan sistemde meydana gelen farklı kinetik çalışmalarını hakkında bilgi verir (Fernandez-Sanchez vd., 2005).



Şekil 2.17. Nyquist eğrisinde oluşan yarım dairelerin bileşenleri

EIS çalışmalarında yüksek frekanslarda Nyquist eğrisinde oluşan yarım daire elektron transferine karşı gösterilen direnci ifade eder ve yarım dairenin çapı elektron transfer direncine eşittir (Chen vd., 2008; Bonanni vd., 2012).

Randles hücresi, difüzyon varlığında tek adımlı faradayik işlemler içeren bir elektrokimyasal hücreyi tanımlayan basit eşdeğer hücredir.



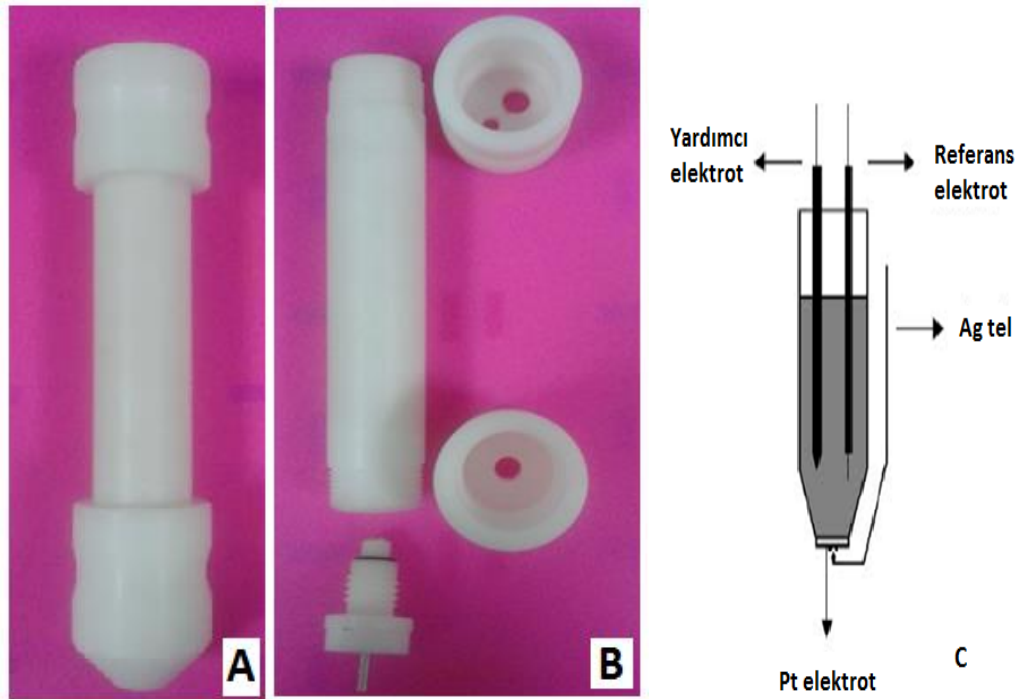
Şekil 2.18. Randles eşdeğer hücresi

Randles hücresi temel olarak başlıca referans ve çalışma elektrodu arasındaki elektrolit direnci ( $R_e$ ), çift tabaka kapasitansı ( $C_{dl}$ ) ve çalışma elektrodu-elektrolit ara yüzeyinde yük transferinden dolayı faradayik impedansı ( $Z_f$ ) birleştirir.  $Z_f$  de yük transfer direnci ( $R_{ct}$ ) ve elektrokimyasal hücrenin sahip olduğu toplam impedansda elektroaktif türlerin kütle taşınımının etkisini sınırlayan Warburg direnci ( $Z_w$ ) olmak üzere 2'ye ayrılır. Bundan dolayı difüzyonu sınırlandırılmış çalışmalarda  $Z_w$  baskın olur. Fakat yük transfer kontrollü çalışmalarda  $Z_f$  sadece  $R_{ct}$  olur. Bütün bu bileşenler geniş frekans aralığında bir elektrokimyasal hücre boyunca impedansda değişen çalışmalar ile tanımlanabilir (Fernandez-Sanchez vd., 2005).

EIS'de de voltammetride kullanılan elektrotlar kullanılmaktadır.

#### 2.5.4. Sentri-voltammetri

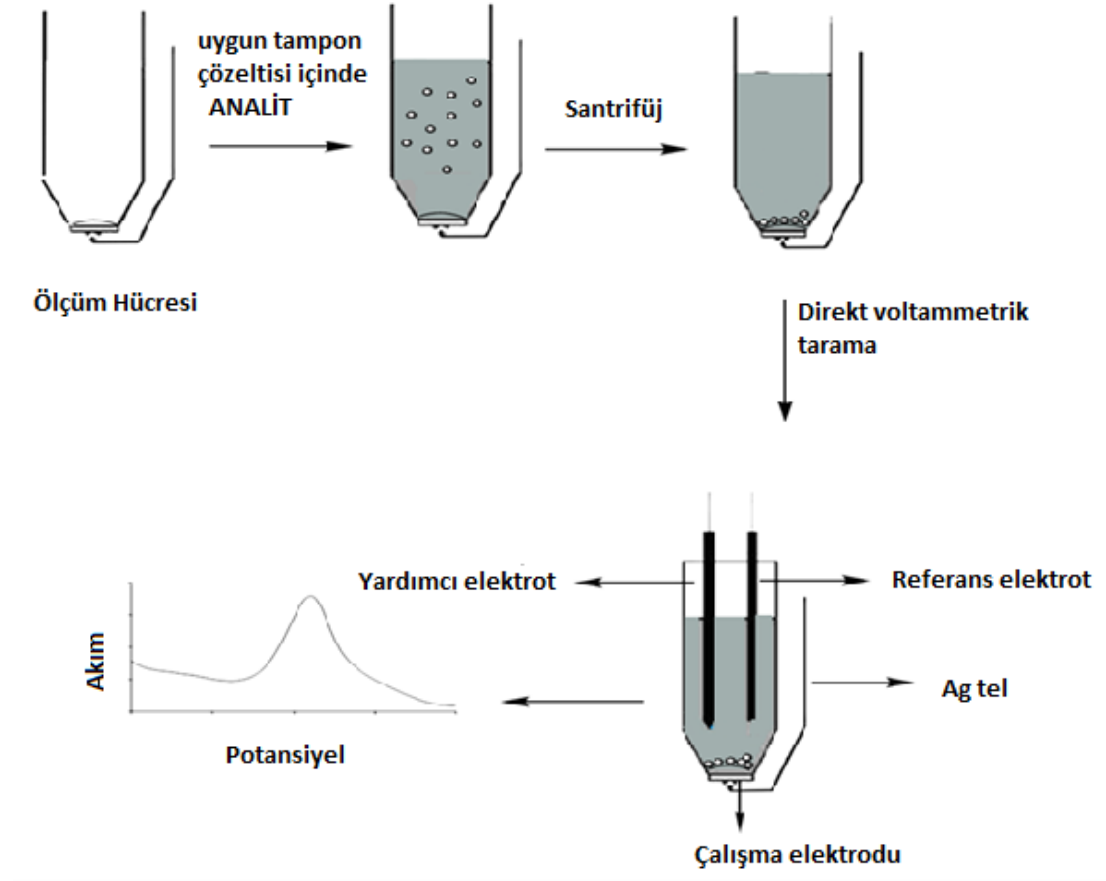
Sentri-voltammetri; santrifüj ve voltammetri yöntemlerinin birleşiminden oluşan bir yöntemdir. Bu yöntemde analit; santrifüj gücü ile elektrot yüzeyine toplanmaktadır. Daha sonra santrifüj işlemi durdurulur ve herhangi bir filtrasyon, dekantasyon veya ayırma işlemi gerekmeden voltammetrik tarama başlatılır. Sentri - voltammetride analitin büyük bir kısmı elektrot yüzeyinde ön deriştirildiğinden, diğer yöntemlere göre daha düşük LOD değerleri elde edilebilmektedir (Anık vd., 2004). Sentri - voltammetrik ölçümler, Şekil 2.19’da görülen özel tasarlanmış hücrelerde gerçekleştirilir.



Şekil 2.19. Sentri - voltammetrik hücrenin A) kapalı, B) açık hali, C) şematik gösterim

Sentri- voltammetrik yöntemle bir çok ağır metal ve biyolojik molekül belirleme çalışması başarı ile gerçekleştirilmiştir. Sentri-voltammetride hedeflenen analitlerin belirlenmesi için farklı taşıyıcılar kullanılmıştır. Bu taşıyıcılar sayesinde istenilen analitlerin sentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında kare şeklinde bulunan Pt elektrot üzerine önderiştirilmesi sağlanmıştır. Bu taşıyıcılardan biri  $Al(OH)_3$ 'dür. Santrifüj gücü ile elektrot yüzeyine ince bir tabaka halinde adsorbe olan  $Al(OH)_3$ ,

ağır metalleri de kendisi ile birlikte elektrot yüzeyine sürükleyerek ağır metalin elektrot yüzeyine önderiştirilmesi sağlamıştır. Bu çalışmadaki asıl amaç analit olarak seçilen kurşun iyonlarını birlikte çöktürmeyle  $Al(OH)_3$  ile elektrot arasında tuzaklamaktır (Kırgöz vd., 2004). Aynı çalışma, taşıyıcı materyal olarak Amberlite XAD-7 reçinesi kullanılarak da yapılmıştır (Kırgöz vd., 2005). Bu alanda yapılan diğer çalışmalar civa iyonları ve molibden iyonları belirlenmesidir (Ürkmez vd., 2009; Koçak ve Ertaş, 2013).



Şekil 2.20. Senti - voltammetri çalışmalarında izlenen yol

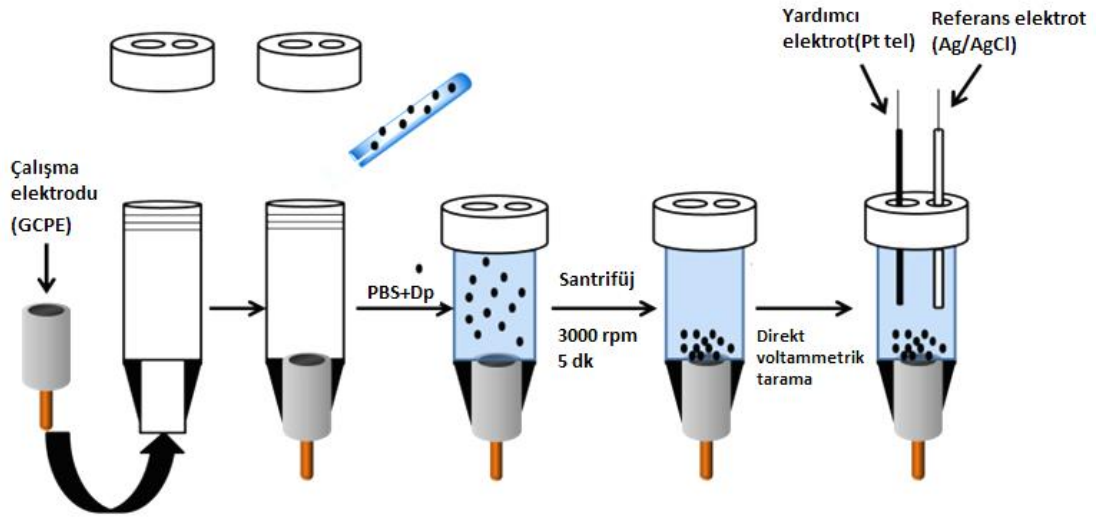
### 2.5.5. Biyosentri-voltammetri

Biyosentri-voltammetri, biyosensör ile sentri-voltammetri sistemlerinin birleştirilmesi ile elde edilen kombine bir ölçüm tekniğidir (Anık ve Çevik, 2011). Biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan çalışma elektrodu, uygun



biyolojik materyal ile modifiye edilerek elektrokimyasal biyosensör sistemi oluşturulur. Senti-voltammetride olduğu gibi tayin edilmek istenen analit, santrifüj kuvveti yardımı ile elektrot yüzeyinde önderiştirildikten sonra, herhangi bir ayırma ve filtrasyon işlemi uygulanmadan voltammetrik olarak tayin edilir (Çevik vd., 2012; Çevik vd., 2012; Çubukçu vd., 2013; Anık , 2013).

Bu yöntem kullanılarak ksantin belirlenmesi, asetilkolin esterase enzimi aktivite denemesi, asetilkolin ve kolin tayini, glutatyon ve dopamin (Şekil 2.21) belirlenmesi yapılmıştır. Biyosentri-voltammetrik (senti-biyovoltammetrik) yöntem ile biyolojik öneme sahip moleküllerin daha duyarlı belirlenmesi sağlanır (Anık, 2013).



Şekil 2.21. Biyosentri - voltammetrik yöntemle dopamin (Dp) belirlenmesi

Örneğin, elektrot üzerine XOD enziminin immobilizasyonundan sonra, ksantin analitini içeren tampon çözeltisi senti-voltammetri hücreğine aktarılmış ve santrifüj işlemi ile analit elektrot üzerine ön deriştirmiştir. Ardından voltammetrik ölçümler doğrudan yapılarak şarapta ksantin belirleme işlemi biyosentri-voltammetrik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Anık vd., 2011).

Elektrot yüzeyine asetil kolin esterase enzimi immobilizasyonu ile elde edilen biyosensörle asetil kolin, elektrot yüzeyine kolin oksidaz enzimi immobilizasyonu ile elde edilen biyosensör ile kolin belirlenmesi de biyosentri-voltammetri yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmalara birer örnektir (Çevik vd.,2012).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Voltammetrik ölçümler AUTOLAB PGSTAT 12, impedimetrik ölçümler ise FRA 2  $\mu$ -AUTOLAB Type III elektrokimyasal ölçüm sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Bilgisayar kontrollü olan AUTOLAB PGSTAT 12 ve FRA 2  $\mu$ - AUTOLAB Type III cihazının sinyalleri Nova 1.10 yazılımı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1.  $\mu$  - AUTOLAB TYPE III cihazı

Deneysel süresince kullanılan diğer cihazlar ve kullanım amaçları aşağıda belirtilmiştir;

- ❖ Kimyasal çözeltileri hazırlamak için katı kimyasalların tartımı amacı ile PRECISA XR 205SM-DR (Şekil 3.2.A) model hassas terazi kullanılmıştır.
- ❖ 25 °C’de pH 7 ve pH 7,5’da standart elektrot çözeltileriyle kalibre edilmiş ORION STAR SERIES (Şekil 3.2.B) model pH metre, pH ayarlaması yapmak amacı ile kullanılmıştır.



**Şekil 3.2. A. PRECİCA XR 205SM-DR model hassa terazi ve B. ORİON STAR SERIES marka pH metre**

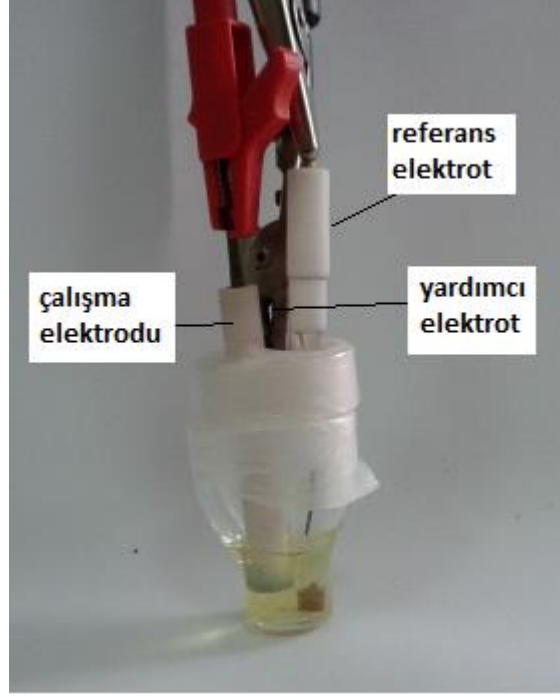
- ❖ Santrifüj işlemleri için SİGMA 3-16 PK model (seri no: 121 321, maksimum hız (rpm): 15 300, maksimum kapasite (mL): 1000: maksimum yer çekimsel alan (x g): 23 031, maksimum kinetik enerji (Nm): 9970, Rotor 19 776-H;1400 min<sup>-1</sup>, maksimum yükleme 6x80 g) santrifüj cihazları kullanılmıştır.



**Şekil 3.3. SİGMA 3-16 PK model santrifüj cihazı**

### 3.2. Kullanılan Elektrotlar

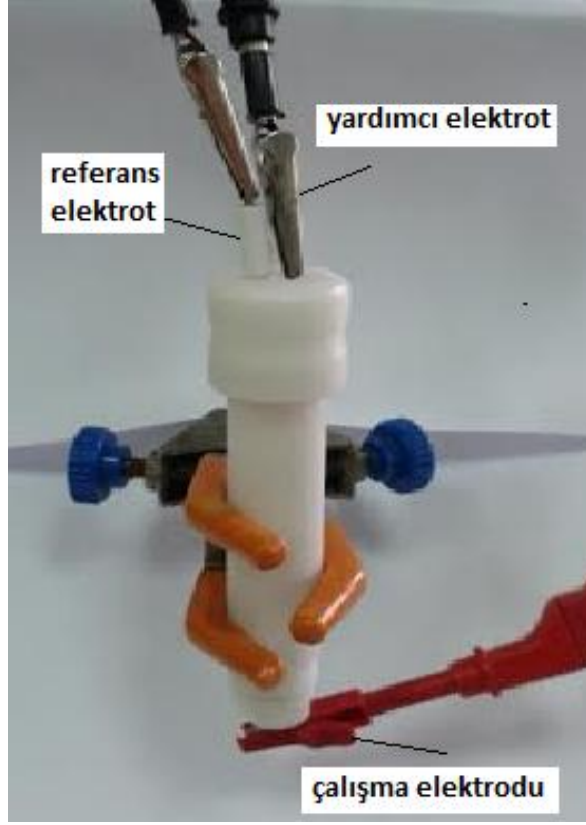
Deneyle, oda sıcaklığında Şekil 3.4'de görüldüğü gibi 1 ml' lik özel tasarlanmış hücrelerde Metrohm üçlü elektrot sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak GCPE, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve yardımcı elektrot olarak Pt elektrot kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Deneysel çalışmaların yapıldığı üçlü elektrot sistemine ait düzenek

Biyosentri-voltammetrik çalışmalar için santrifüj ve voltammetrik çalışmalara uygun olarak özel tasarlanmış hücre (Şekil 3.5) kullanılmıştır. Polietilen biyosentri-voltammetrik hücre 3 cm iç çapa sahiptir. Uzunluğu 11,5 cm'dir. Bu hücrenin alt tarafında 6 mm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip olan GCPE çalışma elektrodu bulunmaktadır.

Son olarak, floresans mikroskobu ile karakterizasyon aşamasında ITO yüzeyler ve yüzey baskılı karbon elektrotlar (cSPE; dropsens) kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Biyosentri - voltammetrik hücrede üçlü elektrot sistemi

### 3.3. Kullanılan Reaktifler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıktadır ve tüm çözeltiler saf su ile hazırlanmıştır. Model hücre olarak kullanılan HeLa (rahim ağzı kanser hücresi) ve A549 (Akciğer karsinom hücresi) kontrol hücreleri Ege Üniversitesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Elektrot modifikasyonu aşamasında yapılan bütün ölçümlerde pH: 7.4 50 mM potasyum ferrisiyanit ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ , %99.99 saflıkta, Sigma-Aldrich) içeren PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , %99.995 saflıkta, Merck) kullanılmıştır. Fosfat tamponu 0.1 M potasyum klorür (KCl Sigma-Aldrich) içermektedir. Çözeltilerin pH ayarlanmasında 1 M sodyum hidroksit (NaOH, %97 saflıkta, Merck) çözeltisinden yararlanılmıştır. Camımsı karbon pasta elektrot, camımsı karbon mikropartikül (GC, %99.95 saflıkta, 2-12 mikron, Sigma-Aldrich) ve mineral yağ (Sigma-Aldrich) ile hazırlanmıştır. Elektrot

modifikasyonu amacı ile kloroaurik asit ( $\text{HAuCl}_4$ , 99% saflıkta, Sigma-Aldrich), sisteamin (Cys, Fluka), gluteraldehit (Glu, Sigma-Aldrich), poliamidoamin (PAMAM, 25% saflıkta, Sigma-Aldrich) ve folik asit (FA, 97% saflıkta, Sigma-Aldrich) kimyasalları kullanılmıştır. Altın nanopartikül çözeltisi hazırlamak için sülfirik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95-97% saflıkta, Fluka), sodyum nitrat ( $\text{NaNO}_3$ , Sigma-Aldrich) ve sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 99% saflıkta, Sigma-Aldrich) kimyasalları kullanılırken; folik asit çözeltisi hazırlamak için EDC (Sigma-Aldrich) ve NHS (Sigma-Aldrich) içeren MES monohidrat (Sigma-Aldrich) çözeltisi kullanılmıştır. Hedef hücrelerini ve kontrol hücrelerini besiyeri ortamından fosfat tamponu ortamına alırken; tuzlu ortam sağlamak için sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ , Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Son olarak, floresans mikroskopunda hücre çekirdeklerini görüntüleyebilmek amacı ile 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

### **3.3.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

#### *3.3.1.1. Destek elektrolit çözeltisinin hazırlanması*

Destek elektrolit olarak 50 mM PBS tamponu,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'den gerekli miktarda tartım alınıp çözelti hacmi 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Destek elektrolite yeteri kadar NaOH ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır. Elektrot modifikasyonu aşamasında destek elektrot içine son derişimi 50 mM olacak şekilde  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$  eklenmiştir.

#### *3.3.1.2. MES tamponunun hazırlanması*

Folik asit çözeltisi hazırlanırken 25 mM pH: 6 MES tamponu kullanılmıştır. MES tamponu, MES monohidrat katısından uygun miktarda tartım alınıp çözelti hacmi 50 ml olacak şekilde distile su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti pH'sı NaOH ilavesi ile ayarlanmıştır.

### 3.3.1.3. Altın çözeltilisinin hazırlanması

Elektrot modifikasyonunda kullanılmak üzere altın çözeltisi hazırlanırken; 5 ml'de son derişimleri 1 mM H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>, 0.01 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0.1 M NaNO<sub>3</sub> olacak şekilde katı kimyasallardan gerekli miktarda tartım alınmıştır. Yine son derişimi 0.01 M olacak şekilde sülfirik asitten uygun hacimde alınıp çözelti 5 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Çözelti her defasında taze olarak hazırlanmış, ışık ve havayla etkileşimi önlenmiştir.

### 3.3.1.4. Sisteamin çözeltilisinin hazırlanması

Elektrot modifikasyonu için 100 mM 1 mL sisteamin çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti, gerekli miktarda sisteamin katısından tartılıp üzerine çözelti hacmi 1 mL olacak şekilde distile su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti her defasında taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

### 3.3.1.5. Gluteraldehit çözeltilisinin hazırlanması

Elektrot modifikasyonu için % 5'lik 500 µL gluteraldehit çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti, gerekli hacimde gluteraldehit sıvısı üzerine çözelti hacmi 500 µL olacak şekilde 50mM PBS eklenmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti her defasında taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

### 3.3.1.6. PAMAM çözeltilisinin hazırlanması

Elektrot modifikasyonu için % 1'lik 500 µL PAMAM çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti, son derişimi % 1 lik olacak şekilde uygun hacimde PAMAM sıvısından alınıp üzerine çözelti hacmi 500 µL olacak şekilde 50 mM PBS eklenmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti her defasında taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

### *3.3.1.7. Folik asit çözeltisinin hazırlanması*

Elektrot modifikasyonu için 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM ve 50 mM folik asit çözeltileri kullanılmıştır. İstenilen derişme uygun şekilde folik asit katısından ve son derişimi 50 mM olacak şekilde EDC ve NHS katılarından tartılarak üzeri çözelti hacmi 1 mL olacak şekilde MES tamponu ile tamamlanır.

### *3.3.1.8. Analit çözeltisinin hazırlanması*

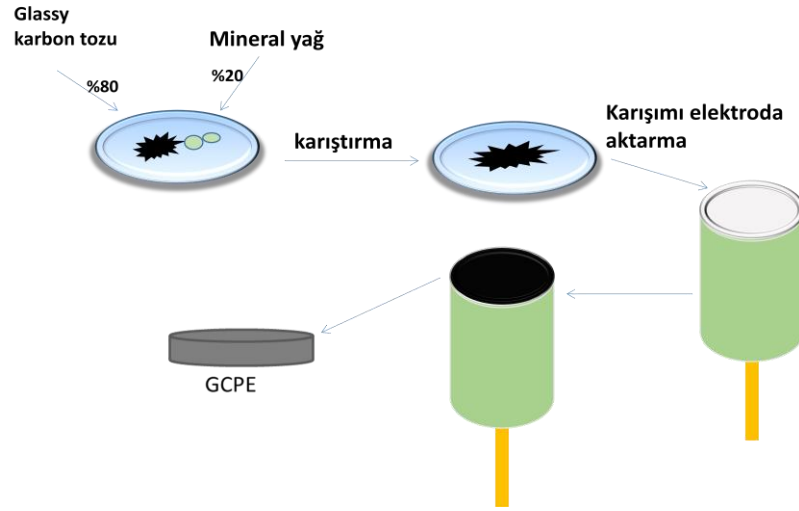
Besiyeri ortamında bulunan HeLa kanser hücreleri ve kontrol hücreleri, santrifüj işlemi ile besiyerinden ayrılmış ve pH: 7.4, 100 mM tuz içeren 50 mM PBS ortamına istenilen derişimde eklenmiştir. Tuzlu PBS çözeltisini hazırlamak için,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'den ve NaCl'den gerekli miktarda tartım alınıp çözelti hacmi 50 mL olacak şekilde distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Çözeltiye NaOH ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır.

## **3.3.2. Sitosensörün fabrikasyonu**

### *3.3.2.1. Yalın GCPE'un hazırlanması*

Şekil 3.6'da belirtildiği gibi, %80 grafit tozu ve %20 mineral yağ saat camı üzerinde bir spatül yardımı ile karıştırılarak teflon elektrot içerisindeki 2 mm yarıçaplı boşluğa yerleştirilmiştir ve yalın GCPE elde edilmiştir. Elektrodun elektriksel bağlantısını sağlamak için bakır tel kullanılmıştır.

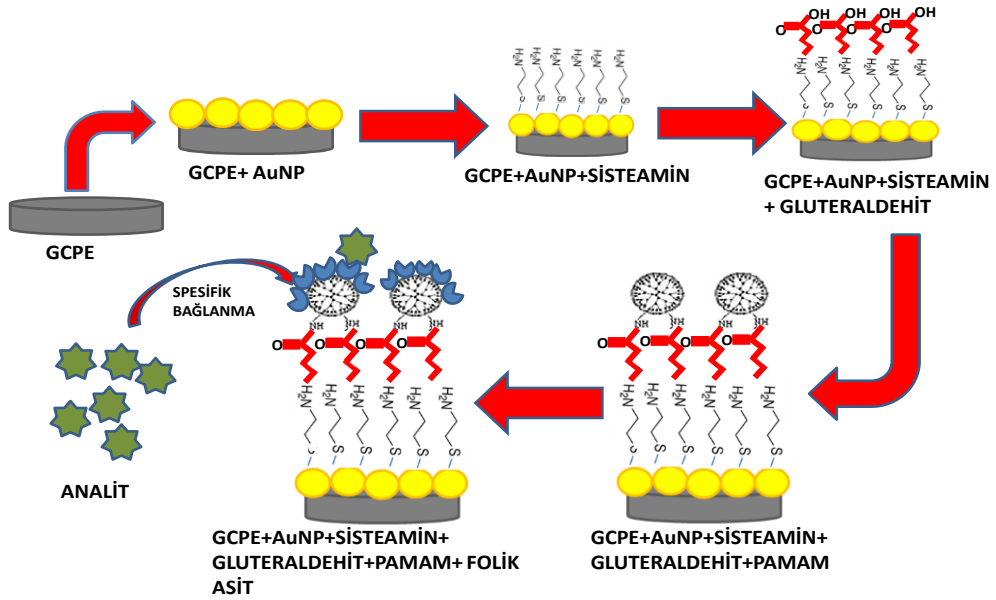




Şekil 3.6. Yalın GCPE'nin hazırlanması

### 3.3.2.2. Yalın GCPE'nun modifiye edilmesi ve sitosensörün oluşturulması

Şekil 3.7'de şematik olarak gösterildiği gibi yalın GCPE çeşitli kimyasallar kullanılarak modifiye edilmiştir ve son olarak spesifik yüzeyin oluşturulması ile seçimli olarak HeLa belirlemesi yapabilen bir sitosensör oluşturulmuştur.



Şekil 3.7. Sitosensör modifikasyonunun şematik gösterimi

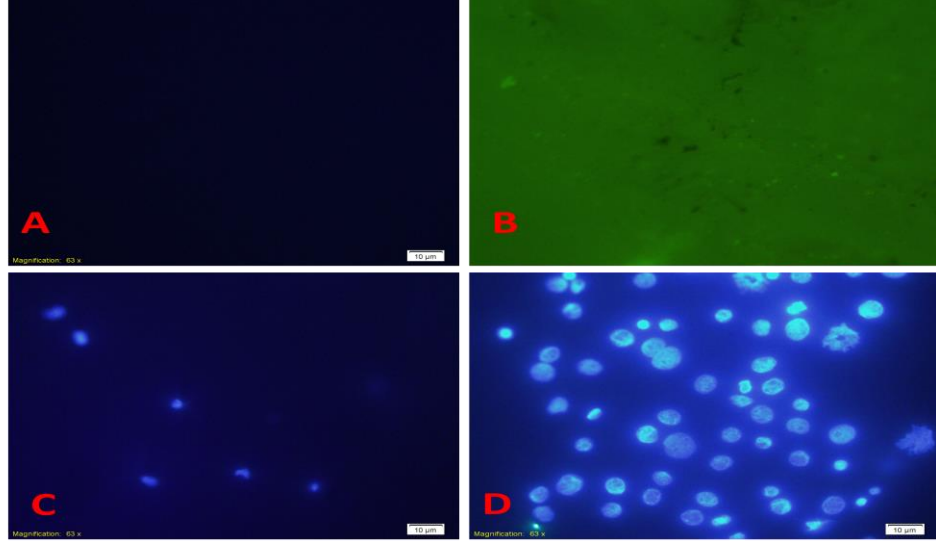
Modifikasyon aşamaları aşağıda ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

- ❖ İlk olarak Şekil 4.3'de gösterildiği gibi yalın GCPE'nin yüzeyi elektrokimyasal olarak Aunp ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi +1.2V'dan -0.3V'a, 0.05 v/s tarama hızında, 5 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Altın kaplanan elektrot 100 mM sisteamin çözeltisine daldırılarak 1 saat beklenmiş ve sisteaminin -SH uçlarından altın yüzeye bağlanması sağlanmış ardından bidistile ile yıkama yapılmıştır.
- ❖ Sisteamin ile muamele edilmiş altın kaplı GCPE, %5'lik gluteraldehit reaktif çözeltisine daldırılarak 30 dk bekletilmiştir ve PBS ile yıkama yapılmıştır.
- ❖ Sonraki aşamada elektrot, elektrik iletkenliği iyi bir polimer olan PAMAM ile muamele edilmiştir. Elektrot yüzeyine, % 1 lik PAMAM çözeltisinden 35 µL damlatılarak 1 saat beklenmiştir ve PBS ile yıkama yapılmıştır.
- ❖ HeLa kanser hücrelerine spesifik bir sitosensör elde etmek amacı ile elektrot modifikasyonunun son aşamasında, elektrot yüzeyine folik asit immobilize edilmiştir. Elektrot üzerine, 25 mM folik asit (50 mM EDC ve 50 mM NHS içeren) çözeltisinden 35 µl damlatılarak 30 dk beklenmiştir. Böylece sitosensörün aktif yüzeyine folik asit tutturulmuştur aşırı reaktif PBS ile ortamdan uzaklaştırılmıştır.

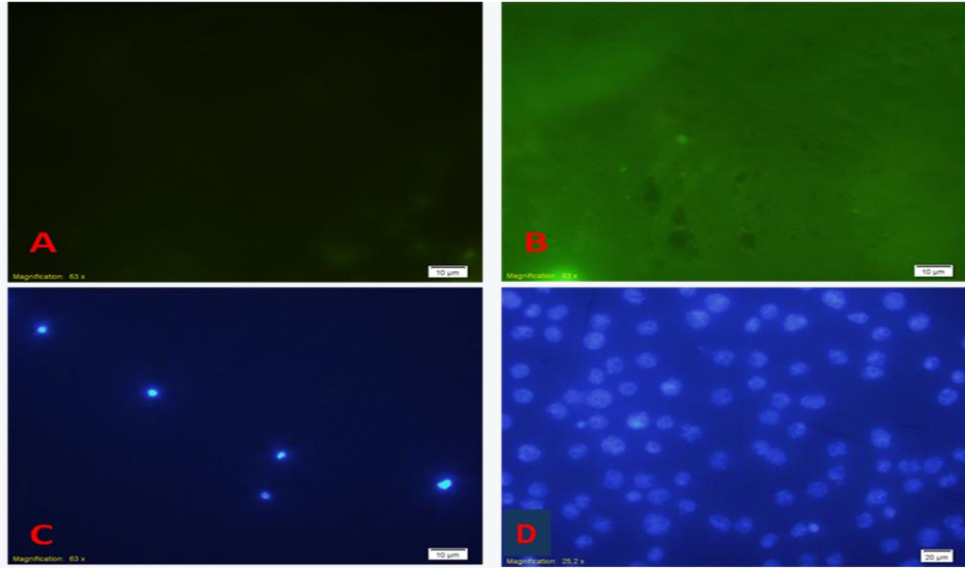
## 4. SONUÇ

### 4.1. Elektrokimyasal Sitosensörün Fabrikasyon Aşamalarının Floresans Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Geliştirilen sitosensörün modifikasyon aşamalarını karakterize etmek ve seçimliliğini kanıtlamak amacıyla floresans mikroskobu kullanılarak görüntüler alınmıştır. Sağlıklı görüntüler elde edebilmek için sert ve düz bir yüzeye ihtiyaç olduğundan bu aşamada ITO yüzey ve cSPE'lar kullanılmıştır. HeLa spesifik sitosensör oluşturmak için GCPE üzerine yapılan tüm modifikasyonlar aşamaları aynı şekilde cSPE ve ITO yüzeylere de uygulanmıştır. Modifiye edilen elektrotlar aynı derişimdeki ( $5 \times 10^4$  hücre/ml) HeLa ve A549 kontrol hücreleri ile prosedürde belirtildiği gibi inkübe edilmiştir. Hücrelerle inkübasyon aşamasından sonra yüzeydeki fazlalıklar PBS tamponu ile yıkanarak giderilmiş ve ardından elektrot yüzeyi DAPI ile boyanarak hücrelerin çekirdekleri floresans mikroskobunda görünür hale getirilmiştir. Son olarak görüntüleme işlemi yapılarak Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'deki görüntüler elde edilmiştir.



**Şekil 4.1. Floresans mikroskop ile A. ITO boş yüzey, B. Folik A./PAMAM/Glu/Cys/Aunp/ITO, C. A549 /Folik A./PAMAM/Glu/Cys/Aunp/ITO ve D. HeLa/ Folik A./PAMAM/Glu/Cys/Aunp/ITO görüntüsü**



**Şekil 4.2. Floresans mikroskop ile A. Karbon yüzey baskılı elektrot (cSPE) boş yüzey, B. Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ cSPE, C. A549 /Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ cSPE ve D. HeLa/ Folik A./PAMAM/Glu/Cys/ Aunp/ cSPE görüntüsü**

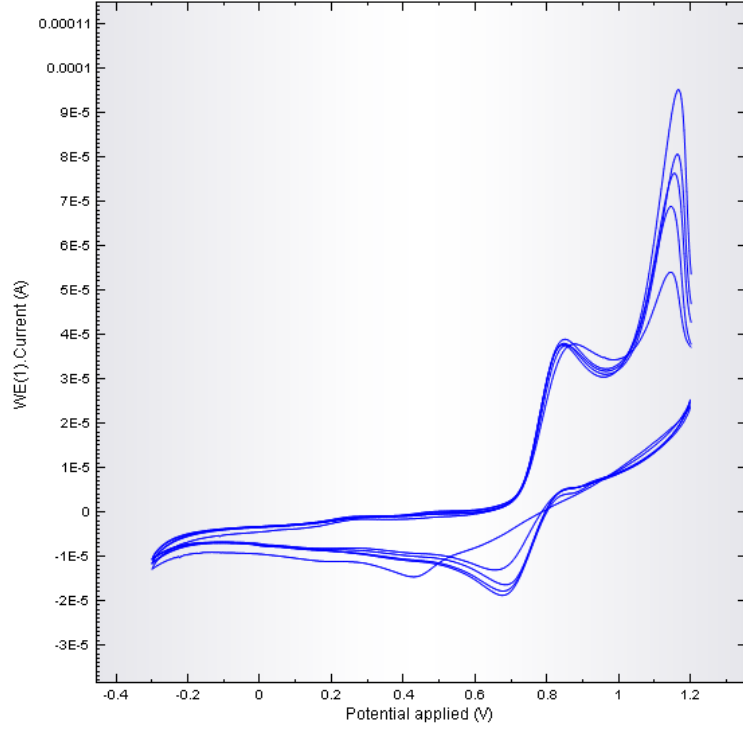
Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de görüldüğü gibi A’da henüz hiçbir modifikasyon olmadığından herhangi bir floresans yoktur ve görüntü elde edilememiştir. B’ de ise ITO yüzey ve cSPE üzerine sırası ile Aunp/Cys/Glu/PAMAM ve FA modifiye

edildiğinden, Aunp'lerin kuvvetli floresans özellikleri sayesinde üzerinde bir çok tabaka bulunmasına rağmen görüntü elde edilebilmiştir. C'de A549 hücrelerinin DAPI ile boyanmış çekirdekleri belirgin bir şekilde floresans vermiş ve çok az sayıda hücrenin sitosensör yüzeyine tutunduğu gözlenmiştir. D'de ise HeLa hücrelerinin DAPI ile boyanmış çekirdeklerinin floresansı ile elde edilen görüntüden sitosensör yüzeyinin nerdeyse tamamının HeLa ile kaplı olduğu anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, geliştirilen sitosensörün HeLa rahim ağzı kanser hücreleri için yüksek oranda seçimli olduğunu söylemek mümkündür.

## **4.2. Elektrokimyasal Sitosensörün Fabrikasyon Aşamalarının Elektrokimyasal Karakterizasyonu**

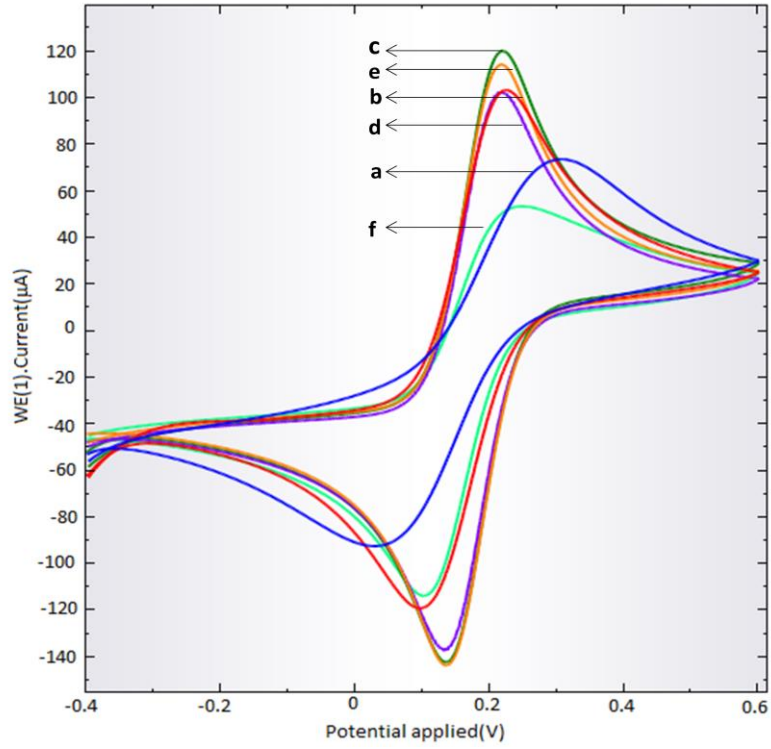
### **4.2.1. CV ile elektrokimyasal sitosensörün karakterizasyonu**

Yalın GCPE ve modifikasyon basamaklarının CV ölçümleri 50 mM  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  içeren 50 mM PBS pH: 7 içerisinde 0.6 V'dan -0.4 V'a, 50 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'de ilk aşama olan GCPE yüzeyine elektrokimyasal olarak Aunp kaplanması gösterilmektedir. Bu işlem 1.2 V'dan -0.3 V'a, 0.05 v/s tarama hızında ve 5 döngüde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4'den de açıkça görülebileceği gibi GCPE üzerine Aunp kaplandıkça akım değeri artmaktadır. Akım değerindeki bu artış Aunp'lerin iletken olmalarından kaynaklanmaktadır (Şekil 4.4.b).



**Şekil 4.3. GCPE üzerine elektrokimyasal yöntemle Aunp kaplanmasını gösteren voltammogram.**

İkinci basamakta sistemin altın nanotaneçiklere –SH uçlarından bağlanmış ve akım değerini daha da arttırmıştır (Şekil 4.4.c). Gluteraldehit; çapraz bağlayıcısının yüzeye bağlanması ile elektrot yüzeyinde yalıtkan bir tabaka oluşmuştur ve akım değerinde düşme meydana gelmiştir (Şekil 4.4.d). PAMAM iletken polimerinin yüzeye immobilizasyonu ile, elektron akışı bir nebze kolaylaşmış ve akım değeri tekrar yükseliş göstermiştir (Şekil 4.4.e). Son basamakta PAMAM'ların üzeri folik asit ile kaplandığından akım değeri tekrar azalmıştır (Şekil 4.4.f).

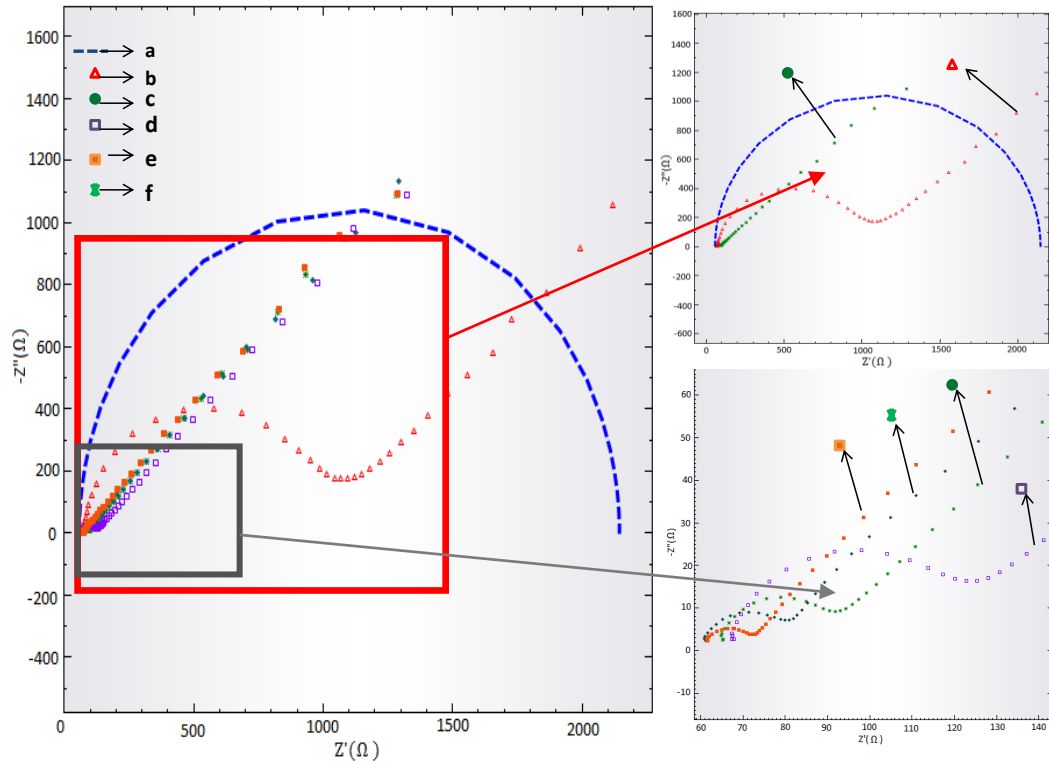


**Şekil 4.4. CV ile modifiye elektrodun her tabakasının karakterizasyonu. a; GCPE, b; Aunp/GCPE, c; Cys/Aunp/GCPE, d; Glu/Cys/Aunp/GCPE, e; PAMAM/Glu/Aunp/GCPE, f; Folik A./PAMAM/Glu/Cys/Aunp/GCPE. Karakterizasyon aşamasındaki tüm ölçümler 50 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$  50mM pH:7 PBS'de gerçekleştirilmiştir.**

#### 4.2.2. EIS ile elektrokimyasal sitosensörün karakterizasyonu

EIS, yüzey modifikasyonundan sonra elektrot üzerindeki elektrokimyasal iletim prosesini aydınlatmak açısından etkili bir yöntemdir (Anık ve Çubukçu, 2008). Bu çalışmada, impedans ölçümleri  $10^{-2}$  ile  $10^5$  Hz frekans aralığında 0.179 V potansiyelde, 5 mV alternatif gerilim uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5'de de gösterildiği gibi, daha yüksek potansiyellere gidildikçe impedans spektrumu bir yarıçember kısmı oluşturmaktadır. Yarıçember zorlaşan elektron transferini ifade etmektedir. Yarıçember yarıçapı ise ara yüzey elektron transfer direncini gösterir (Ret). Şekil 4.5'den yalnız GCPE'nin en büyük yarıçembere sahip olduğu dolayısı ile direncinin en büyük olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.5.a). GCPE'nin üzerine Aunp kaplandığında, Aunp'nin iletkenliği artırması ile yarı çember aniden küçülmüştür.

Bu durum Aunp'lerin elektron transferi üzerinde etkili olduğunun kanıtıdır (Şekil 4.5.b). Sisteminin elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile CV voltammogramında da görüldüğü gibi akım değeri artmıştır. Bu akım artışı EIS ölçümünde yarı çemberin küçülmesi şeklinde görülmektedir (Şekil 4.5.c). Gluteraldehit ile kimyasal bağlar güçlendirilirken, elektrot yüzeyine bir katman daha oluşturulduğundan elektron akışı zorlaşmış ve direnç artarak yarı çember büyümüşür (Şekil 4.5.d). İletken yapıya sahip PAMAM da Aunp ile aynı etkiyi göstererek elektron akışını kolaylaştırmış ve yarı çember küçülmüştür (Şekil 4.5.e). Son modifikasyon basamağı olan folik asit immobilizasyonu ile PAMAM'ın yüzey kaplandığından direnç artmış ve yarı çember büyümüşür (Şekil 4.5.f).



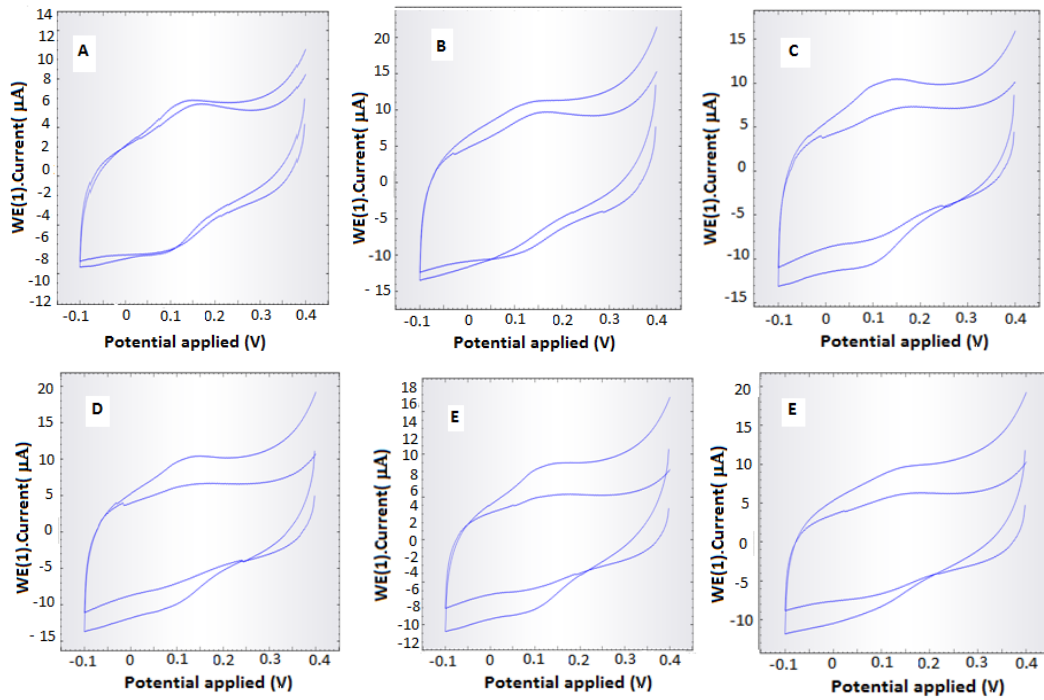
**Şekil 4.5.** EIS tekniği kullanılarak 0.179 V çalışma potansiyelinde,  $10^{-2}$ Hz ile  $10^5$ Hz frekans aralığında ve 5 mV alternatif gerilim uygulanarak modifiye elektrodun karakterizasyonu. a; GCPE, b; Aunp/GCPE, c; Cys/Aunp/GCPE d; Glu/Cys/Aunp/GCPE, e; PAMAM/Glu/Cys/, f; Folik A.,PAMAM/Glu/Cys/. Karakterizasyon aşamasındaki tüm ölçümler 50 mM  $Fe(CN)_6^{3/4}$  içeren 50 mM pH:7 PBS'de gerçekleştirilmiştir.



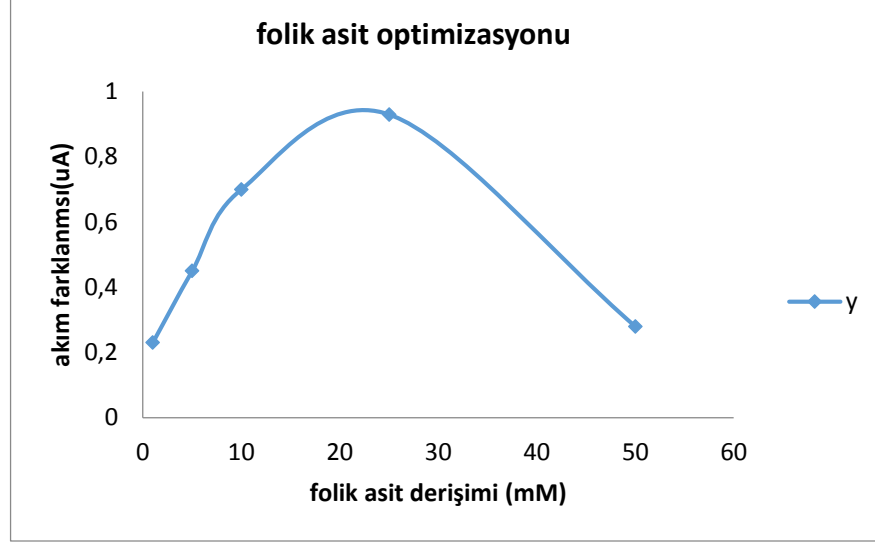
### 4.3. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

#### 4.3.1. Folik asit derişimi optimizasyonu

Sitosensör fabrikasyonunda kullanılması gereken optimum folik asit miktarını saptamak için; 1 mM, 3mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM ve 50 mM derişimde folik asit içeren sitosensörler hazırlanıp,  $5 \times 10^4$  hücre/mL içeren çözelti ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon süresinde HeLa belirlenmesindeki performanslarına bakılmıştır. Sonuç olarak, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi akım farklanmaları sırası ile  $0.23 \mu\text{A}$ ,  $0.32 \mu\text{A}$ ,  $0.45 \mu\text{A}$ ,  $0.70 \mu\text{A}$ ,  $0.93 \mu\text{A}$  ve  $0.28 \mu\text{A}$  olarak gözlenmiştir ve elde edilen akım farklanmaları kullanılarak çizilen optimizasyon grafiğinden en iyi akım farklanmasının 25 mM folik asit içeren sitosensörden elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.6.E; Şekil 4.7).



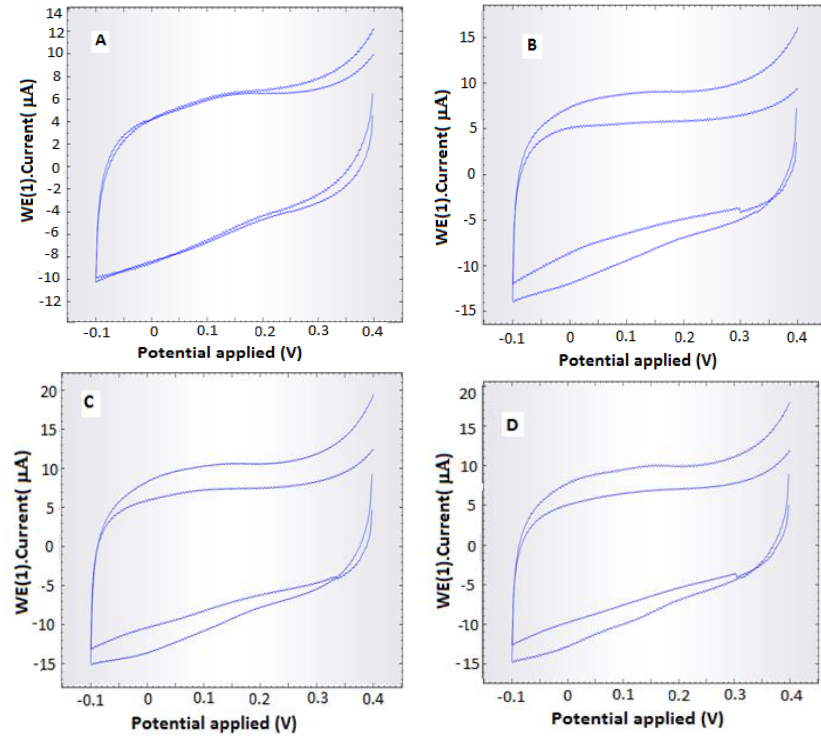
Şekil 4.6. A: 1 mM, B: 3 mM, C: 5 mM, D: 10 mM, E: 25 mM ve F: 50 mM derişimde folik asit içeren sitosensörler ile  $5 \times 10^4$  hücre/ml içeren HeLa çözeltisi kullanılarak 1 saat inkübasyon süresinde bu sitosensörlerin performanslarını gösteren voltammogramlar. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir.



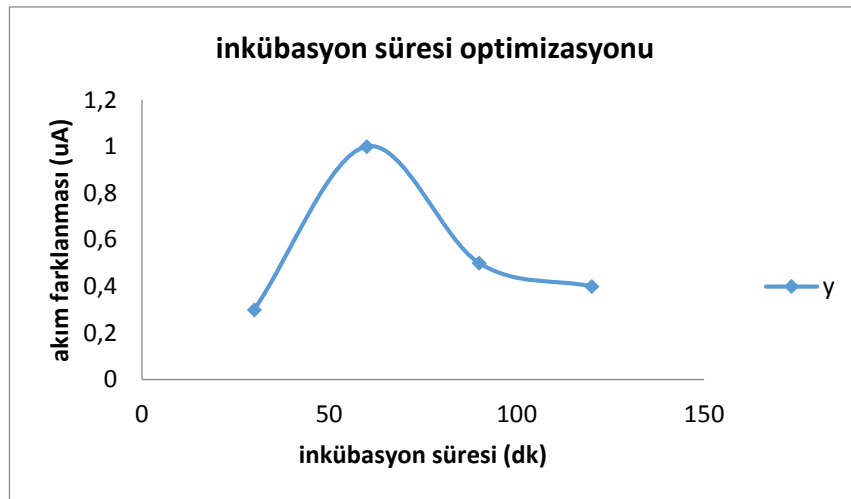
Şekil 4.7. Folik asidin optimizasyon grafiği

#### 4.3.2. İnkübasyon süresi optimizasyonu

Sitosensör ile HeLa kanser hücrelerinin optimum etkileşim süresini saptamak için,  $5 \times 10^4$  hücre/mL derişimdeki hücre çözeltisi ile 25 mM folik asit içeren sitosensörler 30, 60, 90 ve 120 dk oda sıcaklığında etkileşime maruz bırakılmış ve her bir süre için akımdaki farklanmaları kaydedilmiştir. Sonuç olarak, Şekil 4.8'de görüldüğü gibi sırası ile 0.3 µA, 1.0 µA, 0.5 µA ve 0.4 µA akım farklanmaları elde edilmiş ve bu akım farklanmaları kullanılarak oluşturulan optimizasyon grafiğinden optimum inkübasyon süresinin 60 dk olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8.B; Şekil 4.9).



Şekil 4.8. 25 mM folik asit içeren cytosensörler ile  $5 \times 10^4$  hücre/ml içeren HeLa çözeltisinin A: 30, B: 60, C: 90 ve D: 120 dk inkübe edildikten sonra bu sitosensörlerin performanslarını gösteren voltammogramlar. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS’de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V’dan -0.1 V’a, tarama hızı 0.05 v/s dir.

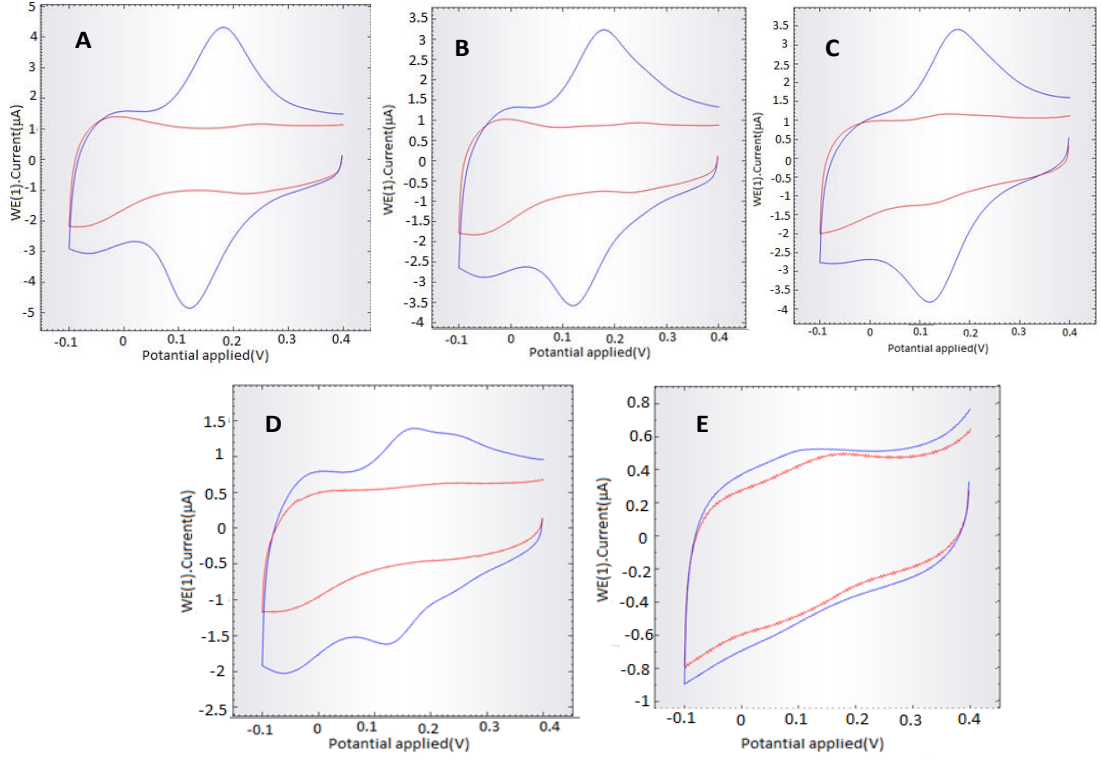


Şekil 4.9. İnkübasyon süresi optimizasyon grafiği

#### **4.4. Analitiksel Karakteristik**

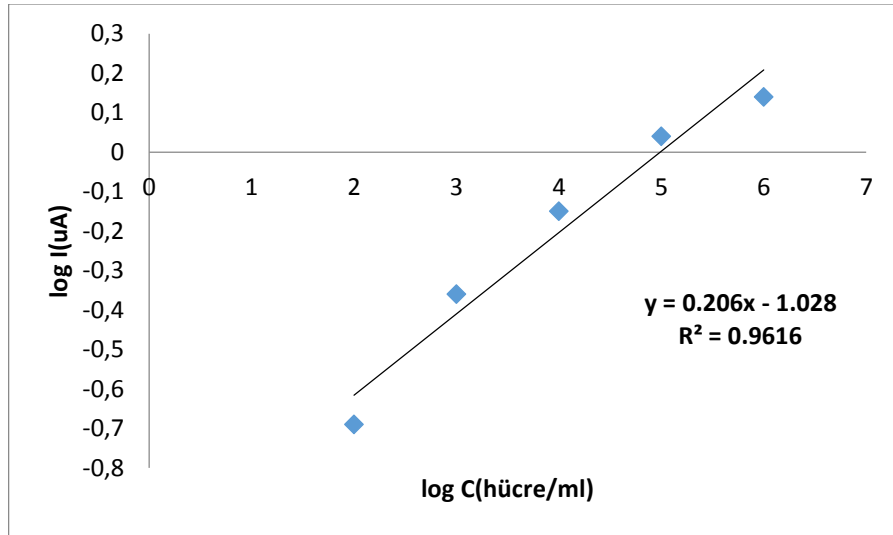
##### **4.4.1. Doğrudan voltammetrik yöntemle kanser hücrelerinin tayini**

Elektrokimyasal sitosensörün fabrikasyon aşamalarının mikroskopik ve elektrokimyasal karakterizasyonundan sonra çalışma koşulları optimize edilmiştir. Daha sonra optimum çalışma koşullarında geliştirilen sitosensörün analitiksel karakteristikleri belirlenmiştir. Bu amaçla Şekil 4.10'da görüldüğü gibi  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  ve  $10^2$  hücre/mL derişimindeki HeLa hücreleri ile CV ölçümleri gerçekleştirilmiş ve HeLa kanser hücresi sayısı azaldıkça akım farklanmasında doğrusal bir azalış meydana gelmiştir. Akım farklanmaları sırası ile  $1.4 \mu\text{A}$ ,  $1.1 \mu\text{A}$ ,  $0.7 \mu\text{A}$ ,  $0.4 \mu\text{A}$ , ve  $0.2 \mu\text{A}$  olarak kaydedilmiştir. Hücre sayısı ile akım farklanması arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanarak Şekil 4.11'deki kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Sonuç olarak; sitosensörün HeLa kanser hücresini belirleyebildiğı doğrusal aralık  $10^2 - 10^6$  hücre/mL olarak saptanmıştır. LOD değeri  $100$  hücre/mL ve RSD değeri  $5 \times 10^4$  HeLa hücreleri ( $n=3$ ) için  $1.55 \%$  olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. Hücre sayısı ile akım farklanması arasındaki ilişkiyi gösteren CV voltammogramları.

Hücre miktarları, (A)  $10^6$ , (B)  $10^5$ , (C)  $10^4$ , (D)  $10^3$  (E)  $10^2$  hücre/mL şeklindedir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir.



Şekil 4.11.  $10^2$ - $10^6$  hücre/mL aralığında yapılan ölçüm verileri ile elde edilen kalibrasyon grafiği

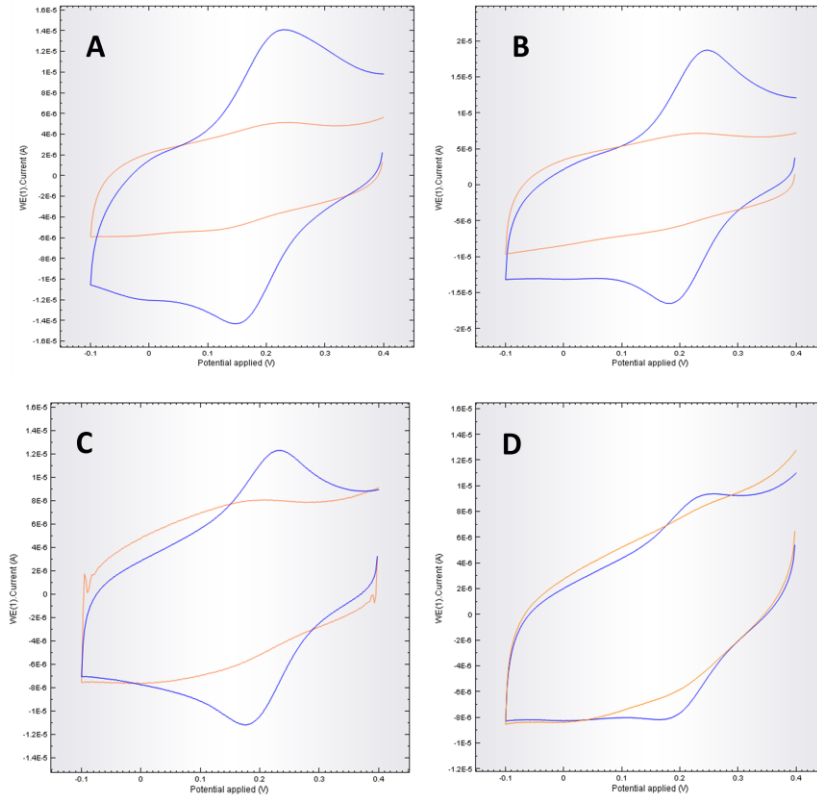
#### **4.4.2. Sentri voltammetrik yöntemle kanser hücrelerinin tayini: sitosentri-voltammetri**

Yukarıdaki bölümlerde daha önce bahsedildiği gibi, sentri-voltammetri bugüne dek ağır metal tayini ve biyolojik molekül tayinine uygulanmıştır. Ardından geliştirilen biyosentri-voltammetri, enzim temelli biyosensör sistemlerinin sentri-voltammetriye uyarlanmasını içermektedir. Bu tez kapsamında ilk kez, kanser hücreleri sentri-voltammetri ile belirlenmiş, bunun sonunda sitosentri-voltammetri yöntemi geliştirilmiştir. Sentri-voltammetri santrifüj işlemi içerdiğinden, sitosentri-voltammetrik tayinde santrifüj parametreleri olan santrifüj hızı ve santrifüj süresi öncelikle optimize edilmiştir.

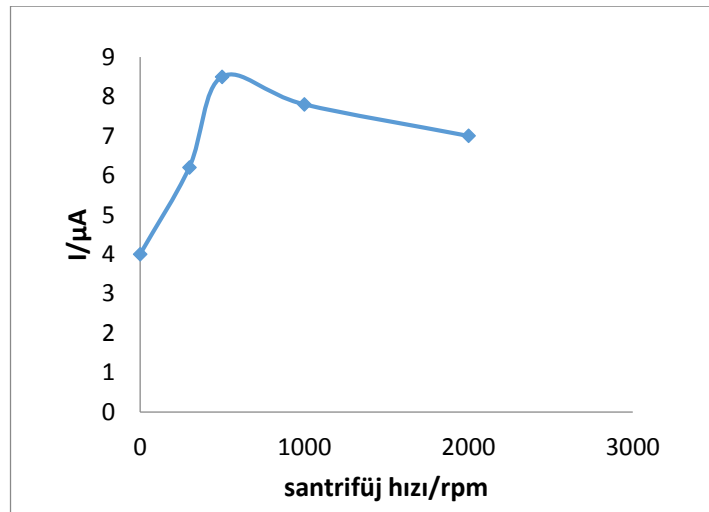
##### *4.4.2.1. Santrifüj hızı optimizasyonu*

Biyosentri-voltammetrik uygulamalarda santrifüj parametreleri, analitin ön deriştirilmesini etkilediğinden önemli bir yere sahiptir ve biyosentri-voltammetrik yöntemin duyarlılığını etkiler (Anık, 2013). Bu nedenle öncelikle santrifüj hızının akım yanıtlarına etkisi incelenmiştir. Kanser hücresi belirlenmesi 0, 300, 500, 1000 ve 2000 rpm santrifüj hızlarında  $5 \times 10^4$  hücre/mL HeLa hücresi içeren çözelti için 1 dk santrifüj süresinde gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.12'de görüldüğü gibi akım farklanmaları sırasıyla 4  $\mu$ A, 6.2  $\mu$ A, 8.5  $\mu$ A, 7.8  $\mu$ A ve 7.2  $\mu$ A olarak kaydedilmiştir. Akım farklanması değerlerinden yararlanılarak optimizasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.13)

Santrifüj hızı arttıkça akım değerlerinde artışın olması konveksiyondaki artış ile daha fazla analitin elektrot yüzeyinde toplanmasına bağlanabilir. Yüksek santrifüj hızlarında daha iyi akım değerleri elde edilebilirdi ancak yüksek santrifüj hızlarında biyosentri-voltammetrik hücrede bozulmalar meydana gelebileceğinden 500 rpm optimum değer olarak seçilmiştir ve çalışmalarda bu değer kullanılmıştır (Şekil 4.12.B).



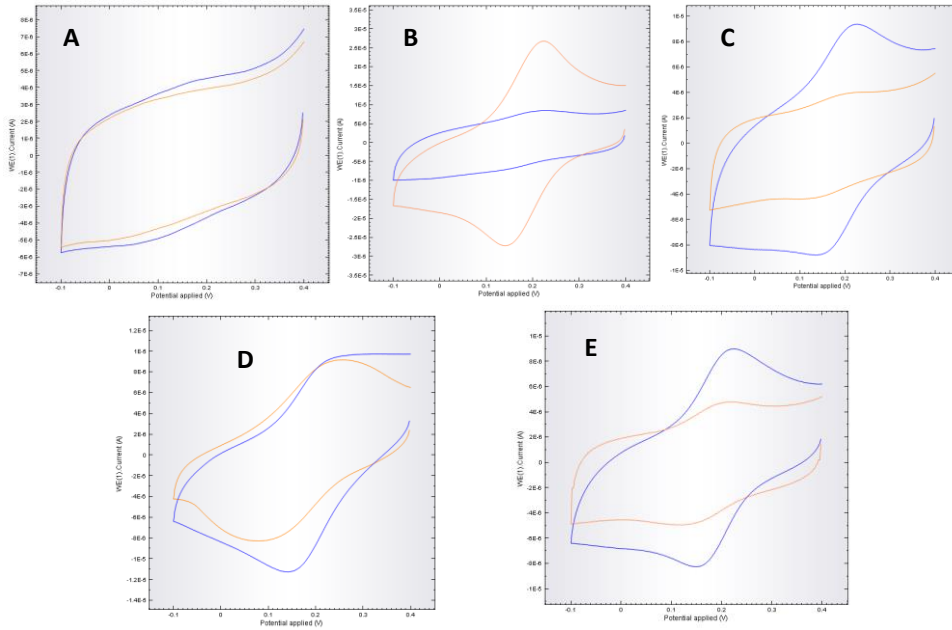
**Şekil 4.12. Santrifüj hızının HeLa belirlenmesine etkisini gösteren voltammogramlar. Ölçümler A)0 rpm, B)300rpm, C)500rpm ve D)1000rpm de 1 dk santrifüj süresinde gerçekleştirilmiştir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS’de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V’dan -0.1 V’a, tarama hızı 0.05 v/s dir.**



**Şekil 4.13. Santrifüj hızının akım değerlerine etkisi**

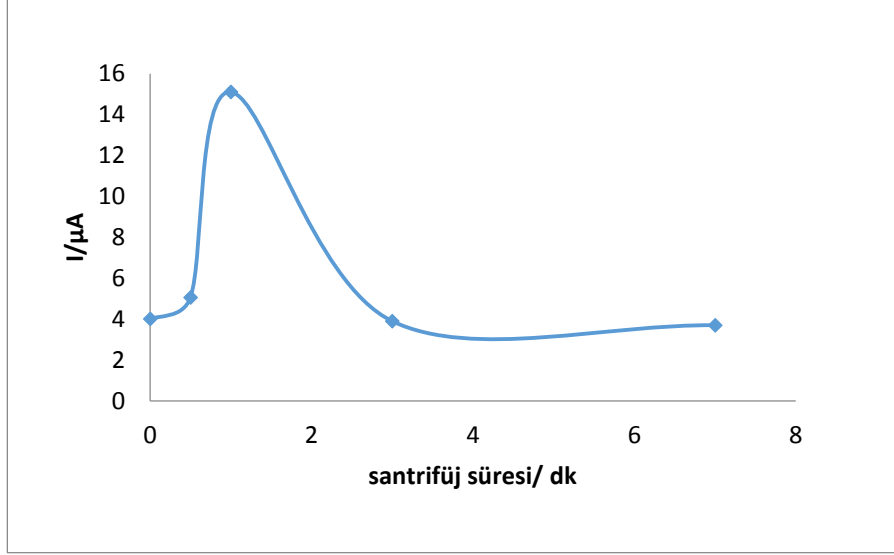
#### 4.4.2.2. Santrifüj süresi optimizasyonu

0, 0.5, 1, 3 ve 7 dk'lık santrifüj sürelerinin akım yanıtlarına etkisi  $5 \times 10^4$  hücre/mL HeLa hücresi içeren çözelti 500 rpm santrifüj hızında incelenmiş ve akım farklanmaları sırası ile  $4 \mu\text{A}$ ,  $5.3 \mu\text{A}$ ,  $15.1 \mu\text{A}$ ,  $3.9 \mu\text{A}$  ve  $3.5 \mu\text{A}$  olarak kaydedilmiştir. Bu akım farklanmalarından yararlanılarak Şekil 4.15'deki optimizasyon grafiği elde edilmiştir. Şekilde 4.15'de de görüldüğü gibi 1 dk ya kadar akım değerinde yüksek bir artış, 1 dakika santrifüj süresinden sonra akım değerinde düşüş gözlenmiştir. Uzun santrifüj süreleri elektrot yüzeyinde santrifüj gücü ile biriktirilen analitin dağılıp çözeltiye karışmasına neden olabilir. Bu sebeple akım değerlerinde düşüş gözlenmiştir. En yüksek akım değeri 1 dakikada elde edildiği için sonraki çalışmalarda bu süre kullanılmıştır (Şekil 4.14.C).



**Şekil 4.14. Santrifüj süresinin HeLa belirlenmesine etkisini gösteren voltammogramlar. Ölçümler A)0 dk, B) 0.5 dk, C) 1 dk, D) 3dk ve E) 7 dk santrifüj sürelerinde ve 500 rpm de gerçekleştirilmiştir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7 , 50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir.**

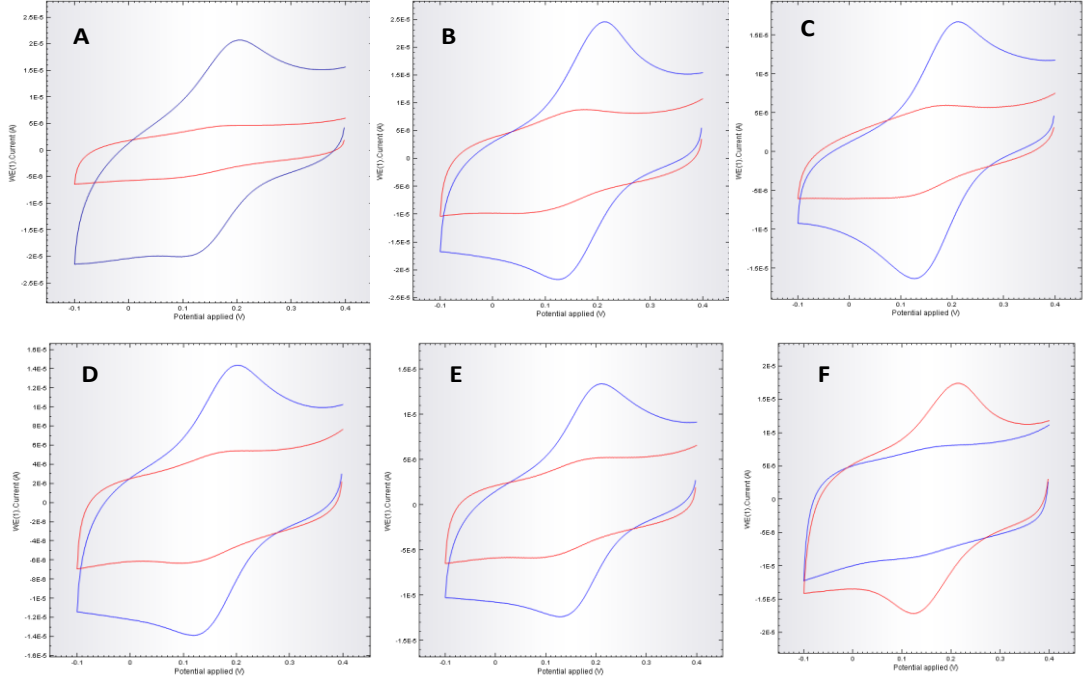




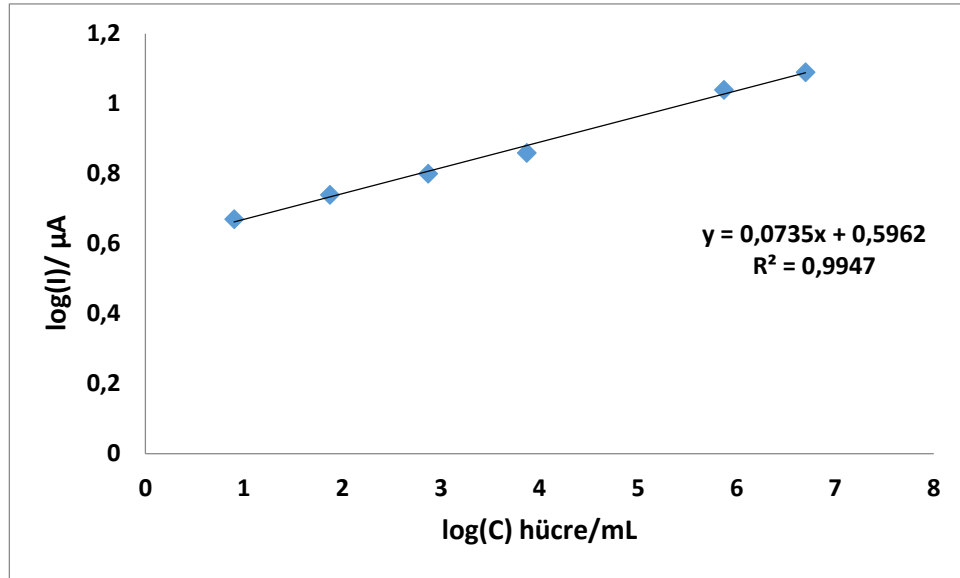
Şekil 4.15. Santrifüj süresinin akım değerine etkisi

#### 4.4.2.3. Sitosentri-voltammetri ile HeLa kanser hücrelerinin belirlenmesi

Hazırlanan sitosensörün biosentri-voltammetrik yöntem ile HeLa kanser hücrelerini belirleme performansını ölçmek için, optimum şartlarda çalışılmıştır. Şekil 4.16'da da görüldüğü gibi  $5 \times 10^6$ ,  $7.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^3$ ,  $7.5 \times 10^2$ ,  $7.5 \times 10^1$  ve 8 hücre/mL derişimdeki HeLa hücreleri ile yapılan CV ölçümlerinde sırası ile 12.5  $\mu\text{A}$ , 11.2  $\mu\text{A}$ , 7.5  $\mu\text{A}$ , 6.38  $\mu\text{A}$ , 5.6  $\mu\text{A}$  ve 4.7  $\mu\text{A}$  akım farklanmaları elde edilmiştir. Artan hücre sayısı ile oluşan akım farklanması arasında doğrusal ilişki gözlenmiştir. Bu doğrusal ilişkiden yararlanılarak Şekil 4.17.'deki kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Sonuç olarak; elektrokimyasal sitosensörün HeLa kanser hücrelerini belirleyebildiği doğrusal aralık 8 -  $5 \times 10^6$  hücre/mL saptanmıştır. LOD değeri 8 hücre/ml, RSD değeri ise  $5 \times 10^4$  HeLa hücreleri (n=3) için 4.7 % olarak hesaplanmıştır.



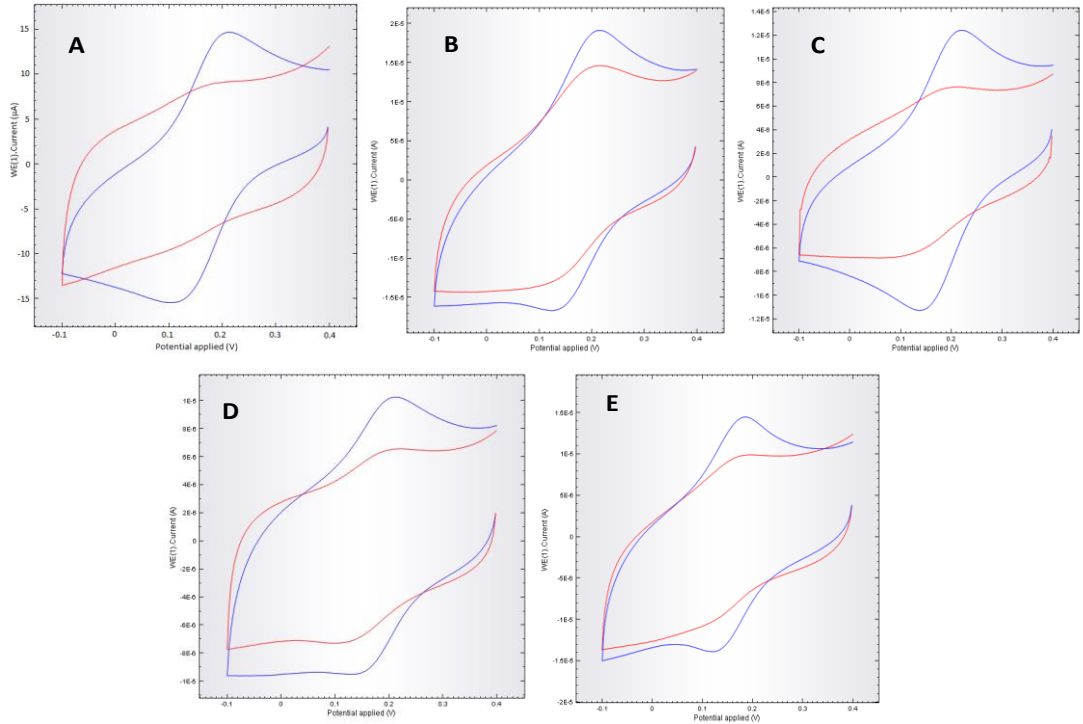
**Şekil 4.16.** HeLa derişimi ile akım farklanmasının doğrusal orantılı olduğunu gösteren biyosentri-voltammetrik voltammetrik ölçümler. Hücre miktarları A)  $5 \times 10^6$ , B)  $7.5 \times 10^5$ , C)  $7.5 \times 10^3$ , D)  $7.5 \times 10^2$  ve E) 8 hücre/mL şeklindedir. Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7, 50 mM PBS'de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V'dan -0.1 V'a, tarama hızı 0.05 v/s dir.



**Şekil 4.17.** HeLa hücrelerinin biyosentri-voltammetrik yöntemle belirlenebildiği doğrusal aralık

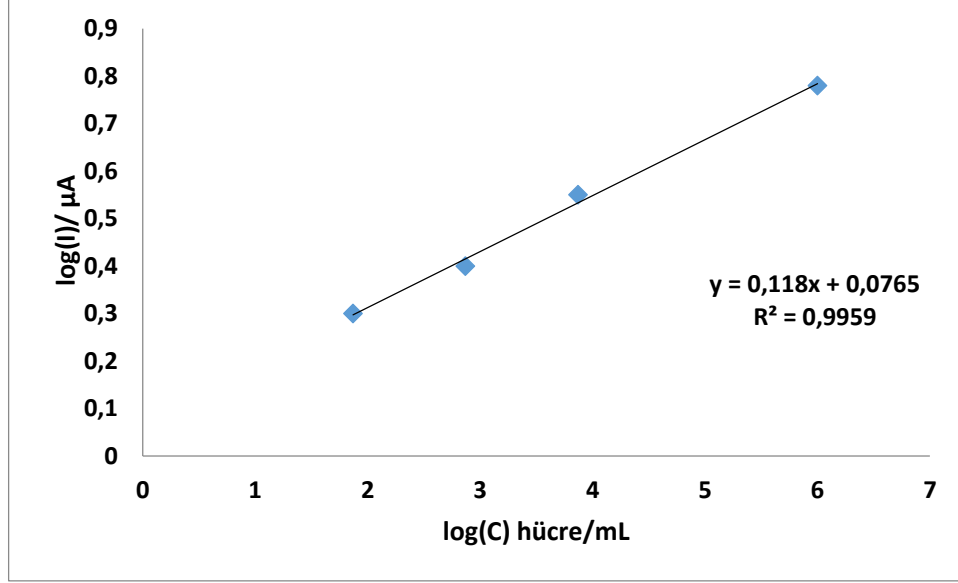
#### 4.4.3. Biyosentri-voltammetrik hücrede santrifüzsüz kanser hücresinin tayini

Biyosentri-voltammetrik hücre kullanılarak santrifüj işlemi yapılmaksızın kanser hücresi tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için Şekil 4.18’de görüldüğü üzere  $10^6$ ,  $7.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^3$ ,  $7.5 \times 10^2$  ve  $7.5 \times 10^1$  hücre/mL derişimindeki HeLa hücreleri kullanılmış ve akım farklanmaları sırası ile  $6.1 \mu\text{A}$ ,  $4 \mu\text{A}$ ,  $3.54 \mu\text{A}$ ,  $2.58 \mu\text{A}$  ve  $2.00 \mu\text{A}$  olarak kaydedilmiş ve hücre sayısındaki azalış ile akım farklanmasındaki azalış doğru orantılı olduğu anlaşılmıştır. Bu bilgiden yola çıkarak HeLa hücresinin bu sistem ile belirlenebildiği doğrusal aralık  $7.5 \times 10^1$  -  $10^6$  hücre/mL olarak saptanmıştır ( Şekil 4.19). LOD değeri 75 hücre/ml, RSD değeri ise  $5 \times 10^4$  HeLa hücreleri (n:3) için 3.5 % olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.18. HeLa derişimi ile akım farklanmasının doğrusal orantılı olduğunu gösteren Senti-voltammetri hücresinde santrifüj işlem basamağı olmadan yapılan voltammetrik ölçümler. Hücre miktarları (A)  $10^6$ , B)  $7.5 \times 10^5$ , C)  $7.5 \times 10^3$ , D)  $7.5 \times 10^2$  ve E)  $7.5 \times 10^1$  hücre/mL şeklindedir.

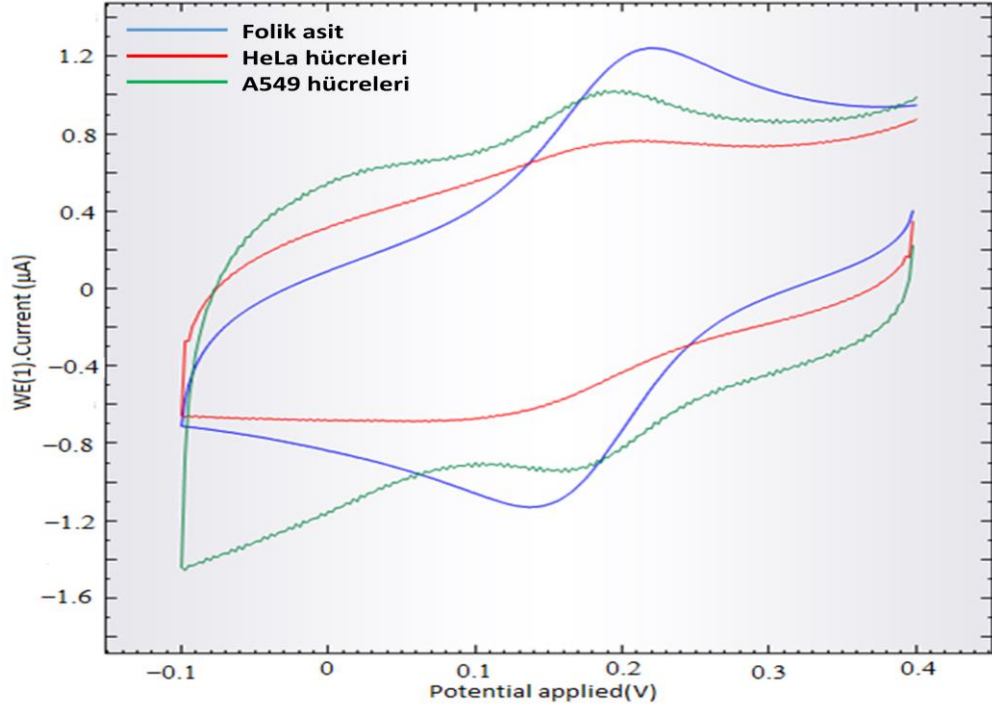
Hücre belirlenmesi sırasında tüm ölçümler pH:7,50 mM PBS’de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4 V’dan -0.1 V’a, tarama hızı 0.05 v/s dir.



Şekil 4.19. Biyosentri-voltammetri hücresi kullanılarak santrifüzsüz yapılan ölçümler sonucunda elde edilen HeLa belirlenmesi doğrusal aralığın gösterimi

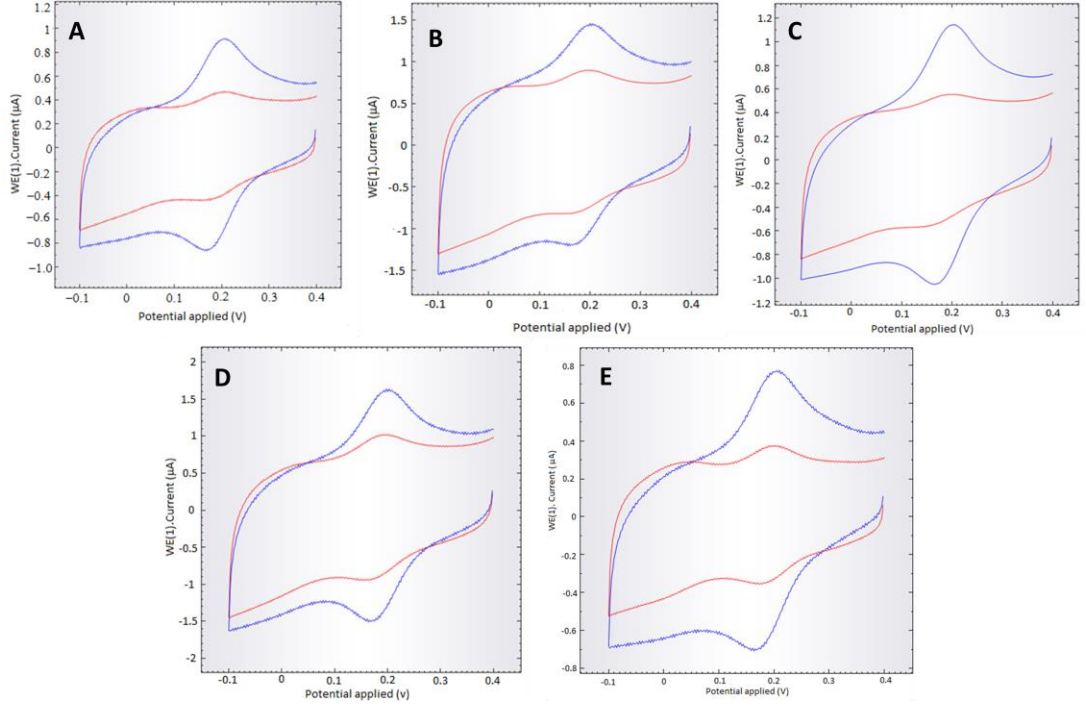
#### 4.5. Elektrokimyasal Sitosensörün A549 Hücreleri ile Kontrol Edilmesi

HeLa kanser hücrelerini belirlemek amacıyla tasarlanan elektrokimyasal sitosensörün spesifikliği A549 (Akciğer karsinom hücreleri) hücreleri ile test edilmiştir. Yapılan elektrokimyasal ölçümler sonucunda Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi derişimleri aynı ve  $5 \times 10^4$  hücre/mL olan A549 hücrelerinin HeLa hücrelerine kıyasla akım değerini daha az düşürdüğü saptanmıştır.

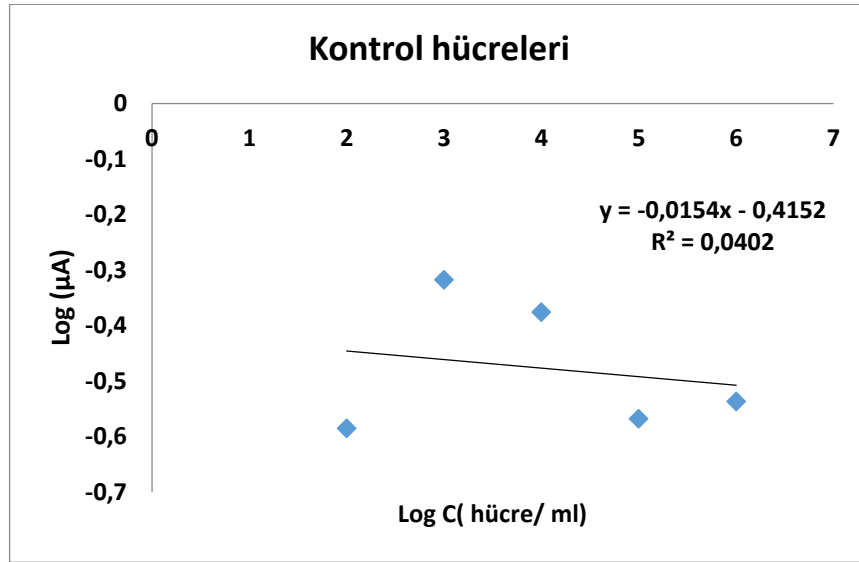


**Şekil 4.20. Elektrokimyasal sitosensörün spesifikliğinin  $5 \times 10^4$  hücre/ml A549 hücreleri ile test edilmesi**

Döngüsel voltametri ile gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, A549 hücrelerinin derişimi ile akım farklanması arasında doğrusal bir ilişki gözlenmemiştir. Şekil 4.21’ den de görüldüğü gibi  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  ve  $10^2$  hücre/mL derşimindeki A549 hücreleri ile yapılan denemelerde sırası ile 2.95,  $\mu\text{A}$  2.7  $\mu\text{A}$ , 4.2  $\mu\text{A}$ , 4.8  $\mu\text{A}$  ve 2.46  $\mu\text{A}$  akım farklanma değerleri elde edilmiştir. Voltammetrik ölçümler sonucu elde edilen akım farklanmalarından yararlanarak Şekil 4.22’deki kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ve geliştirilen sitosensörün A549 hücreleri ile etkileşimlerinin, akım farklanmasını doğrusal olarak değiştirmedığı gözlenmiştir.



Şekil 4.21. Geliştirilen sitosensörün A549 hücreleri ile denemelerinin CV voltammogramları. A.  $10^6$ , B.  $10^5$ , C.  $10^4$ , D.  $10^3$  ve E.  $10^2$  hücre/mL derişimdeki A549 hücreleri ile kontrol denemeleri pH:7 , 50 mM PBS’de yapılmıştır. Çalışma potansiyeli 0.4V’ dan -0.1 V’a, tarama hızı 0.05 v/s dir.



Şekil 4.22. Elektrokimyasal sitosensör ile A549 hücrelerinin etkileşiminden elde edilen kalibrasyon grafiği

**Tablo 4.1. Farklı kanser hücreleri belirlenmesi çalışmalarının karşılaştırılması**

<b>Analit</b>	<b>Nanomalzeme</b>	<b>Elektrokimyasal metot</b>	<b>Belirtme alt limiti</b>	<b>Doğrusal aralık</b>	<b>Referanslar</b>
Lösemi kanseri hücresi (HL-60)	Aunp	EIS ve DPV	350 hücrel mL <sup>-1</sup>	5.0×10 <sup>2</sup> - 7.5×10 <sup>7</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Su et al. 2014
HeLa hücreleri	-	EIS ve DPV	300 hücre mL <sup>-1</sup>	3.0×10 <sup>2</sup> - 1.0×10 <sup>7</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Wang et al. 2014
HeLa hücreleri	MWNT	CV ve EIS	90 hücre mL <sup>-1</sup>	2.4×10 <sup>2</sup> - 2.4×10 <sup>5</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Wang et al. 2013
HeLa hücreleri	Aunp	CV ve DPV	10 hücre mL <sup>-1</sup>	10-10 <sup>6</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Xu et al. 2013
Lösemi kanseri hücresi (HL-60)	-	CV ve EIS	500 hücre mL <sup>-1</sup>	5.0×10 <sup>2</sup> - 5.0×10 <sup>6</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Yang et al. 2013
Göğüs kanseri hücresi MCF-7	-	CV ve EIS) ve Chronocoulometry (CC)	67 hücre mL <sup>-1</sup>	1.0×10 <sup>2</sup> - 1.0×10 <sup>6</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Zhao et al. 2013
HeLa hücreler	Polyaniline nanofibers (PANI-NF), Aunp	CV ve EIS	2000 hücre mL <sup>-1</sup>	1.0×10 <sup>4</sup> - 6.4×10 <sup>6</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Hui et al. 2012

**Tablo 4.1<sup>(devam)</sup>. Farklı kanser hücreleri belirlenmesi çalışmalarının karşılaştırılması**

<b>Analit</b>	<b>Nanomalzeme</b>	<b>Elektrokimyasal metot</b>	<b>Belirtme alt limiti</b>	<b>Doğrusal aralık</b>	<b>Referanslar</b>
MCF-7	-	CV ve) EIS	100 hücre mL <sup>-1</sup>	1.0×10 <sup>2</sup> - 1.0×10 <sup>6</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Li et al. 2011
MCF-7	CdS	SWV(kare dalga voltammetrisi) ve EIS	3.2×10 <sup>2</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Li et al. 2010
Mide kanseri hücreleri (BGC-823)	SWNT	CV ve DPV	620 hücre mL <sup>-1</sup>	1.0×10 <sup>3</sup> - 1.0×10 <sup>7</sup> hücre mL <sup>-1</sup>	Cheng et al. 2008

#### **4.6. Yorum**

Tez kapsamında, elektrokimyasal sitosensör yapımında iki yeni prosedür geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler, model olarak HeLa kanser hücrelerine uygulanmıştır.

İlk yöntemde, PAMAM ve GCPE temelli elektrokimyasal sitosensör ilk kez HeLa hücrelerinin tayini için kullanılmış ve oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Bu yöntem kullanılarak HeLa kanser hücresi belirlenmesinde doğrusal aralık 10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> hücre/ml olarak saptanmıştır. LOD; 100 hücre/ml ve RSD değeri ise 5x10<sup>4</sup> HeLa hücreleri (n:3) için 1.55 % olarak hesaplanmıştır.



İkinci yöntemde, danışman hocam tarafından geliştirilen sentri-voltammetri, sitosensöre uygulanarak sentri-sitosensör yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemle de oldukça etkin ve duyar sonuçlar alınmıştır. Bu yöntemde santrifuj yapmaksızın, özel biyosentri-voltammetri hücresi kullanılarak yapılan çalışmalarda; HeLa hücreleri belirlemede doğrusal aralık  $7.5 \times 10^1 - 10^6$  hücre/ml olarak saptanmıştır. LOD, 75 hücre/ml olarak bulunurken, RSD değeri  $5 \times 10^4$  HeLa hücreleri (n:3) için 3.5 % olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, biyosentri-voltammetri hücresi ile santrifüj de yapılarak yapılan çalışmamızda, HeLa hücreleri belirlenmesinde doğrusal aralık  $8 - 5 \times 10^6$  hücre/ml olarak saptanmıştır. Bu çalışmada LOD değeri 8 hücre/ml ve RSD değeri  $5 \times 10^4$  HeLa hücreleri (n:3) için 4.7 % olarak hesaplanmıştır.

A549 hücreleri ile yapılan kontrol denemelerin de ise, akım farklanması ile A549 hücreleri derişimi arasında doğrusal bir ilişki olmadığı ve geliştirilen elektrokimyasal sitosensörün HeLa kanser hücresine seçimli olduğu kanıtlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Anık Kırgöz, U., Mo J.V., S., Wang, J. ve Muck, A. (2001) Glassy carbon paste electrode, *Electrochem. Commun.*, 3: 203-208.
- Anık Kırgöz, U., Timur, S., Wang, J. ve Telefoncu, A. (2004) Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode, *Electrochem. Commun.*, 6 (9): 913-916.
- Anık Kırgöz, Ü., Tural, H. ve Ertaş, F.N. (2004) A new procedure for voltammetric lead determination based on coprecipitation and centrifugation preconcentration, *Electroanalysis*, 12 : 765.
- Anık, U. ve Çevik, S. (2011) Centri-voltammetry for biosensing systems: Biocentri-voltammetric xanthine detection, *Microchimica Acta*, 174: 207.
- Anık, Ü. ve Çubukçu, M. (2008) Examination of the Electroanalytic Performance of Carbon Nanotube (CNT) Modified Carbon Paste Electrodes as Xanthine Biosensor Transducers, *Turk J Chem.*, 32: 711-719.
- Anık U., (2013) Centri-voltammetry and biocentri-voltammetry: a review, *Microchim Acta*, 180:741–749.
- Azar, N., Pourian, T., Mutlu, P., Khodadust, R. ve Gunduz, U. (2013) Poli(amidoamin) (Pamam) Nanopartiküller: Sentezi ve Biyomedikal Uygulamaları, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2013, 41: 289-299.
- Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., Quaresma, P. ve Franco, R. (2008) Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods, *Anal Bioanal Chem*, 391: 943-950.
- Bharathi, S. ve Nogami, M. (2000) A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme, *Analyst*, 126: 1919-22.
- Boisselier, E. ve Astruc, D. (2009) Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chem Soc Rev*, 38: 1759-1782.

- Bonanni, A., Loo, A.H. ve Pumera M. (2012) Graphene for impedimetric biosensing, *Trends Anal Chem*, 37:12-21.
- Buczowski. A., Sekowski, S., Grala, A., Palecz, D., Milowska, K., Urbaniak, P., Gabryelak, T., Piekarski, H. ve Palecz, B. (2011) İnteraction between PAMAM-NH<sub>2</sub> G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics*, 408:266-270.
- Bulut, M.O. ve Akar, E. (2012) Dendrimerlerin önemi ve kullanım alanı, *SDÜ teknik bilimler dergisi*, 1: 5-11.
- Can, F. (2010) Glukoz Oksidaz Enziminin İletken Polimerlere İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, *Yük. Lis. Tezi*, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 105s.
- Chen, H., Hou, Y., Ye, Z., Wang, H., Koh, K., Shen, Z. ve Shu, Y. (2014) Label-free surface plasmon resonance cytosensor for breast cancer cell detection based on nano-conjugation of monodisperse magnetic nanoparticle and folic acid, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 201: 433-438.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Xu, Y., Min, L. ve Li, N. (2008) A new antibody immobilization technique based on organic polymers protected Prussian blue nanoparticles and gold colloidal nanoparticles for amperometric immunosensors, *Sens Actuators B*, 135:236–244.
- Chen, W., Ding, L., Lei, J., Ding, S. ve Ju, H. (2008) Effective Cell Capture with tetrapeptide functionalized carbon nanotubes and dual signal amplification for cytosensing and evaluation of cell surface carbohydrate, *Anal. Chem.*, 80: 3867-3872.
- Cloninger, M. J. (2002) Biological applications of dendrimers, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 742–748.
- Çevik, S. (2009) Fenolik bileşiklere yönelik enzimatik olmayan (non-enzimatik) sensörlerin geliştirilmesi, *Yüksek lisans tezi*, Muğla Üniversitesi, Muğla, 57s.
- Çevik, S., Timur, S. ve Anık, A. (2012) Biocentri-voltammetric biosensor for acetylcholine and choline, *Microchim Acta*, 179: 299-305.
- Çevik, S., Timur, S. ve Anık, Ü. (2012) Biocentri-voltammetry for enzyme assay: a model study, *RSC Advances*, 2: 4299-4303.

- Çubukcu, M. (2008) Nanokompozitler ve elektrokimyasal biyosensör uygulamaları, *Yüksek lisans tezi*, Muğla Üniversitesi, Muğla, 94s.
- Çubukcu, M., Ertaş, F.N. ve Anık, Ü. (2013) “Centri-Voltammetric Determination of Glutathione”, *Microchimica Acta*, 180: 93–100.
- Demirkol, D.O. ve Timur, S. (2013) Biyosensörler: Temel kavramlar, enzim ve hücre sensörleri, dendrimerler ve nanoyapıların biyosensör hazırlanmasında kullanımları, *I. Uluslar arası katılımlı elektrokimya çalıştayları ders kitabı Nanoyapı modifiye elektrokimyasal/biyoelektrokimyasal sistemler*, MSKÜ, Muğla, 95.
- Doria, G., Conde, J., Veigas, B., Giestas, L., Almeida, C., Assunção, M., Rosa, J. ve Baptista, P.V. (2012) Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications; Review, *Sensors*, 12: 1657-1687.
- Fernandez-Sanchez, C., McNeil, J.C. ve Rawson, K. (2005) Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development, *Trends Anal Chem*, 24:37-48.
- Guo, Y.J., Sun, G.M., Zhang, L., Tang, Y.J., Luo, J.J. ve Yang, P.H. (2014) Multifunctional optical probe based on gold nanorods for detection and identification of cancer cells, *Sensors and Actuators B: Chemical*, B 191: 741– 749.
- Holford, T.R.J., Davis, F. ve Higson S.P.J. (2012) Recent trends in antibody based sensors, *Bios and Bioelect*, 34: 12–24.
- Karube, I. and Nakanishi, K. (1994) Microbial biosensors for process and environmental control, *IEEE Eng. Med. Biol.*, 13: 364-374.
- Kırgöz, U., Tural, H. ve Ertaş, F.N (2005) Centri-voltammetric study with Amberlite XAD-7 resin as a carrier system, *Talanta*, 65: 48- 53.
- Koçak, S. ve Ertaş, F.N. (2013) Centri-voltammetric determination of molybdenum *Anal. Methods*, 5: 741.
- Leamon, C.P. ve Reddy, J.A., (2004) Folate-Targeted Chemotherapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 1127-1141.

- Lee, I., Athey, B.D., Wetzel, A.W., Meixner, W. ve Baker, J.R. (2002) Structural Molecular Dynamics Studies on Polyamidoamine Dendrimers for a Therapeutic Application: Effects of pH and Generation, *Macromolecules*, 35: 4510-4520.
- Lee, S., Chon, H., Lee, J., Ko, J., Chung, B.H., Lim, D.W. ve Choo, J. (2014) Rapid and sensitive phenotypic marker detection on breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging, *Biosensors and Bioelectronics*, 51: 238-243.
- Li, J., Xu, M., Huang, H., Zhou, J., A.Halimb, E.S. ve Zhang, J.R. (2011) Aptamer-quantum dots conjugates-based ultrasensitive competitive electrochemical cytosensor for the detection of tumor cell, *Talanta*, 85: 2113-2120.
- Li, T., Fan, Q., Liu, T., Zhu, X., Zhoa, J. ve Li, G. (2010) Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical method, *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 2686- 2689.
- Liu, J., Qin, Y., Li, D., Wang, T., Liu, Y., Wang, J. ve Wang, E. (2013), Highly sensitive and selective detection of cancer cell with a label-free electrochemical cytosensor, *Biosensorsandbioelectronics*, 41: 436-441.
- Liu, L., Zhu, X., Zhang, D., Huang, J. and Li, Genxi, 2007, An electrochemical method to detect folate receptor positive tumor cells, *Electrochemistry Communications*, 9:2547-2550.
- Liu, S., Wang, L. ve Zhao, F. (2007) Influence of gold nanoparticle modified electrode on the mediation reduction of ferricyanide by methylene blue, *J Electroanal Chem*, 602:55-60.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J. ve Chan, D.W. (2001) Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry, *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 314: 1–26.
- Mamalis, A.G., (2006) Recent advances in nanotechnology, *Journal of Materials Processing Technology*, 181, Greece, 52.
- Merkoci, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Valle, M. ve Alegret S. (2005) New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends in Anal Chem*, 24:826-838.

- Odacı, O., (2010) Karbonhidrat analizine yönelik biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi, karakterizasyon ve uygulamaları, *Doktora tezi*, Ege üniversitesi basımevi, İzmir.
- Özcan, L. (2008) Polipirol iletken polimerinin biyosensör olarak kullanımı, *Doktora Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 114s.
- Sharma, S.K., Sehgal, N. and Kumar, A. (2003), Biomolecules for development of biosensor and their applications, *Current Applied Physics*, 3: 307- 316.
- Sperling, R.A., Gil, P.R., Zhang, F., Zanella, M. ve Parak, W.J. (2008) Biological applications of gold nanoparticles, *Chem Soc Rev*, 37: 1896-1908.
- Su, M., Ge, L., Ge, S., Li, N., Yu, J. ve Yan, M. (2014) Paper-based electrochemical cyto-device for sensitive detection of cancer cells and in situ anticancer drug screening, *Analy. Chim. Acta*, 847: 1-9.
- Sultan S.C ve Anik, U. (2014) Gr-Pt Hybrid NP Modified GCPE as Label and Indicator Free Electrochemical Genosensor Platform, *Talanta*, 129: 523-528.
- Sun, Z.Z., Yan, Z., Yao, J., Beitler, E., Zhu, Y. ve Tour J.M. (2010) Growth of graphene from solid carbon sources, *Nature*, 468:549-552.
- Tetrapeptide-Functionalized Carbon Nanotubes and Dual Signal Amplification for Cytosensing and Evaluation of Cell Surface Carbohydrate, *Anal. Chem.*, 80: 3867- 3872.
- Timur, S., Demir, B. ve Güler, E. (2014) Biyosensörlerden ‘Lab-on-a-chip’ sistemlerine: genel bakış, *III. Ulusal uygulamalı elektrokimya lisansütü yaz okulu ve çalıştayı: elektrokatalitik sistemler ve uygulamaları ders kitabı*, 234.
- Timur, S., Seven, B., Bourourou, M., Elouarzaki, K., Constant, J.F., Gondran, C., Holzinger, M. ve Cosnier, S. (2013) Impedimetric biosensor for cancer cell detection, *Electrochemistry Communications*, 37: 36-39.
- Tkac, J., Stefuca, V. ve Gemenier, P. (2001) Applications of cell immobilization biotechnology, V. Nedoviç, R. Willaert (Eds.), Springer, New York, USA.

- Tural, H., Ertaş, F. N. ve Gökçel, H. (2010) *Enstrümental Analiz ve Elektroanalitik Yöntemler*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 339s.
- Ürkmez, I., Gökçel, H.İ., Ertaş, F.N. ve Tural, H. (2009) Centrifugation: an efficient technique for preconcentration in anodic stripping voltammetric analysis of mercury using a gold film electrode, *Microchim Acta*, 167: 225-230.
- Wang, H., Wang, T., Ye, Y.X., Zhang, Y.X., Yang, P.H. ve Cai, H.H. (2012) Construction of An Electrochemical Cytosensor Based on Polyaniline Nanofiber/Gold Nanoparticle Interface and Application to Detection of Cancer Cells, 40: 184,190.
- Wang, L. ve Wang, E. (2004) A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode, *Elektrochem. Commun.*, 6: 225-29.
- Wang, R., Di, J., Ma, J.B. ve Ma, Z. (2012) Highly sensitive detection of cancer cells by electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta*, 61 : 179-184.
- Wang, X., Ju, J., Li, J., Li. L., Qian, Q., Mao, C. ve Shen, J. (2014) Preparation of Electrochemical Cytosensor for Sensitive Detection of HeLa Cells Based on Self-Assembled Monolayer, *Electrochimica Acta*, 123: 511-517.
- Wang, Z., Chen, S., Hu, C., Cui, D. ve Jia, N., (2013) An enhanced impedance cytosensor based on folate conjugated-polyethyleniminecarbon nanotubes for tumor targeting, *Electrochemistry Communications*, 29: 4-7.
- Wells, N. J. and Bradley, M. (1998) Solid-Phase Dendrimer Synthesis. Biopolymers, *Peptide Science*, 47:381-396.
- Whitesides, G., (2003) The ‘right’ size in nanobiotechnology, *Nature Biotechnology*, 21:1161–1165.
- Xiao, Y., Ju, H.X. ve Chen H.Y. (1999) Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer, *Anal. Chim. Acta*, 391: 73-82.

- Xu, S., Liu, J., Wang, T., Hailong, L., Miao, Y. ve Liu, Y., (2013) A simple and rapid electrochemical strategy for non-invasive, sensitive and specific detection of cancerous cell, *Talanta*, 104: 122-127.
- Yang, G., Cao, J., Li, L., Rana, R.K. ve Zhu, J.J. (2013) Carboxymethyl chitosan-functionalized graphene for label free electrochemical cytosensing, *Carbon*, 51: 124-133.
- Yıldırım, N. (2009) Mikrobiyal hücrelerle hazırlanmış nanopartiküllerle modifiye medyatörlü bakteriyal sensörlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu, *Yüksek lisans tezi*, Ege Üniversitesi, İzmir, 79s.
- Zhao, J., Henkens, R.W., Stonehuerner, J., O'Daly, J.P. ve Crumbliss, A.L. (1992) Direct electron transfer at horseradish peroxidase colloidal gold modified electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 327: 109-19.
- Zhao, J., Zhu, L., Guo, C., Guo, T., Zhu, X. ve Li, G. (2013) A new electrochemical method for the detection of cancer cells based on small molecule-linked DNA, *Biosensors and Bioelectronics*, 49: 329-333.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Yudum TEPELİ  
Ünvanı : Öğrenci  
Uyruk : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi: 28/04/1990 - Marmaris  
Medeni Hali :Bekar  
Telefon : 0252 211 1602 - 0554 921 47 78  
E-posta : yudumtepel@gmail.com; yudum-tepeli48@hotmail.com

### Eğitim Durumu :

Okul	Derece	Yıl
H.A.U. Anadolu Lisesi ,Marmaris	Diploma	2004-2008
Ege Üniversitesi, İzmir	B.Sc. (Kimya)	2008-2012
M.S.K. Üniversitesi, Muğla	M.Sc. (Kimya / Analitik Kimya)	2013-2015

**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce iyi derecede  
Almanca az derecede

**Uzmanlık Alanları :** Nanoyapı (nanopartikül-nanotüp) Temelli  
Elektrokimyasal/Biyoelektrokimyasal Sistemler, Elektrokimyasal Biyosensörler,  
Centri-voltammetry/Biocentri-voltammetry

### Bilimsel Toplantı Teknik Kurul

1. Nanoyapı Modifiye Elektrokimyasal Ve Biyoelektrokimyasal Sistemler” Temalı “1. Uluslararası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayında teknik kurul üyeliği Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü 23-28 Haziran 2013 Muğla
2. 3. Ulusal Uygulamalı Lisans Üstü Yaz Okulu ve Çalıştayında teknik kurul üyeliği Balıkesir Üniversitesi, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık

### Yayınlar

1. Sultan S.C, Sezer E., Tepeli Y, Anik U (2014) “Centri-Voltammetric Dopamine Detection”, *RSC Advances*, 4: 31489

## **Ulusal Kitap Bölümü**

1. “Polimeric Composite electrode and nanomaterial based composite electrodes: Chapter II Display of nanomaterial modified composite electrodes by cyclic voltammetry” Çevik S., Tokul Ö., Aslan S., Sultan S.C., Yapışık H.U., Tepeli Y., Anık Ü I. Uluslar arası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayı, “Nanoyapı Modifiye Elektrokimyasal/Biyoelektrokimyasal Sistemler”, 23-28 Haziran 2013, Muğla.
2. “Chemical Synthesis and characterization of some metal/metal oxide nanoparticles” Tokul Ö., Aslan S., Çevik S., Sultan S.C., Yapışık H.U., Tepeli Y., Anık Ü I. Uluslar arası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayı, “Nanoyapı Modifiye Elektrokimyasal/Biyoelektrokimyasal Sistemler”, 23-28 Haziran 2013, Muğla.
3. “Kompozit Biyo-Anot ve Biyo-Katot Elektrotlarla Oluşturulan Biyo-Yakıt Hücrenin Elektrokimyasal Performansının İncelenmesi” , Tepeli Y, Anık U, 3. Ulusal Uygulamalı Lisans Üstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık.

## **Bildirileri**

1. “Grafen Nanoyapı Temelli Kompozit Elektrotların Hazırlanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu”, Çelik Ç., Tepeli Y., Anık Ü., Poster sunumu, 3. Ulusal Uygulamalı Lisans Üstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık.
2. “CdS Nanomalzeme ve CoAgGr Hibrit Nanoyapı Modifiye GCPE'nin Elektrokimyasal Performansının İncelenmesi” Tepeli Y., Kokdaş Ö., Tilki S., Tezcan M., Anık Ü., Poster sunumu, 3. Ulusal Uygulamalı Lisans Üstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık.