

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MALONDİALDEHİT TAYİNİNE
YÖNELİK BİYOSENSÖR
TASARLANMASI VE MEVCUT
ANALİZ YÖNTEMLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Mutahire TOK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Esmâ MENEVŞE**

KONYA -2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MALONDİALDEHİT TAYİNİNE
YÖNELİK BİYOSENSÖR
TASARLANMASI VE MEVCUT
ANALİZ YÖNTEMLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Mutahire TOK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç.Dr. Esmâ MENEVŞE

KONYA -2017

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15202021 nolu proje ile desteklenmiştir.

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Mutahire TOK tarafından savunulan bu çalışma, jüri tarafından ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak oy birliği / oy çokluğu kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ali Muhtar TİFTİK

Danışman

Doç Dr. Esmâ MENEVŞE

Üye

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

İmza

.....

.....

.....

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu .../.../... ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
SBE Müdürü

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15202021nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Esmâ ÖZTEKİN MENEVŞE danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans tezimi yöneten, hayatımda çok önemli bir yeri olan ve her zaman olduğu gibi tez çalışmam boyunca da her soruma ve sorunuma çözüm üreterek destekleriyle daima bana güç veren, bilgi birikimi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Esmâ ÖZTEKİN MENEVŞE'ye sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecim boyunca bana laboratuvarının kapılarını açan, tüm laboratuvar imkânlarını kullanmamda sonsuz yetki veren, manevi desteği ile hep yanımda olan, bilgi birikimi ve tecrübeleri ile çalışmalarımda bana yol gösteren S.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Yasemin ÖZTEKİN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleri ile çalışmalarımda bana destek olan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimini, tecrübelerini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye ve tez verilerimin istatistiksel analizlerinde yardımcı olan S.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD Başkanı Yrd.Doç.Dr. Neriman AKDAM'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Su temas açısı ölçümlerini almamda bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Taha GÜLDEREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecimde manevi destekleri ile hep yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren, benimle birlikte uykusuz geceler geçiren hayatta sahip olduğum en güzel değerlerden olan, arkadaştañ öte, canım kardeşlerim Zehra Özden ERDOĞAN'a, Huriye ÇAKIR TAŞ'a ve Aslan TAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteğini esirgemeyen bölüm sekreterimiz ve canım arkadaşım Handan ÇOBANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını 15202021 numaralı ve "Malondialdehit Tayinine Yönelik Biyosensör Tasarlanması ve Mevcut Analiz Yöntemleri ile Karşılaştırılması" başlıklı proje ile maddi olarak destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarım süresince her zaman ve her durumda yanımda olup, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıkları sayesinde kendimi çok şanslı hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mutahire TOK
Temmuz-2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. MDA'nın Yapısı, Oluşum Mekanizması ve Metabolizmadaki Etkileri	4
1.2. MDA Tayin Yöntemleri.....	7
1.3. Kolorimetrik Yöntem.....	8
1.3.1. Kolorimetre	10
1.3.2. Kolorimetrenin ana bileşenleri.....	10
1.3.3. Kolorimetrenin çalışma prensibi.....	10
1.3.4. Kolorimetrik yöntem ile MDA tayini	11
1.4. Kromatografik Ayırma Teknikleri.....	12
1.4.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)	14
1.5. Biyosensörler	18
1.5.1. Biyosensörlerin temel bileşenleri.....	19
1.5.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması	22
1.5.3. Biyosensörlerin Performansını Etkileyen Faktörler	26
1.5.4. Biyosensörlerin Uygulama Alanları	30
1.6. Analitik Yöntemlerin Değerlendirilmesi	31
1.6.1. Analitik performans parametreleri	32
1.6.2. Performans standartları	32
1.6.3. Yöntem değerlendirme deneylerinin basamakları	32
1.6.4. Yöntem kabul edilebilirliğinin değerlendirilmesi.....	33
1.7. Metot Validasyonu	33
1.7.1. Doğruluk	34
1.7.2. Analitik aralık (Linearite)	35
1.7.3. Analitik ölçüm limitleri	35
1.7.4. Tekrarlanabilirlik	36
1.7.5. Geri kazanım.....	37
1.7.6. Girişim (İnterferans)	37
1.7.7. Referans aralık doğrulama	38
1.7.8. Taşıma (Carryover).....	38
1.7.9. Matriks etkisi	38
1.7.10. Yöntem Karşılaştırma	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	40
2.1.1. Kolorimetrik Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	41
2.1.2. HPLC Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar.....	41
2.1.3. Biyosensör Tasarımı Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar.....	41
2.1.4. Kolorimetrik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	43
2.1.5. HPLC Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	43

2.1.6. Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	45
2.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	46
2.2.1. Kolorimetrik Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	46
2.2.2. HPLC Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	47
2.2.3. Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	48
2.2.4. Plazma Havuzunun ve Hasta Grubunun Oluşturulması	49
2.3. Kolorimetrik Yöntemle MDA Tayini	51
2.4. HPLC ile MDA Tayini	52
2.5. MDA Analizine Yönelik Biyosensör Tasarımı	53
2.5.1. Çalışmada Kullanılan Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi	53
2.5.2. GC Elektrot Yüzeyinin Modifiye Edilmesi	55
2.5.3. Yalın ve Modifiye Yüzeylerin Karakterizasyonu	59
2.5.4. Uygulama Çalışmaları	61
2.6. İstatistiksel Analiz	63
3. BULGULAR	64
3.1. Kolorimetrik Yöntem ile MDA Analizine Ait Bulgular	64
3.1.1. Kolorimetrik test kiti bilgileri	64
3.1.2. Standart grafiği	64
3.1.3. Linearite Çalışması	65
3.1.4. Tekrarlanabilirlik çalışması	66
3.1.5. Girişim çalışması	66
3.1.6. Hemoliz, ikterik, lipemik ve dondur-çöz etkisinin belirlenmesi çalışması... 66	
3.1.7. Yüksek-orta-düşük LDL düzeyli hastalarda MDA değerlerinin belirlenmesi 67	
3.2. HPLC Yöntemiyle MDA Analizine Ait Bulgular	69
3.2.1. HPLC yöntem bilgileri	69
3.2.2. Standart grafiği	69
3.2.3. Linearite Çalışması	69
3.2.4. Tekrarlanabilirlik çalışması	70
3.2.5. Geri elde çalışması	82
3.3. Biyosensör Çalışmalarına Ait Bulgular	84
3.3.1. Elektrot Yüzeylerinin Karakterizasyonu	85
3.3.2. Optimum Çalışma Şartlarının Belirlenmesi	103
3.3.3. Performans faktörleri	105
3.3.4. Gerçek Numune Analizi	108
3.4. Tasarlanan Biyosensör ile MDA Analizine Ait Bulgular	108
3.4.1. Biyosensör yöntem bilgisi	108
3.4.2. Standart grafiği	109
3.4.3. Linearite çalışması	109
3.4.4. Tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışması	111
3.4.5. Geri elde çalışması	112
3.4.6. Hemoliz, lipemik, ikterik ve dondur-çöz etkisinin belirlenmesi çalışması. 114	
3.4.7. Yüksek-orta-düşük LDL düzeyli hastalarda MDA değerlerinin belirlenmesi 114	
3.5. Metotların Karşılaştırılmasına Ait Bulgular	116
4. TARTIŞMA	119

4.1. MDA Tayinine Yönelik Hazırlanan Biyosensör Sonuçlarının Değerlendirilmesi	121
4.2. Kolorimetri, HPLC ve Tasarlanan Biyosensör Yöntemlerine Ait Biyoanalitik Performans Sonuçlarının Değerlendirilmesi	124
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	130
5.1. Sonuçlar	130
5.2. Öneriler	132
6. KAYNAKLAR	133
7.EKLER	146
8.ÖZGEÇMİŞ	147



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a	: Aktivite
E	: Çalışma Elektrodunun Potansiyeli
E^0	: Standart Elektrot Potansiyeli
F	: Faraday Sabiti
n	: Alınan-Verilen Elektron Sayısı
Q	: Kaplanmanın Yüzde Olarak Oranı
R	: İdeal Gaz Sabiti
R_p	: Camsı Karbon Elektrot Yüzeyine Ait Direnç
T	: Mutlak Sıcaklık
v	: Tarama Hızı

Kısaltmalar

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskopisi
BR tampon çözelti	: Britton–Robinson Tampon Çözeltisi
CH_3CN	: Metil Siyanür (Asetonitril)
CV	: Dönüşümlü Voltametri
DAD	: Diode Array Dedektör
ECD	: Elektrokimyasal Dedektör
EIS	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbant Assay
$Fe(CN)_6^{3-}$: Ferrisiyanür
$Fe(CN)_6^{4-}$: Ferrosiyanür
FET	: Alan Etki Transistörleri

FLD	: Floresan Dedektör
GC	: Camsı Karbon Elektrot
GR	: Grafen
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ISFET	: İyon Duyarlı Alan Etki Transistörleri
MDA	: Malondialdehit
MOSFET	: Metal Oksit Yarı İletken Alan Etki Transistörleri
MSD	: Kütle Spektrometri Dedektörü
MWCNT	: Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
OCP	: Açık Devre Potansiyeli
Pt	: Platin Tel
R	: Recovery
RID	: Refraktif İndeks Dedektör
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit
TBATFB	: Tetrabütilamonyum Tetrafloroborat

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MALONDİALDEHİT TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR TASARLANMASI VE MEVCUT ANALİZ YÖNTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Mutahire TOK

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2017

Endoperoksitlerin kaynağını oluşturan ve oksidatif hasarın bir belirteci olan Malondialdehitin mevcut analitik yöntemleriyle yapılan ölçümlerinde, yöntem performansına bağlı sınırlılıklar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında; daha hızlı sonuç verebilen, daha hassas, maliyeti düşük yeni bir analiz yönteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedefle, MDA tayinine yönelik sensör tasarımı şü ana kadar denenmemiş olan bir yöntem izlenmesi ve MDA tayininde metot validasyonunun temelini oluşturulması amaçlanmıştır. Mevcut kolorimetrik ve HPLC metotlarının verileri ile tasarladığımız elektrokimyasal sensörün verileri karşılaştırılarak yöntem performanslarının değerlendirilmesi planlanmıştır.

Çalışma, iki aşamalı olarak tasarlanmış ve çalışmanın ilk basamağında MWCNT, grafen, Au ile GC elektrot yüzeylerinin modifikasyonu sonucu modifiye elektrot yüzeyleri hazırlanmıştır. Hazırlanan modifiye elektrot yüzeylerinin karakterizasyonu redoks problemler varlığında dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniklerinin yanı sıra Taramalı Elektron Mikroskobu, Atomik Kuvvet Mikroskobu ve Temas Açısı Ölçümü teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yalnız GC elektrot yüzeyine ait verilerle karşılaştırılmıştır. Çeşitli nano yapılarla modifiye edilerek yeni bir morfoloji kazandırılmış elektrot yüzeylerinin MDA sensör olarak uygulanabilirliği araştırılmıştır. Optimum yüzey altın modifiye camısı karbon elektrot olarak belirlendikten sonra bu yüzey için kararlılık, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, seçicilik ve hasta numunelerine uygulanabilirlik çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci basamağında ise, MDA tayininde kullanılan elektrokimyasal sensör yöntemi ile HPLC ve kolorimetrik metotlarla elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında oluşturulan hasta plazma havuzunda yapılan çalışmalarla, metotların performans standartlarını değerlendirebilmek amacıyla yöntemin geçerlilik standartlarının hesaplamaları yapılmıştır.

Analitik doğruluk, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, interferans, linearite, geri kazanım, don-çöz etkisi gibi birçok açıdan yöntem performansının değerlendirilmesi yapıldığında, gerek HPLC metodu ve gerekse tasarladığımız biyosensör metodunun verilerinin, TBARS metoduna göre daha üstün ve kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir. HPLC metoduna ait CV değerlerimiz %4,41-%30,97, biyosensörde bu değerler %4,08-%0,08 aralığında, biyosensöre ait %R değerleri %100,33-%114,59, HPLC'de %94,0-%101,5 aralığında olduğu görülmüştür. Lipemik, ikterik, don-çöz etkileri gibi numune kaynaklı faktörlerin biyosensör metodu ile alınan ölçüm sonuçlarına etkisi TBARS metodu ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Hemolizli numunenin MDA düzeylerine olan etkisi biyosensörde daha yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla biyosensörlerle MDA ölçüm analizlerinde hemolizli numune kullanılmaması sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, biyosensör metodunun kolay uygulanabilir olması, yüksek konsantrasyonlarda da linearite göstermesi, CV ve geri elde değerlerinin kabul edilebilir düzeyde olması bakımından HPLC metoduna göre avantaj sağladığı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Altın nanopartikül; Biyosensör; HPLC; Malondialdehit; TBARS

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

BIOSENSOR DESIGN FOR MDA DETERMINATION AND COMPARISON WITH THE OTHER CURRENT METHODS

Mutahire TOK

Department of Medical Biochemistry

MASTER THESIS / KONYA-2017

Malondialdehyde (MDA) is a source of endoperoxides and marker of oxidative damage. In analysis of MDA, have limitations in the performance of the current analytical methods. In this thesis study, it was planned to develop a new analytical method that is much faster, more accurate and lower cost process. With this target, it was aimed to pursue a method that has not been tried so far in sensor design and to establish the basis of method validation in MDA determination. It is planned to evaluate the method performance by comparing the data of the designed electrochemical sensor with the current methods of HPLC and colorimetric.

The study was designed in two stages and in the first step of study, modified electrode surfaces was prepared with the modification of MWCNT, graphene, Au of glassy carbon electrode surfaces. The characterization of the prepared electrode surfaces was realized using of techniques cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy in the presence of redox probes, as well as scanning electron Microscopy, Atomic Force Microscopy and Contact Angle Measurement techniques. The electrode surfaces which is modified with various nano structures and thus a new morphology has been investigated as an MDA sensor. The results obtained, was compared those given for bare glassy carbon electrode surfaces. After the optimum surface has been identified as a gold modified glassy carbon electrode, stability, reproducibility, repeatability, selectivity and applicability to patient samples was studied according to analytical performance criteria for this surface.

In the second step of the study, data of the electrochemical sensor's were compared with methodological data of HPLC and colorimetric, which are used in the determination of MDA. The validity standards of the method calculated with the studies done in patients' blood pool that were provided from Selcuk University Department of Biochemistry Laboratories, in evaluating the performance standards of the methods.

In evaluation of the performance of the methods according to analytical accuracy, sensitivity, recovery, interference, linearity, freeze-thaw effect, the HPLC and biosensor methods that are designed, are superior to the TBARS method and are in acceptable level. The CV levels were %4,41-%30,97 in HPLC method and %4,08-%0,08 in biosensor. Recovery levels were respectively %100,33-%114,59 and %94,0-%101,5 in biosensor and HPLC methods. Sample property factors such as lipemic, icteric samples, of freeze-thaw effects were more less in biosensor's data than the data of TBARS. The interference of the hemolysis on MDA level was higher in biosensor method. Therefore, we concluded not to analyze MDA level sin hemolysis samples. Likewise, the biosensor method is easy in applying procedure and has linearity in high concentrations, acceptable recovery levels. These findings show that biosensor method has an advantageous over the HPLC method.

Keywords: Biosensor, Gold nanoparticle, HPLC, Malondialdehyde, TBARS

1. GİRİŞ

19. yüzyılda tasarlanan, 20. yüzyılın başında doğan, 1906 yılında Tswett tarafından bilim dünyasına kazandırılan kromatografi; bilim tarihine girişinden 1930'lu yıllara kadar sahipsiz kalmış, 2. Dünya Savaşı sonuna kadar inişli çıkışlı dönemini tamamlayarak günümüze dek sürekli gelişim göstermiştir. Bu gelişimdeki her yenilik temel mantığını bir önceki basamaktan almıştır. Bu bir asırlık periyotta kromatografi bileşiklerin ekstraksiyonu, tanımlanması ve saflaştırılmasında kullanılmış ve kromatografi alanında yapılan çalışmalar pek çok kez Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür. Bir diğer taraftan yapılan çalışmaların çeşitliliği yeni analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla kromatografik ayırımı temel alan pek çok alt kromatografi birimi bugün bilim dünyasında yerini almıştır. Geliştirilen kromatografik yöntemler arasında ise yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) duyarlılığı, doğruluğu, kantitatif tayinler için kolay uygulanabilir olması, uçucu olmayan ve sıcaklık karşısında kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına olanak sağlaması, sanayide ve bir çok bilim dalında geniş bir uygulama alanı bulması nedeniyle bütün analitik ayırma teknikleri arasında en çok tercih edilen ve en yaygın kullanılan yöntem olarak çalışmalara damgasını vurmuştur. Bugün gelinen noktada diğer analiz yöntemlerine kıyasla; küçük miktarların tayinine olanak sağlaması, otomasyona uygun olması, hızlı ve doğru analiz imkânı sunması ve yüksek ayırma gücüne sahip olması nedeniyle HPLC; ilaç endüstrisinden (Acosta ve ark 2015, Ahmed ve ark 2016, Aires ve ark 2016, Adamo ve ark 2017, Kastner ve ark 2017), aminoasit (Anderson 2017, Fernandes ve ark 2017, Redruello ve ark 2017), protein (Deitrich ve ark 2016, Sturaro ve ark 2016, Parent ve ark 2017, Regl ve ark 2017), karbonhidrat (da Costa ve ark 2016, Llano ve ark 2017), lipid (Castro-Gómez ve ark 2017, Knittelfelder ve Kohlwein 2017, Wörmer ve ark 2017) gibi biyokimyasal türlere; suni tatlandırıcılar (Filip ve ark 2016, Sargaço ve ark 2017), antioksidanlar (Burnaz ve ark 2017, Köksal ve ark 2017, Tohma ve ark 2017) gibi gıda maddelerinden (Wang ve ark 2015); boya (Santos ve ark 2015, Varache ve ark 2017), yüzey aktif madde (Jan-E ve ark 2016, Wang ve ark 2017) gibi endüstriyel kimyasallara; pestisitler (Rejczak ve Tuzimski 2017, Yağub ve ark 2017), fenoller (Ferrerres ve ark 2017, Hsu ve ark 2017), herbisitler (Behniwal

ve She 2017, Scheel ve Tarley 2017) gibi kirleticilerden uyuşturucu maddelere (Labutin ve Temerdashev 2015, Jin ve ark 2017) ve klinik tıp uygulamalarına (Akamine ve ark 2017, Yasukawa ve ark 2017) kadar çok geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmuştur (Skoog 2013).

Son yıllarda kromatografik ayırma yöntemlerinde meydana gelen gelişmeler, birçok kimyasal ve biyokimyasal örnek analizlerinde devrim yaratıcı niteliğe sahip olmasına rağmen, yöntem halen bazı türlerin tayininde yetersiz kalmaktadır. Linoleik asit, araşidonik asit, dokosaheksaenoik asit gibi ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin non-enzimatik otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitlerden kaynak alan, toksik etkili bir sekonder ürün olan ve oksidatif hasarın biyo belirteci olarak yaygın bir şekilde kullanılan malondialdehit (MDA), tayininde yetersiz kalınan türlerden sadece bir tanesidir. MDA'nın; protein, lipid ve nükleik asitler gibi çeşitli biyomoleküllerle reaksiyon vererek, birçok kronik hastalık başta olmak üzere, kanser, diyabet, akciğer, karaciğer ve parkinson hastalıklarının patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle 1960'lardan günümüze peroksidasyonun şiddetini belirlemek için MDA'nın doku düzeylerindeki analizi için düşük tayin sınırı ve geniş lineer aralıkta seçici ve hassas bir yöntem geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Şüphesiz bu analizlerin doğru ve bir o kadar da hızlı olarak yapılması birçok bilinmeyen de çözümü demektir. MDA tayini için UV-visible (Zinellu ve ark 2011), floresans (Cooley ve Lunte 2011), yüzey artırılmış raman spektroskopisi (Zhang ve ark 2010), kütle spektrometrisi (Chen ve ark 2011), elektron yakalama dedektörü (Stalikas ve Konidari 2001), HPLC (Cheng ve ark 2008) cihazlarının kullanımı ile çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu tayin teknikleri bazı ayırma teknikleriyle kombine edilerek türe karşı duyarlılığı artırmak hedeflenmiştir. Ancak, bu ayırma teknikleri genellikle pahalı donanımların yanı sıra, uzun bir süreç ve biyomoleküllerin denatürasyonuna sebebiyet verebilecek etiketleme işlemleri gerektirmekte olduğundan MDA tayini için yetersiz kalmaktadır (Yuan ve ark 2013). Ayrıca, metot validasyonu ve de numune ön hazırlığı sürecinin uzun olması da bu metotların diğer dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle çağımızın teknolojisi olan nano teknolojinin sunduğu imkânlardan yararlanarak bahsi geçen dezavantajları bertaraf eden çok daha hızlı, daha hassas, maliyeti çok daha düşük bir yöntem geliştirilmesi gerekliliği ortaya

çıkmiş ve son yıllarda bilim dünyasında hızla değer kazanan biyosensörlerin bu amaçla kullanılabilirliği araştırılmaya başlanmıştır. Elektrokimyasal teknikler kullanılarak geliştirilen ve etiket gerektirmeyen biyoalgı sistemleri; yüksek hassasiyeti, düşük maliyeti, basit uygulamaları ve minyatürizasyonunun kolaylığı nedeniyle biyomoleküllerin kantitatif tayini için önemli bir analitik metot haline gelmiştir (Karimi ve ark 2017, Okon ve Ronkainen 2017, Presnova ve ark 2017, Xu ve ark 2017). Söz konusu alanda, elektrot yüzeylerinin çeşitli nano malzemelerle türevlendirilip (Oztekin ve ark 2012, Hallaj ve Haghghi 2017, He 2017, Liu ve ark 2017, Madrakian ve ark 2017, Zarei ve Khodadadi 2017, Zhou ve ark 2017) türe karşı seçiciliğinin ve hassasiyetinin artırılabilceği göz önüne alındığında bilim insanlarına yeni kapılar açabilecek mahiyette olan çok sayıda biyosensör tasarlanabileceği görülmektedir.

Bu tez çalışmasında; söz konusu araştırmalardan yola çıkılarak, birçok hastalığın patogenezinde rolü olduğu düşünölen MDA'nın plazma havuzunda ölçümünün yapılabilmesi için seçici, hassas, kısa sürede yanıt alınabilen bir sensör tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan sensörün performansının değerdendirebilmesi ve mevcut analiz yöntemlerine göre avantajlarının ortaya konulması için kolorimetrik ve kromatografik yöntemler ile de plazma havuzunda MDA düzeylerinin ölçümünün yapılmıştır. Çalışmada, her bir yöntem için ayrı ayrı biyokimyasal ve kimyasal metodolojik analizler yapılarak veriler değerdendirilmiş böylece farklı metotlarla elde edilen verilerin kıyaslamasının yapılarak MDA ölçümü için en uygun analitik metodun tanımlanması hedeflenmiştir. Çalışmalarda, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında rutin analizleri yapılmış hasta plazma havuzunun arta kalan kısımları kullanılmıştır. Kolorimetrik ve HPLC analizleri S.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD Araştırma Laboratuvarında ve biyosensör tasarımı Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde mevcut cihazlar ile gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmanın, gelecekteki çok yönlü araştırmalar için bir başlangıç olacağı ve de katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

1.1. MDA'nın Yapısı, Oluşum Mekanizması ve Metabolizmadaki Etkileri

Canlı organizmalar metabolik fonksiyonların devamlılığı için moleküler oksijeni kullanmak zorundadırlar. Metabolik olaylar sırasında elektronların oksijene aktarılamaması sonucu serbest radikaller oluşur. Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan, radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılan ve böylece herhangi bir sitotoksositeye neden olmayan serbest radikaller; bir atomun dış yörüngesinde veya molekül orbitalinde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron bulunduran oldukça reaktif kimyasal ürünlerdir (Tamer 2000, Gözükara 2010). Mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyaranla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olayları organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başında gelmektedir. Bunun yanı sıra iyonizan radyasyon, hepatotoksinler, alloksan parakuat gibi redoks siklusu yapan maddeler, kemoterapötikler, hava kirliliği ve radyasyon da radikal oluşumunda etkili olan eksojen kaynaklardır (Kırkalı 2002). Birçok kaynaktan üretilen radikalik yapıların metabolizmaya zarar vermeden ortadan kaldırılmasında görev alan antioksidan sistemlerde işleyiş bozulduğu durumda bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Serbest radikallerin dokulara etkisiyle membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri okside olur, böylece lipid peroksidasyon süreci başlar, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşmesi sonucunda da sistemik dolaşımda oksidatif hasarın düzeyinin saptanmasında kullanılan dolaylı bir belirteç olan metabolik ürün MDA oluşur. Lipid peroksidasyon basamakları ve MDA oluşum basamakları Şekil 1.1.'de verilmiştir. Buna göre;

1.Basamakta; Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisi ile membran yapısında bulunan konjuge olmayan çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplardan bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlamaktadır (Aruoma ve ark 1989). Demir, bakır gibi eşleşmemiş elektronlara sahip geçiş metal iyonlarının varlığı, peroksidasyonun başlaması için gereklidir (Akkuş 1995, Toy 2012).

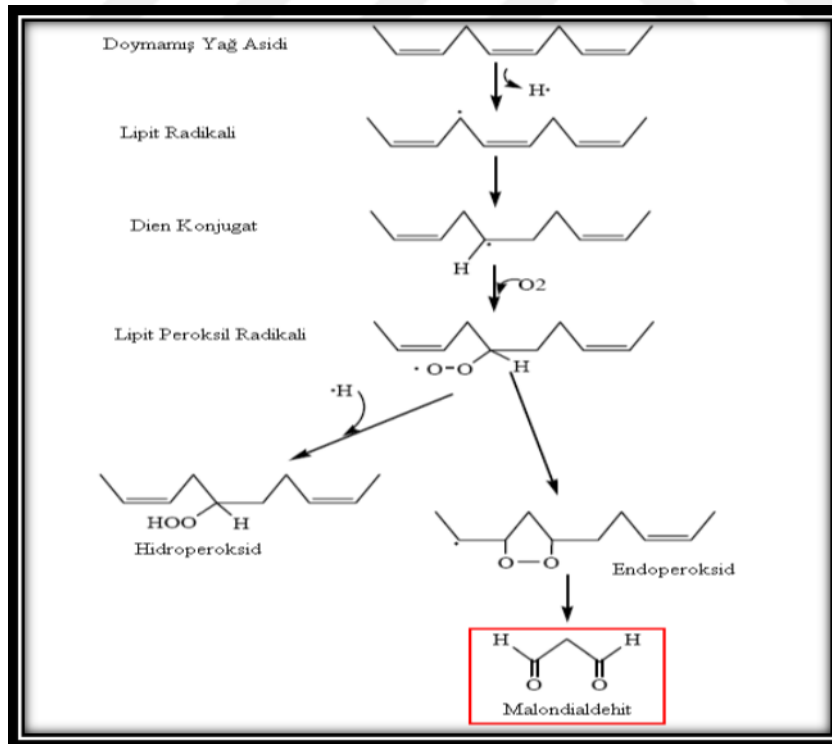
2.Basamakta; Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden radikalik H ayrılması, yağ asidi zincirinin radikal haline dönüşmesine neden olmaktadır.

Oluşan lipit radikali (L●), dayanıksız bir bileşik olup, molekül içi çift bağ aktarılması sonucunda dien konjugatlarına dönüşmektedir. Dien konjugatlarının moleküler oksijen (O₂) ile reaksiyonu sonucu lipit peroksil (LOO●) radikali oluşmaktadır (Köse 1992).

3.Basamakta; Lipid peroksil radikali, diğer bir peroksi radikaliyle birleşebileceği gibi membran proteinleri ile de etkileşebilir, fakat en önemlisi peroksi radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksitatif zincir reaksiyonunu başlatmalarıdır. Yan zincirden hidrojen atomu çıkarılması ile her defasında lipit peroksitleri ve yeni bir lipit radikali oluşmaktadır (Gutteridge ve Halliwell 1990).

4.Basamakta; Lipid peroksitleri ortamdaki hidrojen atomları ile reaksiyona girerek lipit hidroperoksitleri ya da siklik peroksitleri oluşturabilmektedirler.

5.Basamakta; Siklik peroksitler yeniden düzenlenme ile endoperoksitlere, daha ileri oksidasyon ile de MDA'ya dönüşürler.



Şekil 1.1. Lipid peroksidasyon basamakları ve MDA oluşumu (Moslen 1994)

Serbest radikallerden etkilenen membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda oluşan başlıca bir sekonder ürün olan

MDA'nın uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip olması sebebiyle dokulardaki düzeyleri 1960'lı yıllardan günümüze peroksidasyonun şiddetini belirlemek için kullanılmaktadır (Öğüş ve ark 2004, Kaçmaz 2013). MDA doymamış yağ asitlerinin non-enzimatik peroksidasyonu sonucu oluşabildiği gibi, eikazonoidlerin enzimatik metabolizması, prostaglandin biyosentezi, trombositlerde araşidonik asit katabolizması sonucunda da oluşabilmektedir. Ortamın pH değerine bağlı olarak değişik izoformlarda bulunan MDA, fizyolojik pH değerinde serbest enolat formunda, amino gruplarına karşı düşük reaktivite gösterirken düşük pH değerinde reaktivitesinin artmasından dolayı proteinleri de olumsuz etkilemektedir. MDA, özellikle lizin kalıntıları olmak üzere histidin, tirozin, arjinin ve metiyonin kalıntılarında modifikasyonlara, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağların oluşmasına neden olmakta, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamasına rağmen lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi korelasyon gösterdiği için oksidatif hasarın sistemik dolaşımında düzeyi saptanabilen dolaylı bir göstergesi olarak kullanılabilir (Gönenç ve ark 2001, Koca 2007, Kaçmaz 2013). MDA'nın hücre membranlarının geçirgenliğini artırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içinde aşırı Ca^{+2} birikimine yol açması sonucu hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu ve bu özellikleri ile de mutajenik ve genotoksik bir bileşik olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Ignarro ve ark 1987, Repine ve ark 1997, Heller ve ark 2000, Del Rio ve ark 2005, Gülbayzar 2006). Non-enzimatik oksidatif lipid peroksidasyonu sonucu plazmada konsantrasyonu artan MDA'nın; proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkiye neden olduğu ve bunun sonucunda da birçok kronik hastalık başta olmak üzere, kanser, diyabet, akciğer, karaciğer ve parkinson hastalıklarının patogeneğinde etkili olduğu ve bu sekonder ürünün hastalık sürecinde önemli rolleri olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Imai ve ark 2008, Silverstein ve Febbraio 2009, Breusing ve ark 2010, Wu ve ark 2010, Chao ve ark 2012, Yuan ve ark 2013). Birçok hastalığın patogeneğinde etkili olması nedeniyle, MDA analizleri için, düşük tayin sınırı ve geniş lineer aralıkta seçici ve hassas bir yöntem geliştirilmesi önem arz etmektedir. Söz konusu durum, hastalıkların izlenmesi, erken tanı ve etkin tedavisi açısından önemlidir.

Şüphesiz bu analizlerin doğru ve bir o kadar da hızlı olarak yapılması birçok bilinmeyen de çözümü demektir.

1.2. MDA Tayin Yöntemleri

MDA tayini için UV-visible (Zinellu ve ark 2011), floresans (Cooley ve Lunte 2011), yüzey artırılmış raman spektroskopisi (Zhang ve ark 2010), kütle spektrometrisi (Chen ve ark 2011), elektron yakalama dedektörü (Stalikas ve Konidari 2001) ve HPLC (Cheng ve ark 2008) cihazlarının kullanımı ile çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Yuan ve ark 2013). Biyolojik numunelerdeki serbest radikal aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak en yaygın ve kolay uygulanan metot tiyobarbitürik asit (TBARS) metodudur ve günümüzde halen MDA tayini için sıklıkla bu yöntem kullanılmaktadır (Esterbauer ve ark 1991, Erden 1992, Batmaz 2009, Çalışır 2015, Sarıca ve Liman 2016). Bunun yanı sıra gerek numune ön hazırlığının nispeten daha kolay olması gerekse otomatik pipetleme yapılması ile pipetaj hatalarını bertaraf etmesi nedeniyle HPLC sistemlerinin kullanıldığı yöntemler geliştirilmiş; ancak metot validasyonunda mutlak bir başarıya ulaşılamaması nedeniyle bu tayin teknikleri bazı ayırma teknikleriyle kombine edilerek türe karşı duyarlılığı artırmak hedeflenmiştir. Fakat bu ayırma teknikleri pahalı donanımların yanı sıra, uzun bir süreç ve biyomoleküllerin denatürasyonuna sebebiyet verebilecek etiketleme işlemleri gerektirmekte ve bu nedenle, bu yöntemler MDA tayini için yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, metot validasyonu ve de numune ön hazırlığı sürecinin uzun olması bu metotların dezavantajlarını oluşturmaktadır. Elektrokimyasal teknikler kullanılarak geliştirilen ve etiket gerektirmeyen biyoalgı sistemleri; yüksek hassasiyeti, düşük maliyeti, basit uygulamaları ve minyatürizasyonunun kolaylığı nedeniyle biyomoleküllerin kantitatif tayini için önemli bir analitik metot haline gelmiştir. MDA tayini için çok daha hızlı, daha hassas, maliyeti çok daha düşük bir yöntem geliştirilmesi gerekliliği son yıllarda bilim dünyasında hızla değer kazanan biyosensörler için yeni bir uygulama alanı açmıştır (Yuan ve ark 2013).

1.3. Kolorimetrik Yöntem

Milattan önceki dönemlerde şarap içerisindeki demirin tayini amacıyla kullanılan ve renk ölçülmesi esasına dayanan gravimetrik tayin yöntemine kolorimetri denir. Bir çözelti ortamında bulunan konsantrasyonu bilinmeyen bir madde tarafından oluşturulan rengin, aynı maddenin konsantrasyonu bilinen bir seri standart çözeltisinde oluşturduğu renklenmeler ile karşılaştırılması suretiyle yapılan tayine kolorimetrik analiz, bu tip tayinlerde kullanılan cihazlara da kolorimetre adı verilir. Optik yöntemlerden biri olan kolorimetrik analiz, absorpsiyon temelli bir ölçüm sistemidir. Çözelti ortamında bulunan renkli maddelerin konsantrasyonu direkt olarak kolorimetrik veya spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilebilir. Eğer analizi yapılacak madde renksiz ise uygun bir renklendirici reaktif ile renklendirilmelidir. Kolorimetride konsantrasyonu bilinen bir maddenin konsantrasyonu bilinmeyen maddelerle karşılaştırılmasını temel alan ve karşılaştırma tarzı her birinde farklı olan 4 tip çalışma yöntemi vardır. Bu yöntemler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

A. Dengeleme Yöntemi: Konsantrasyonu bilinmeyen numune saydam bir silindirik tüp içerisine alınarak üzerine renklendirici reaktif ilave edilir. Numuneye ait standart çözelti de aynı şekilde renklendirici reaktifle renklendirilip bir diğer tüpe alınır. Çözeltilerin tüpteki yükseklikleri belli bir sabit değere ayarlanarak her iki tüp de aşağıdan aynı kaynakla aydınlatılır ve yukarıdan gözlemlenir. Her iki tüpün renkleri aynı şiddette görülünceye dek numune tüpü hareket ettirilir ve optik yol değiştirilir. Bu anda geçen ışıkların şiddetleri aynıdır ve Lambert-Beer yasası uygulanarak ve ilgili eşitlikler kullanılarak konsantrasyon hesabı yapılır.

B. Seyreltme Yöntemi: İç çapları aynı olan (optik yolları eşit) dereceli cam tüplerden birine konsantrasyonu belirlenecek madde diğerine ise bu maddeye ait standart çözelti konularak uygun reaktif ilavesiyle renklendirilir. Bu iki çözeltilerden nispeten koyu renkli olanı ikisinin rengide birbirine eşit oluncaya kadar seyreltilir. Dereceli olan cam kaptaki seyrelmeden sonraki hacim okunur ve Lambert-Beer yasası eşitlikleri uygulanarak yeni konsantrasyon hesaplanır.

C. Ciftleme Yöntemi: Dereceli bir tüpte konsantrasyonu bilinmeyen numune ve renklendirici reaktif karıştırılır. Bir diğer tüpe aynı miktarda çözücü ve renklendirici reaktif alınarak tayini yapılacak olan maddenin rengi bilinmeyen numunenin rengiyle aynı oluncaya dek standardın ayarlı derişik çözeltisi büretten ilave edilir. Standardın konsantrasyonu hesaplanarak bilinmeyen konsantrasyonu belirlenir.

D. Standart Seri Yöntemi: Tayini yapılacak maddenin bir seri standart çözeltisi hazırlanır. Renklendirici reaktif hem tayini yapılacak maddeye hem de standartlara ilave edilerek numune ve standartlar karşılaştırılır. Bu karşılaştırma için iki farklı yöntem izlenebilir. Bunlar;

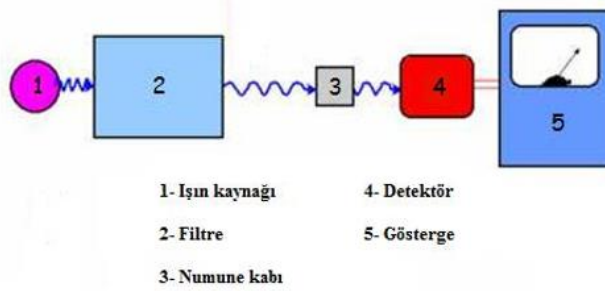
- **Direk Karşılaştırma:** Bu yöntemde standartlar ve tayini yapılacak numune aynı boyutlardaki tüplere aynı yükseklikte olacak şekilde alınır. Tüpler aşığıdan aydınlatılarak gözlemlenir ve hangi standart numunenin rengi ile eşleşiyorsa numunenin konsantrasyonu o standardın konsantrasyonuna eşittir. Ancak standart seriler birbirine çok yakın konsantrasyonlarda hazırlanmışsa yöntemin duyarlılığından bahsedilebilir.
- **İndirek Karşılaştırma:** Numune absorbansı ya da transmitansının ölçülmesini temel alır. Standartların konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans ya da transmitans değerleri grafiğe geçirilir. Tayini yapılacak olan numunenin aynı reaktifle çözeltisi hazırlanarak absorbans veya transmitansı ölçülür, grafikten bu ölçülen değere karşılık gelen konsantrasyon değeri bulunur. Analizci hatası söz konusu olmaması, hata oranının %1'den daha az olması sebebiyle eser miktardaki maddelerin tayininde gravimetrik ve titrimetrik yöntemlerden çok daha avantajlıdır. Bu teknikte tek bir standart kullanılarak, numune ve standardın absorbans ya da transmitans değerleri karşılaştırılarak da sonuca ulaşmak mümkündür; ancak seri standardın kullanıldığı yöntem nazaran duyarlılığı düşüktür.

1.3.1. Kolorimetre

Renkli bileşikler oluşturan maddelerin analizinde önemli bir yer tutan kolorimetride; Nessler tüpü, Duboscq kolorimetresi gibi basit araçlar veya filtrelili fotometre, spektrofotometre gibi enstrümental cihazlar kullanılabilir. Spektrofotometrenin görünen alanda çalışan bir bölümü olan kolorimetri, spektrum taraması yapamamaktadır. Bu nedenle günümüzde yerini daha komplike sistemlere bırakmıştır. Renk karşılaştırılmasında insan gözünün dedektör olarak görev aldığı kolorimetrelerde; göz yerine renkli cam, jelatin veya plastikten yapılmış renkli filtreler ve fotoelektrik kolorimetreler olarak adlandırılan fotoelektrik hücreler de kullanılabilir. Bu tip cihazların yanı sıra kullanım kolaylığı sağlayan hazır test kitleri de kolorimetrik tayinler için sıklıkla tercih edilmektedir. Kolorimetrik testlerin temel mantığı numune çözeltisine eklenen reaktifin numune ile bir renk reaksiyonu oluşturmasıdır.

1.3.2. Kolorimetrenin ana bileşenleri

Şekil 1.2.'de görüldüğü gibi; ışın kaynağı (sıradan düşük voltajlı filament lamba), ışının absorpsiyonunu sağlamak için kullanılan renkli filtreler, numune kabı, iletilen ışığı ölçmek için kullanılan dedektör ve kaydedici kolorimetrenin ana bileşenlerini oluşturur.



Şekil 1.2. Kolorimetrenin ana bileşenleri

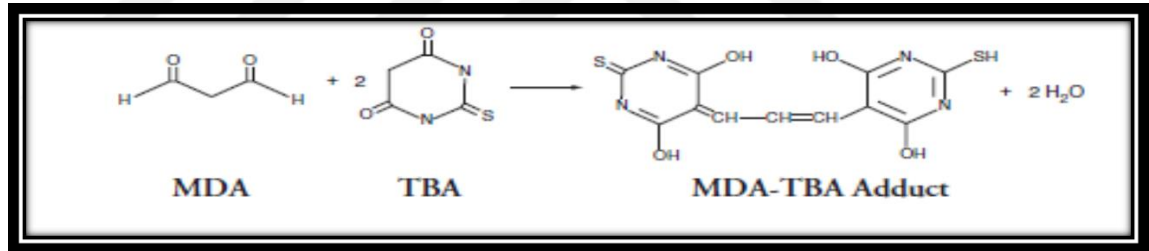
1.3.3. Kolorimetrenin çalışma prensibi

Laboratuvar ortamında kolorimetrik analizler için genellikle fotometreler ve spektrofotometreler kullanılmaktadır. Fotometrelerde geçen ışık yalnızca görülen dalga boyundaki ışık iken, spektrofotometrelerde hem görülen dalga boylarında hemde UV ışık olabilmektedir.

Fotometrelerde bulunan ışık kaynağından çıkan ışık, her analizde ilgili reaktiflerin ortama ilavesi ile oluşan renge göre spesifik dalga boyunda ışık üretmeye yarayan bir filtreden geçer. Filtreden geçen ışık; içerisinde numune olan küvete gelir ve bu küvetten numunenin içindeki konsantrasyonla orantılı olarak absorblanarak fotoşele geçer. Fotosel ise, gelen ışığı elektrik enerjisine dönüştürerek ölçümü gerçekleştirmiş olur. Spektrofotometrede ise filtreler yerine oldukça hassas dalga boyu seçimi yapabilme olanağı sağlayan prizmalar kullanılmaktadır.

1.3.4. Kolorimetrik yöntem ile MDA tayini

TBARS yöntemi, biyolojik sistemlerin lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan kolorimetrik analiz yöntemidir. Yöntemin esası numunelerin asidik şartlarda (pH=3,4) ısıtılmasıyla meydana gelen MDA-TBA kompleksinin 400-700 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntemle tayinine dayanır (Şekil 1.3.) (Uchiyama ve Mihara 1978).



Şekil 1.3. MDA'nın asidik şartlarda TBA ile oluşturduğu MDA-TBA kompleksi

Yapılan çalışmalarda; kolorimetrik yöntemin basit ve uygulanabilir olmasına rağmen, TBA'nın diğer karbonil içerikli bileşikler olan sialik asit, prostaglandin, deoksiriboz ile interferans oluşturması nedeniyle seçici olmadığı (Halliwell ve Gutteridge 1990, Hong ve ark 2000), lipid olmayan, MDA'ya benzer maddelerin interferansı ve TBA reaktif maddelerin oluşumundan dolayı doku ve plazma örneklerinde MDA miktarının normalde olduğundan daha yüksek ölçüldüğü (Janero 1990), plazma yağ asitlerinin, TBA ile 95°C'de ısıtıldığında oksitlenebilmesi sebebiyle sonuçların beklenenden çok daha yüksek çıktığı (Templar ve ark 1999), TBARS metoduyla alınan ölçümlerde gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında alınan sonuçlardaki tutarsızlık sebebiyle

TBARS testinin lipid peroksidasyon olayının değerlendirilmesinde non-spesifik olduğu (Mendes ve ark 2009) rapor edilmiştir.

Mendes ve arkadaşlarının 2009 yılında birden fazla modifiye edilmiş TBARS metodu üzerine yaptıkları araştırmalarında, recovery değerini %71 olarak bulmaları metodun yetersizliğinin bir diğer bulgusu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bahsi geçen tüm bu olumsuzluklar nedeniyle MDA'nın daha duyarlı, spesifik ve tutarlı tayininin gerçekleştirilebilmesi için araştırmacılar yeni alternatiflere yönelmeye başlamışlar ve böylece MDA tayini için kromatografi temelli yöntemler kullanılmaya ve geliştirilmeye başlanmıştır.

1.4. Kromatografik Ayırma Teknikleri

Kromatografi; diğer ayırma tekniklerinin kullanımıyla ayrımı mümkün olmayan kompleks karışımlarda bulunan birbirine benzer özellik taşıyan bileşenlerin hareketli faz ve sabit faz olarak ifade edilen iki faz arasında farklı dağılıma eğilimlerinden yararlanılarak ayrılması, saflaştırılması, tanınması ve tayininde yaygın olarak kullanılan ve birçok farklı yöntemi bünyesinde barındıran analitik yöntem olarak tanımlanmaktadır (Skoog ve Leary 1992, Skoog ve ark 1998, Wiberg 2004, Hacettepe Üniversitesi 2005, Gündüz 2007, Fatma 2009, Gezici 2010). Karışımlardaki bileşenleri diğer bileşenlerden gelebilecek girişimlerden etkilenmeden ayrı ayrı tayin etmek amacıyla kullanılacak sınırlı sayıda kimyasal ve enstrümental teknik mevcuttur. Herhangi bir ön işlem uygulanmadan karışımlarda bulunan bileşenlerin eş zamanlı tayinin yapılarak her bir bileşen hakkında kalitatif ve kantitatif verilere ulaşmak kromatografik ayırımların çıkış noktası ve temel hedefi olmuştur (Dewani ve ark 2015, Zhao 2015, Karimi-Maleh ve ark 2016, Chen ve ark 2017, Ghassemi ve ark 2017). Günümüzde birçok alanda ayırma ve saflaştırma yöntemi olarak yaygın bir şekilde kullanılan kromatografi için kullanım alanı ve amacına uygun çok sayıda teknik geliştirilmiş olduğundan bu teknikleri basit bir şekilde sınıflandırmak oldukça zordur (Gezici 2010). Kromatografik ayırma yöntemlerini/tekniklerini genel olarak dört ana başlık altında toplamak mümkündür:

A. Numunedeki bileşenlerin sabit faz üzerindeki ilgili absorpsiyon izotermlerine göre;

- Lineer kromatografi: Numunedeki bileşenler lineer izoterm sergilemekte ve bu nedenle gözlenen kromatografik bantların konumu ve şekli konsantrasyondan bağımsız olmaktadır. Gözlenen bantlar Gaus eğrisine benzemektedir.
- Lineer olmayan kromatografi: Numunedeki bileşenler lineer izoterm sergilememekte bu nedenle bantları yeri ve şekli konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermektedir (Guiochon ve ark 2006). Kromatografinin ilk uygulanan türlerinden biri olan bu yöntem, preparatif amaçlar için kullanılabilir gibi; sabit faz ile analit arasındaki sorpsiyon izotermelerinin türetilmesi amacıyla da kullanılabilir ve buna frontal kromatografi adı verilmektedir.

B. Hareketli faz ve sabit fazın fiziksel haline göre;

Bu sınıflandırma türünde genel bir kabul olarak; önce hareketli faz, sonra sabit fazın fiziksel hali belirtilmektedir. Eğer sadece sıvı kromatografisi veya gaz kromatografisi gibi tek bir fiziksel hal vurgulanmışsa bu, hareketli faz ile ilişkilendirilmelidir. Buna göre hareketli faz ve sabit fazın fiziksel haline göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

- Sıvı-Sıvı kromatografisi
- Sıvı-Bağlı-faz kromatografisi
- Sıvı-Katı kromatografisi
- Gaz-Sıvı kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi

C. Hareketli faz ile sabit fazın birbiriyle fiziksel olarak temasına göre;

- Kolon kromatografisi (Sıvı Kromatografisi, Gaz Kromatografisi, Süperkritik Akışkan Kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
- Düzlemsel Kromatografi (İnce tabaka kromatografisi, Kâğıt kromatografisi)

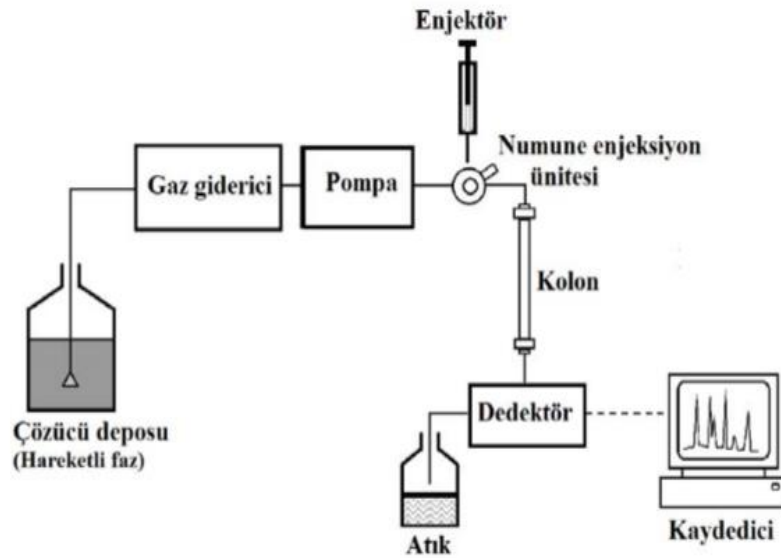
D. Numunedeki bileşenlerin ayrılmasında rol alan fiziksel veya kimyasal mekanizmalara göre;

- Adsorpsiyon Kromatografisi

- Dağılıma Kromatografisi
- İyon-Değişirme Kromatografisi
- Ligand-Değişirme Kromatografisi
- Boyut Eleme Kromatografisi

1.4.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Küçük dolgu maddeleri ile doldurulmuş kolonlarla yüksek basınç altında bir mobil fazın kolon içerisinden geçirilmesiyle yapılan kromatografi türüdür. Duyarlılığı, doğruluğu, kantitatif tayinler için kolay uygulanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklık karşısında kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına olanak sağlaması nedeniyle ilaç endüstrisinden klinik tıp uygulamalarına, uyuşturucu madde tayininden tarım ilaçları analizine, endüstriyel kimyasallardan gıda maddelerinin analizine kadar birçok alanda uygulama imkanı bulmaktadır. Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik ve maliyet gerektirmektedir (Albayrak 2014). Şekil 1.4.'te HPLC ünitesini oluşturan parçalar görülmektedir.



Mobil Faz : Analiti taşıyan hareketli fazdır. Mobil faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik çözücülerden oluşur. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri ayrımı direk etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçimi yapılmalıdır. İzokratik akış uygulanan çalışmalarda mobil faz önceden karıştırılıp hazırlanır, Gradient çalışmalarda karışım değişik zamanlarda değişik oranlarda yapılabilir. Bu sayede analiz kalitesi artırılıp, analiz süreleri azaltılabilir.

Degazör : Mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar, kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır.

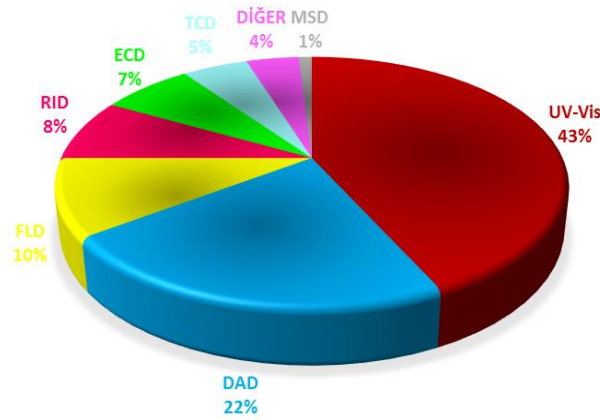
Pompa: Temel olarak mobil fazın yüksek basınçla sistem içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir.

Enjektör: Numunelerin kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. Temel olarak örnekleyiciler manuel ve oto örnekleyici olmak üzere iki tiptedir;

Kolon-Kolon Fırını: Kolon maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Kolonlar genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolgu maddesiyle doldurulmuştur. Polimer kolonlar silika bazlı olanlara göre ortalama 3 kat daha uzun ömürlüdür ve rejenere edilebilmektedir. Kolon fırını kolonu saklamak ve sabit sıcaklıkta tutmak için kullanılmaktadır.

Dedektör: Kromatografik yöntemle ayrılan herhangi bir maddeye ilişkin anlamlı bir sonuç üretebilmesi için kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesi gerekir. Bir detektörün işlevi örneğin derişimi ile orantılı olacak şekilde elektrik sinyali üretmek ve monitöre göndermektir (Öksüz 2014). Kullanılacak dedektörün türü analizlenecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir. Örneğin doğrudan ya da örnek ile taşıyıcı faz arasındaki polarite farklılığına göre ölçümüne olanak sağlayan çok sayıda dedektör HPLC sistemlerinde kullanılabilir. HPLC’de en fazla kullanılan dedektörler UV-Vis, Diode Array Dedektör (DAD), Floresan Dedektör (FLD), Refraktif İndeks Dedektör (RID), Termal İletkenlik Dedektörleri (TCD), Elektrokimyasal Dedektör (ECD)

ve Kütle Spektrometri Dedektörleri (MSD)'dir. Bu dedektörlerin kullanım yoğunluğu Şekil 1.5.'te verilmiştir (Bilber 2010).



Şekil 1.5. HPLC sistemlerinde kullanılan dedektörlerin kullanım yüzdeleri

A. UV-Vis Dedektörler;

Ultraviyole ve görünür bölge ışınlarının absorblanması prensibine dayanan bu dedektör türü ile tek ve çok dalga boylarında ölçüm yapılabilmektedir. Tek dalga boyu ile çalışan, kantitatif tayin için Beer Yasası'nın temel alındığı UV-VIS dedektörlerde ışın, numune bölmesine gönderilerek örneğin bu dalga boyundaki absorpsiyonu ölçülür.

B. DAD Dedektörler;

Döteryum lambadan çıkan polikromatik ışının doğrudan numune bölmesine gönderildiği ve buradan çıkan ışının slit ve bir diod serisi ile dalga boylarına ayrıldığı bu dedektör türünde, elde edilen spektrum yardımıyla numune ile ilgili kantitatif bilgi sağlanmaktadır.

C. Floresan Dedektörler (FLD);

Işın kaynağı olarak ksenon lambası ve optik ağ monokromatörünün kullanıldığı floresan dedektörler; bir ışın ile uyarılan elektronların ışığı absorplaması ve tekrar temel hallerine dönerken foton yaymaları esasına dayanır.

D. Refraktif İndeks Dedektörleri (RID);

İlk geliştirilen dedektör olması ve birçok madde için kullanılabilir olmasına rağmen kötü dedeksiyon limitleri dolayısıyla kullanılması tercih edilmemesine rağmen bu dedektör türü polimerik yapıların, karbonhidratların ve trigliseritlerin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Temel olarak hücrenin yarı bölmesinden dedektöre sürekli olarak çözücünün geldiği, kolondan gelen eluatin ise hücrenin diğer bölmesinden geçtiği ve sürekli hücreden geçen ışının kırılma oranına bağlı olarak kantitatif analiz yapıldığı detektörlerdir.

E. Elektrokimyasal Dedektörler (ECD);

Redükte ya da okside olabilen bileşiklere karşı hassas olan bu dedektör türünde; çalışma, referans ve karşıt olmak üzere üç adet elektrot bulunmaktadır. Belirlenen optimum voltaj değerinde çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasındaki potansiyel farkı numune varlığında tespit edilerek kantitatif tayin yapılmaktadır. Amperometrik, kulometrik ya da polarografik olarak tayin yapılabilen elektrokimyasal dedektörler optik dedektörler kadar yaygın kullanılmaları da hassasiyetleri oldukça yüksektir.

F. Termal İletkenlik Dedektörü (TCD);

Gaz akımındaki ısısal iletkenliğin değişiminin ölçülmesi prensibine dayanan bu dedektör türünde taşıyıcı gaz olarak helyum ve hidrojen gazları kullanılır. Bu dedektörlerin inorganik ve organik maddelere duyarlı olması, numune stabilitesinin korunması ve geniş cevap aralığına sahip olması gibi avantajlarına rağmen düşük duyarlılığı nedeniyle kullanımı yaygın değildir.

G. Kütle Spektrometri Dedektörleri (MSD);

İnorganik, organik ve biyolojik yapıların aydınlatılması, karmaşık bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayini ve bir yapıdaki atomların izotop oranlarının belirlenmesi amacıyla sıklıkla tercih edilen bu dedektör türünde HPLC'den ayrılmış olarak gelen analitler detektörün iyonlaştırma bölümünde yüklü parçacıklar haline getirilirler. İyonlaşan moleküller ise kütle analizörlerine gönderilerek kütle/yük oranına göre ayrılırlar.

1.5. Biyosensörler

Sıvı veya gaz ortamında bulunan analizi yapılacak hedef molekülün kalitatif veya kantitatif olarak tayini ve izlenmesindeki fiziksel olguları elektrik sinyallerine dönüştüren aygıtlar olarak tanımlanan sensörler; diğer tekniklere göre daha hızlı, daha hassas, daha güvenilir sonuçlar veren ve maliyeti düşük olan araçlardır (Niu ve ark 2007, Muhammet 2008, Öztekin 2008, Kalimuthu ve John 2009, Oztekin ve ark 2010a, Oztekin ve ark 2010b, Oztekin ve ark 2010c, Gomathi ve ark 2011, Oztekin ve ark 2011a, Oztekin ve ark 2011b, Oztekin ve ark 2011c, Oztekin ve ark 2011d). Sahip oldukları üstün özellikler ve avantajlarından dolayı sensörler, endüstri alanında; çeşitli proseslerin araştırılması, çevre alanında; kimyasal kirliliğin tespit edilmesi, tıp ve sağlık alanında; hayati öneme sahip yapıların kalitatif ve kantitatif tayini, ilaçların hücre içi etkilerinin incelenmesi, savunma alanında gerek biyolojik savaş ajanlarının gerek belirlenmesinde gerekse takibinde kullanılmaktadırlar. Çalışma şekillerine ve dönüştürücü yapılarına göre farklı şekilde isimlendirilen sensörlere ait genel bir sınıflandırma Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Sensörlere ait genel bir sınıflandırma

SENSÖRLER		
Elektrokimyasal sensörler	Biyosensörler	Fiber-Optik Sensörler
Potansiyometrik sensörler	Enzim sensörleri	pH Sensörleri
Yarı iletken aygıtlarla kullanılan sensörler	Bağışıklık sistemi sensörleri	Metal-iyon Sensörleri
Amperometrik sensörler	Sabitleme sensörleri	Gaz Sensörleri

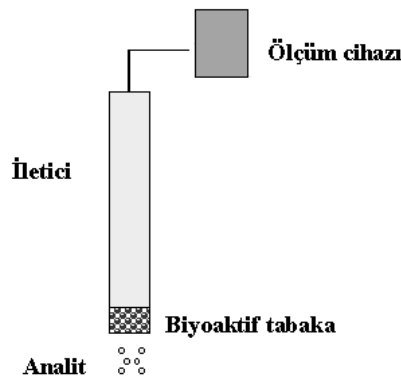
Sensörler arasında geniş bir uygulama alanı olan ve biyolojik analizler için kullanılan biyosensörler; kimya, biyokimya, biyoloji, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden faydalanılarak biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem

yeteneğinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkân sağlayan biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır (Telefoncu 1999, Egi 2009, Yılmaz 2011, Aydın 2012, Bal 2012).

Biyosensörler ile ilgili ilk çalışma 1950'li yıllarda L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kandaki oksijen miktarını bir elektrot (pO_2 -elektrot) ile izlemesiyle başlamıştır. 1962 yılında Clark ve Lyons oksido-reduktaz enzimi olan glukoz oksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır (Gooding 2006). Böylece biyolojik sistemin yüksek spesifikliği (enzim) ile fiziksel sistemin tayin duyarlılığını birleştiren, birçok biyolojik parametrenin tayinine yönelik çeşitli tipte biyosensörlerin geliştirilmesine olanak sağlayan, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüm yapma üstünlüğüne sahip yeni bir analitik sistem geliştirilmiştir (Battilotti ve ark 1989, Merkoçi ve ark 1999, Zhang ve ark 2000, Çubuk 2007, Hasançebi 2008, Özdemir 2010).

1.5.1. Biyosensörlerin temel bileşenleri

Birbiri içerisine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşan biyosensörlerde biyokimyasal çeviricinin görevi ise analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımak iken elektrokimyasal çeviricinin görevi bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli elektrik sinyali üretmektir (Toprakkıran-Mert 2010). Biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 1.6.'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Biyosensörlerin şematik gösterimi (Telefoncu 1999)

Şekil 1.6.'da görüldüğü gibi biyosensör sistemleri; seçici tanıma mekanizmasına sahip *biyoaktif tabaka (biyoajan)*, bu biyoaktif tabakanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen *sinyal iletici sistem (transduser)* ve bu sinyalleri ölçebilen bir *kaydedici* olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır (Akyüz 2011).

A. Biyoajanlar

Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkili olan, bir analitin tanınmasında biyosensörün analizi yapılacak maddeye karşı son derece duyarlı biyolojik hassasiyete sahip kısmını oluşturan biyoajanlar; biyokatalitik ve biyoaffinite olmak üzere 2 grup altında incelenirler (Akyüz 2011).

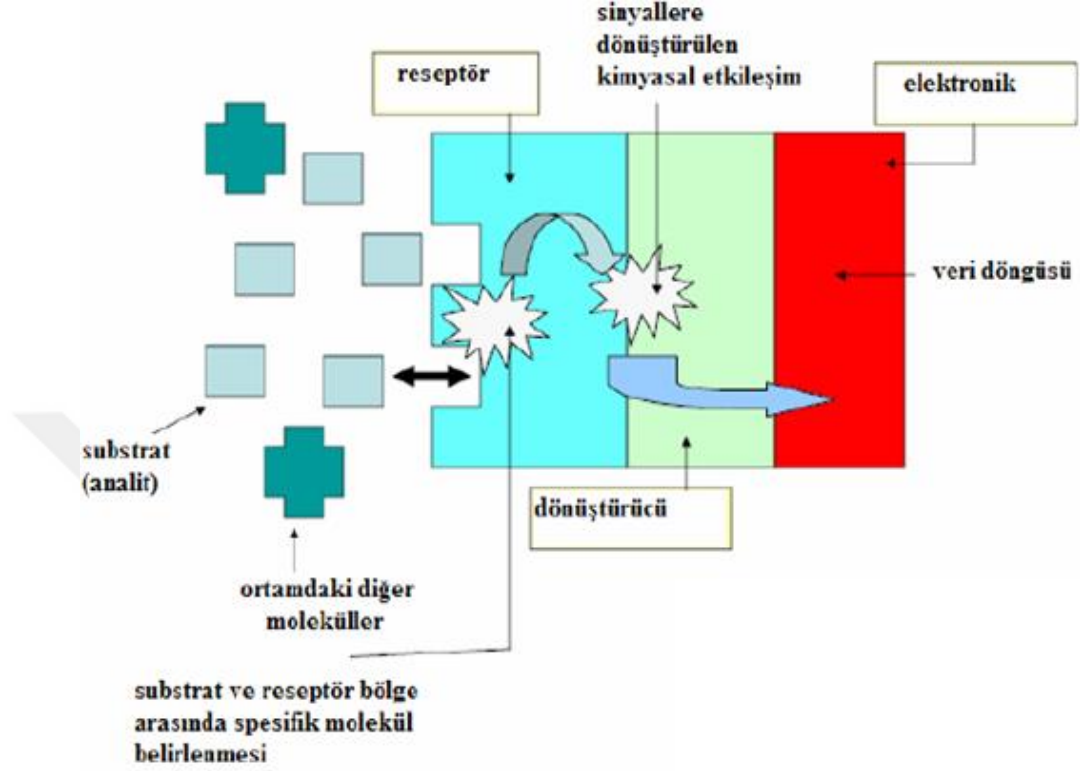
➤ ***Biyoaaffinite ajanları;*** Biyoaaffinite ajanları olan antikorlar, hormon reseptörleri, DNA, lektin gibi moleküller; antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Kompleks oluşumu sonucunda, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık emilmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olurlar.

➤ ***Biyokatalitik ajanlar;*** Biyokatalitik ajanları olan saf enzim ya da koenzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları kullanılarak analit üzerinde moleküler değişimin meydana gelmesi sağlanmakta ve bu dönüşüm sonucunda ortamda artan ya da azalan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir.

B. Sinyal çeviriciler

Sinyal çeviriciler, biyoajıcılar vasıtasıyla biyoaktif tabakada meydana gelen reaksiyonu ölçülebilir elektriksel bir sinyale çeviren cihazlardır (Yılmaz 2012). Çeviriciler, biyokimyasal reaksiyonun türüne göre seçilir. Potansiyel değişimi, elektron transferi, ışığın ürün veya reaktant tarafından yayılması veya absorbe edilmesi, sıcaklık veya kütle değişimi gibi olaylar çeviriciler ile tespit edilmektedir (Gerard ve ark 2002, Emre 2007, Eren 2008, Akyüz 2011).

Biyosensörün temel çalışma prensibi; biyo-elementin analiti tanınması ve bu analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal oluşturması ve bunları elektrik sinyaline dönüştürmesine dayanır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Biyosensörlerin çalışma prensibi (Dursun 2009)

Biyoaktif tabakanın türe karşı seçiciliğini artırmak amacıyla yüzey kimyasında meydana gelen gelişmelere paralel olarak, biyokatalitik bileşen ve elektrot yüzeyi arasında bir yük aktarımı sağlamak için elektrot materyalinin, elektron vericileri ya da alıcıları ile modifiye edilmesi gündeme gelmiş ve son yılların en popüler konularından biri olmuştur. Modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde elektron aktarımı daha düşük potansiyellerde gerçekleştirilebilmekte, bozucu türlerin etkisi azaltılabilmekte ve bunlara ek olarak belirli reaksiyonların oksijen bağımlılığına son verilebilmektedir. Ayrıca modifiye edilmiş elektrot yüzeylerine enzim immobilizasyonu yapılarak enzim elektrotların oluşturulması ile de hazırlanan yeni elektrotlar biyolojik türlerin tayininde yüksek hassasiyet ve seçicilikte kullanılabilmektedir.

1.5.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörlerin sınıflandırılması birçok şekilde yapılmakta ancak en yaygın sınıflandırma elektrodun analit ile etkileşmesi sonucu gerçekleşen fizikokimyasal sinyali elektrik sinyaline dönüştürerek, bu sinyalin güçlenerek okunabilir ve kaydedilebilir bir şekilde girmesine öncülük eden dönüştürücülerin türlerine göre yapılan sınıflandırmadır (Chaubey ve Malhotra 2002, Çubuk 2007, Yılmaz 2012). Buna göre biyosensörler; **(I)** Piezoelektrik biyosensörler, **(II)** Optik biyosensörler, **(III)** Kalorimetrik biyosensörler, **(IV)** İyon duyarlı (ISFET) biyosensörler ve **(V)** Elektrokimyasal biyosensörler olmak üzere sınıflandırılabilirler (Vural 2009).

➤ **Piezoelektrik biyosensörler**

Bir elektriksel polarizasyonun varlığını veya mevcut bir polarizasyondaki değişikliği kullanan piezoelektrik sensörler; karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik ağıtlardır. Piezoelektrik sensörlerde sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilgilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman maddelerin substratlara bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır (Gerard ve ark 2002, Çubuk 2007, Emre 2007).

➤ **Optik biyosensörler**

Biyolojik reaksiyon sonucunda oluşan lüminesans, floresans, kolorimetrik veya diğer optik sinyallerin ölçülmesi ilkesine dayanan ve etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alan optik biyosensörler; iletici sistem olarak kullanılan optik lifler üzerine bir biyomolekülün uygun bir yöntemle immobilize edilmesiyle hazırlanan ağıtlardır. Optik algılama yöntemleri genellikle birden çok analitin aynı anda incelenmesini gerektiren biyosensörlerde kullanılır (Çubuk 2007, Yılmaz 2012).

Çok hassas olmalarına rağmen bulanık ortamlarda kullanılamıyor olmaları bu tip biyosensörler için bir dezavantajdır (Chaubey ve Malhotra 2002, Yılmaz 2012).

➤ **Kalorimetrik biyosensörler**

Biyolojik tepkimelerin temel özelliklerinden biri olan ısının absorpsiyonu veya üretimi ilkesine dayanan, enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemeyi temel alan kalorimetrik biyosensörler; termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanabilmektedir. Kalorimetrik biyosensörlerde, analit ve uygun enzim arasındaki enzimatik ekzotermik reaksiyon sonucunda açığa çıkan ısı ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Bu tip biyosensörlerde karşılaşılan en büyük sorun ortamın sıcaklığının değişmesidir (Vural 2009, Yılmaz 2012).

➤ **İyon duyarlı (ISFET) biyosensörler**

pH ve iyonların derişimlerinin bir referans elektrot varlığında, akıma karşı ölçümünün esas olduğu enzim sensörlerdir. Genel olarak, metal oksit yarı iletken alan etki transistörleri (MOSFET) ya da iyon duyarlı alan etki transistörlerinin (ISFET) kullanıldığı bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerin (FET) birlikte kullanımından (ENFET) oluşabilmektedir. Bunun yanısıra iyon-duyarlı alan etki transistörü, sensör elektrodun analite karşı seçici geçirgen bir polimer tabakası ile kaplanmasıyla da elde edilebilir (Evtugyn ve ark 1998, Thévenot ve ark 2001, Gerard ve ark 2002, Emre 2007, Vural 2009, Yılmaz 2012). İyonların yarı-iletken ile etkileştiğinde yüzeyin elektriksel potansiyelinin değişmesi ve potansiyeldeki bu değişimin ölçülmesi esasına dayanır.

➤ **Elektrokimyasal biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler; biyolojik tanıma proseslerinin spesifikliğini elektrokimyasal tekniklerin avantajları ile birleştiren cihazlardır. Hedefi analit konsantrasyonu ile orantılı olarak elektrik sinyali üretmek olan bu tip sensörlerde biyolojik tanıma olayını amperometrik veya potansiyometrik olarak kantitatif bir cevaba dönüştüren biyospesifik bir madde uygun bir elektrot yüzeyine immobilize edilir. Böylesi biyomalzeme-elektrot kombinasyonları ile

birçok zorlu problemin çözümü için yeni ve güçlü analitik yöntemler getirilmektedir (Kılıç 2011). Biyoetkileşim esnasında gerçekleşen reaksiyonda, elektrokimyasal olarak ölçülebilir düzeyde akım, yük, potansiyel ve elektrotlar arasındaki ortamın iletkenliğinde değişimleri meydana gelebilir. Bu değişimler ise elektrokimyasal bir detektör ile ölçülür (Grieshaber ve ark 2008).

Bulanık ortamlarda çalışma imkanı sunması, kolay minyatürize edilebilir olması, hızlı yanıt vermesi, enstürimental olarak hassas olması, kolay kullanılabilir ve düşük maliyetli olmasından dolayı bu tip sensörler en yaygın kullanılan biyosensör sınıfını oluşturmaktadır. Ayrıca Elektrokimyasal biyosensörler ölçülen elektriksel parametreye göre (a) kondüktometrik, (b) amperometrik, (c) potansiyometrik olarak sınıflandırılabilir (Yeni 2009, Özdemir 2010, Baş 2011).

A. Kondüktometrik elektrokimyasal biyosensörler:

Kondüktometri esaslı elektrokimyasal biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon nedeniyle örnek çözeltilerdeki veya ortamdaki iyonik türlerin konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak meydana gelen elektriksel iletkenlikteki değişimi tespit etmekte kullanılmaktadır (Skoog ve ark 2007). Bu tip elektrokimyasal biyosensörlerde ölçülen parametre çözeltinin elektriksel direncidir. Diğer elektrokimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında tekniğin en büyük dezavantajı duyarlılığının diğerlerine göre düşük olmasıdır. Bu problemi gidermek için son zamanlarda biyolojik sensör fonksiyonları gösteren, iyon kanallı iletken immünosensörler tanımlanmıştır (Eren 2008).

B. Potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörler:

Potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörler ihmal edilebilir akım altında, elektrokimyasal hücredeki potansiyelin ölçülmesi esasına dayanır. Denge koşullarında çalışırlar ve elektrot yüzeyindeki seçici bağlanma ile oluşan yük yığılmasını tayin ederler (Yılmaz 2012). Bu tip sensörlerin çalışma prensibi yarı geçirgen bir membranla ayrılmış referans elektrot ve çalışma elektrodu ile oluşturulan ve bu iki elektrot arasında önemli bir akım akışının olmadığı bir biyokimyasal reaksiyon ortamındaki potansiyel değişimin izlenmesi sonucunda ölçüm ortamındaki türlerin nicel analizine dayanmaktadır. Ölçüm ortamındaki çalışma elektrodu ile aynı ortamda bulunan referans elektrot arasında oluşan

potansiyel değeri ile analizi yapılacak türün konsantrasyonu arasında Nernst eşitliğine (Eşitlik 1.1.) uyan logaritmik bir ilişki vardır.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln [a]$$

Eşitlik 1.1.

E = Çalışma elektrodu potansiyeli

E⁰ = Standart elektrot potansiyeli

R = İdeal gaz sabiti, 8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹

T = Mutlak sıcaklık, Kelvin (0°C için 273,15°K)

F = Faraday sabiti = (96486 J.volt⁻¹)

a= Tanımlanan iyonun aktivitesi

n = Alınan-verilen elektron sayısı veya membrandaki aktif iyon yüküdür (Vural 2009).

Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler; pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyonlara, katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar, karbondioksit veya amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardan oluşmaktadır. İyon aktivitesindeki değişikliğe cevap veren iyon seçimli elektrotlar olarak tanımlanan potansiyometrik sensörler ile Na⁺, K⁺, Ca²⁺, H⁺ veya NH₄⁺ gibi iyonların tayini; uygun iyon değiştirici membrana iyonların bağlanmasıyla elektrot potansiyelinde oluşan hassas değişiklikten yola çıkarak gerçekleştirilmektedir.

C. Amperometrik elektrokimyasal biyosensörler:

Amperometrik biyosensörlerin çalışma prensibi bir çalışma elektrodu ile bir referans elektrot arasına denge potansiyelinden farklı sabit bir potansiyel uygulandığında, oluşan elektrokimyasal reaksiyon sırasında, türlerin indirgenme veya yükseltgenmesiyle oluşan akım değişikliklerinin ölçülmesine dayanır. Amperometrik tekniklerde, ölçülen akım örnekteki elektroaktif türlerin

konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. İndirgenme veya yükseltgenme reaksiyonu sırasında uygulanan potansiyelin analit türlerine özgü olması sebebiyle amperometrik biyosensörler diğer tekniklere göre çok daha seçicidirler (Chaubey ve Malhotra 2002).

Amperometrik biyosensörün yanıtı;

- ölçüm ortamından elektrot yüzeyine doğru akan türün kütle aktarım (difüzyon) hızına,
- tepkimeye girecek olan maddenin bir kimyasal reaksiyon sonucunda oluştuğu durumlarda tepkimenin hızına,
- elektrot reaksiyonunun adsorplanan türler üzerinden yürüdüğü durumlarda yüzeye tutunma ve yüzeyden koparak ölçüm ortamına geçme hızına,
- elektrot yüzeyindeki madde ile elektrot arasındaki yük aktarımı ya da elektron aktarım hızına bağlıdır. Bu ise tepkimeye giren madde türüne, derişimine, elektrot malzemesinin türüne ve uygulanan gerilime bağlıdır.

Güvenilirlik, düşük maliyet, klinik, çevre ve endüstri alanındaki uygulamalarda oldukça seçici olması gibi avantajlara sahip olduğundan amperometrik biyosensörler, diğer tip sensörlere göre öne çıkmaktadır.

1.5.3. Biyosensörlerin Performansını Etkileyen Faktörler

Hazırlanan biyosensörü karakterize eden, onun çalışma niteliklerini ve verimini belirleyerek hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılabilir olup olmadığına karar verebilmemizi sağlayan performans faktörleri vardır. Bunlar; kararlılık, duyarlılık, seçicilik, yanıt süresi, tekrarlanabilirlik, doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilirlik sınırı, kullanım ömrü, biyoyumluluk, maliyet, taşınabilirliktir.

➤ Duyarlılık

Ölçüm ortamına eklenen analitin derişimde meydana getirdiği bir birim farklanma için biyosensör sinyalinin zamanla değişimi olarak tanımlanmaktadır. Duyarlılık, analizi yapılacak maddenin belli konsantrasyonlardaki çözeltilerini içeren bir dizi standart çözelti ile yapılan ölçümler sonucu kalibrasyon grafiği

çizilerek kolaylıkla belirlenebilmektedir. Biyosensör duyarlılığının bir ölçüsü olan kalibrasyon grafiğindeki doğrunun eğim değeri arttıkça duyarlılıkta da bir artış meydana gelmekte ve analiz ortamına eklenen maddenin oluşturduğu küçük bir konsantrasyon değişimine dahi cevap alınabilmektedir. Aynı analit derişime karşılık ne kadar büyük yanıt elde edilirse duyarlılığın o kadar iyi olduğu söylenebilmektedir.

➤ Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı

Biyosensörün klinik analizler gibi gerçek örneklerde kullanılabilmesi için gerekli olan en önemli özelliklerinden biri ilgili maddenin kantitatif tayininden sorumlu olan doğrusallığıdır. Bunun için biyosensörler ile yapılan çalışmalarda, doğru ölçüm alınabilmesi amacıyla ölçüm ortamına ilave edilen analitin değişen konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen sinyal değerlerinin doğrusal olarak değişim gösterdiği lineer bölgeyi tanımlamak gerekmektedir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör yanıtı arasındaki ilişkinin lineer olduğu bölge “doğrusal çalışma aralığı” ve bu doğrusal grafiğin en alt sınırı “gözlenebilme sınırı” olarak tanımlanmaktadır. Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı tayin edilecek hedef maddenin analiz ortamındaki düzeyinden ve girişim yapabilecek diğer maddelerle birlikteliğinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bunların yanı sıra ortamın pH değeri, sıcaklık, girişim yapıcı türler, kullanılan tampon çözeltinin türü ve tampon çözeltinin derişimi biyosensör cevabına etki ederek doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırını değiştirebilen diğer parametrelerdir.

➤ Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Biyosensörlerle yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik mutlaka incelenmesi gereken bir parametredir. Tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti, aynı koşullar altında, aynı substrat ile arka arkaya ölçümler alınarak yapılmaktadır. Elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayıları hesaplanmaktadır. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensör uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilmektedir. Tekrar üretilebilirlik ise, aynı prosedür ile hazırlanan farklı biyosensörlerin aynı biyomolekül için verdiği cevapların birbiri arasındaki uyumunu açıklamaktadır.

Biyosensör hazırlama prosedürünün güvenilirliğini göstermek amacıyla tekrar üretilebilirliği mutlaka çalışmak gerekmektedir (Buerk ve Taraves 1993, Telefoncu 1999, Thévenot ve ark 2001).

➤ **Kararlılık**

Bir elektrodun diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra pratik olarak kullanılabilirliğinin bir göstergesi olan kararlılık, aynı materyallerle kaç kez analiz yapılabileceğinin bir ölçüsü olan biyosensör ömrü hakkında da fikir vermektedir. Aynı sensör ile çok sayıda ölçüm yapılabilmesi, iş gücü ve maliyet açısından çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Biyosensörlerin ömrü, onların saklanma ve çalışma koşullarına bağlıdır.

➤ **Seçicilik**

Biyosensörün kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesini sağlayan seçicilik biyosensörün hedef analite karşı duyarlı olması ve ölçüm ortamında olabilecek diğer maddelerden etkilenmemesi olarak ifade edilmektedir. Bir reaksiyon ortamında analizlenecek hedef analitin yanında buna girişim yapabilecek analit ya da analitlerin bulunması durumunda, hedef analite ilişkin tayin aralığı da seçicilik üzerinde büyük önem taşımaktadır. Şöyle ki; oldukça düşük konsantrasyonlara inilebilen bir tayin aralığında, örnekteki hedef analitin önemli ölçüde seyreltilerek tayinine olanak varsa, girişim yapacak maddenin konsantrasyonunun bu işlemler sonucunda tayin sınırları dışına çıkarılması mümkün olabilmekte ve bu durum seçiciliğe önemli bir katkı sağlamaktadır.

➤ **Yanıt süresi**

Elektrot materyaline, destek maddesinin cinsine, biyomolekülün yapısına, analitin biyomoleküle olan ilgisine ve analitin elektrot yüzeyindeki redoks potansiyeline bağlı olarak değişim gösteren ve biyosensörler için önemli bir performans parametresi olan, ölçüm ortamına analitin ilave edilmesi ile meydana gelen sinyal değişiminin tekrar kararlı hal değerine ulaştığı zaman aralığı olarak tanımlanan biyosensörün yanıt süresi;

❖ Substratın analiz ortamından zar yüzeyine difüzyon hızına,

- ❖ Substratın zar içine ne kadar hızlı difüzlendiğine ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar çabuk tepkime verdiğine,
- ❖ Oluşan ürünün ölçüldüğü yer olan sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiğine bağlı olarak değişmektedir.

Çözeltinin karıştırma hızı, substrat derişimi, optimum pH, sıcaklık, sensör yüzeyinde veya biyoaktif tabaka yüzeyinde herhangi bir zarın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa bu zarın niteliği yanıt süresini etkileyen başlıca unsurlardır. Bunlardan optimum pH değerine yaklaşma, karıştırma hızının artışı yanıt süresini kısaltırken, substrat derişimindeki artış yanıt süresinin uzamasına neden olmaktadır. Sıcaklık ise difüzyonu olumlu yönde etkileyerek cevap süresinin kısalmasına sebep olmaktadır. Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirerek cevap zamanını etkilemektedir. Bir biyosensörün yanıt süresi elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

➤ **Raf ömrü**

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümler sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişimin bir ölçüsü olarak tanımlanan kullanım ömrü; yapılan ölçüm sayısına ve ölçülen analitin derişimine bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Kullanılmadan ideal koşullarda saklandığındaki ömrü ile sürekli çalışma koşullarındaki ömrü farklı olacağından kullanma ömrü; hazırlanan sensörün saklama ve çalışma koşulları açısından iki durumda da incelenmelidir. Bu amaçla, hazırlanan bir biyosensör ile rutin uygulamalara geçmeden önce, operasyonel ve depolama kararlılıklarının spesifik olarak belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca hazırlanan biyosensörler, yapılarındaki biyolojik aktif maddelerin fonksiyon kaybının önlenmesi için buzdolabında saklanmalıdırlar (Buerk ve Taraves 1993, Telefoncu 1999, Thévenot ve ark 2001).

➤ **Biyoyumluluk**

Hastalık tedavisi veya biyosensörün insan vücuduna uzun süreli implantasyonları gibi tıbbi uygulamalarda kullanılacak biyosensörlerde kullanılan malzemelerin ve vücut sıvılarının kimyasal etkileşimi ve bu etkileşimin fizyolojik sonuçlarının vücuda zarar verip vermediğinin bir ölçüsü olarak tanımlanan biyoyumluluk önemli bir performans faktörüdür.

➤ **Maliyet**

Biyosensörlerin performansını etkileyen diğer bir faktör olan maliyet biyosensörün hazırlanmasına dair giderler ile söz konusu biyosensörle yapılan bir analize ait giderlerin toplamı olarak tanımlanmaktadır. Hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığının iyi olması hazırlanan sensör ile çok sayıda analizin yapılabilmesine olanak sağlayarak hazırlık giderlerinden analiz başına düşen payı azaltır ve dolayısıyla maliyeti düşürür.

➤ **Taşınabilirlik**

Özellikle çevre ve savunma sektörlerinde kullanılacak bir biyosensör için taşınabilir olması önem taşımaktadır. Biyosensörler taşınabilirliğin yanı sıra kullanım kolaylığı olarak ifade edilen basitlik niteliğine de sahipse daha yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Ancak; pratik kullanım amacıyla basitleştirilmiş sistemler çoğu zaman karışık sistemlere göre hassas olamamaktadır. Bu nedenle bu sistemler acil durumlarda fikir edinebilmek amacıyla ya da diğer türden bir analizin mümkün olmadığı durumlarda kullanılmaktadır.

1.5.4. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Günümüzde 180'den fazla madde için hazırlanabilir olmasına rağmen sadece 25 kadarı ticari olarak üretilen biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma sektörlerinde olduğu gibi otomasyon, kalite kontrol, durum tespiti ve enerji saklanması gibi birçok endüstriyel alanda da geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Biyosensörlerin uygulama alanlarının bazıları aşağıda verilmiştir:

- Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör

- Biyoteknolojide proses kontrolü
- Tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyel ve viral diyagnostik
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Askeri uygulamalar
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri

1.6. Analitik Yöntemlerin Değerlendirilmesi

Analitik yöntemin seçimi ve değerlendirmesi, yöntemin uygulanmasındaki önemli basamaklardır. Geliştirilmiş bir yöntem rutin uygulamaya girmeden önce, mevcut laboratuvar şartlarında çalışmaya uygunluğunun ve performansının değerlendirilmesi gerekmektedir. Analitik yöntemlerin değerlendirilmesinde beş önemli nokta vardır ve başarılı bir yöntem kıyaslaması için bunlara uyulmalıdır.

- 1) Tüm işlemlerde klinik perspektifin uygulanması,
- 2) Analitik hedeflerin belirlenmesi,
- 3) Gerekli verilerin toplanarak, doğru deneylerin tasarlanıp yapılması
- 4) Uygun istatistikler kullanılarak hataların doğru hesaplanması,
- 5) Yöntem konusunda tarafsız kararların verilmesi (Gün 2014)

Değerlendirmede istatistiksel parametrelerden yararlanılır, ancak istatistiksel veriler tek başına yöntemin kabulü için yeterli değildir. Yöntem değerlendirilirken gözönünde bulundurulması gereken bir başka husus da laboratuvar maliyetidir. Buna rağmen ihtiyaç yeni yöntem seçiminde ilk basamağı oluşturur ve maliyete göre çok daha etkindir. Numune miktarı, tipi, sonuç verme süresi, testlerin maliyeti, yeterli personel durumu ve personelin becerisi, kalite

kontrol, atıklar, güvenlik gibi pratik gereklilikler gözden geçirildikten sonra analitik performans değerlendirilmesine geçilebilir.

1.6.1. Analitik performans parametreleri

Geliştirilen yöntemin kabul edilip edilemeyeceğine; doğruluğu, analitik ölçüm aralığı, gerikazanım değeri, duyarlılığı, spesifikliği, analitik ölçüm limitleri, tayin sınırı, girişim etkisi, tekrarlanabilirliği gibi analitik performans parametrelerini kapsayan deneyler yapılarak karar verilir.

1.6.2. Performans standartları

Geliştirilen yöntemin tarafsız olarak değerlendirilebilmesi için performans standartlarının belirlenmesi gerekmektedir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği bu standartlara uygunluğuna göre değerlendirilmektedir. Tam olarak belirlenmiş bir standart olmaması nedeniyle performans hedefleri, hem laboratuvarlar arası hem de aynı laboratuvarda uygulamadan uygulamaya farklılık gösterebilmektedir. Çeşitli analitler için analitik performans standartlarının yer aldığı çeşitli klavuzlar yayımlanmıştır (Barnett 1968, Skendzel ve ark 1985, Fraser ve ark 1997). Biyokimyasal analizler için geliştirilen yöntemin performans standartlarının değerlendirilmesinde, çeşitli analitlerin laboratuvar performanslarını değerlendirmede kullanılabilecek limitlerin yer aldığı CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) tarafından yayımlanmış klavuz kullanılmaktadır (Jung ve ark 2006). Performans standartları belirlendikten sonra aday yöntem seçilir ve değerlendirme için gerekli deneyler yapılarak veriler toplanır (Gün 2014).

1.6.3. Yöntem değerlendirme deneylerinin basamakları

- Prosedürün değerlendirilmesi için protokol hazırlanır.
- Prosedürün uygulanması sırasında elde edilen tüm veriler raporlanır.
- Yüksek derişimde analit içeren kontrol materyali ya da plazma/serum havuzu uygun diluent ile seyreltilir. Ölçülen değerler grafiğe aktarılır ve analitik aralık belirlenir.

- Uygulanan yöntemin kesinlik çalışması yapılır. Tıbbi karar düzeyine yakın konsantrasyonda analit kullanılarak ve gerekli protokollere uyularak yöntemin kesinliği saptanır.

- Yöntem karşılaştırma ve geri kazanım deneyleri uygulanarak yöntemin doğruluğu test edilir. Bilimsel olarak en geçerli olan test, aday yöntemin referans yöntem ile kıyaslanmasıdır. Geri kazanım deneyleri; konsantrasyonu bilinen bir numunenin üzerine belirli miktarda analit eklenerek yapılır ve % geri kazanım hesaplanır. Bu sonuç orantısal sistematik hatayı verir.

- Yeni geliştirilen yöntemin duyarlılığı kalibrasyon eğrisinin eğiminden faydalanılarak hesaplanır.

- Yöntemin limitleri belirlenir.
- Girişim deneyleri yapılarak yöntemin seçiciliği saptanır.
- Referans aralık belirlenir.

1.6.4. Yöntem kabul edilebilirliğinin değerlendirilmesi

- Performans değerlendirme deneyleri ile belirlenen hatalar analitik hedef olarak belirlenmiş hatalarla kıyaslanır.
- Hesaplanan toplam hata izin verilen toplam hatadan daha düşük olmak zorundadır.
- Analitik parametrelerden biri ya da daha fazlası için izin verilen hata toplam hatadan büyükse kabul edilmemeli ve iyileştirme çalışmaları yapılmalıdır.

1.7. Metot Validasyonu

CLSI'ya göre (Clinical and Laboratory Standards Institute) validasyon bir işlem, süreç, sistem, donanım ya da yöntemin doğru ve kesin olarak sürekli bir şekilde bekleneni gerçekleştirdiğini ve kullanım amacını karşıladığını kanıtlama eylemi veya süreci olarak tanımlanmaktadır.

1.7.1. Doğruluk

Doğruluk; bir analitin ölçülen düzeyinin gerçek değerine olan yakınlığını ifade eder (Ellison ve ark 2000). Doğruluğun göstergesi olan hata (bias) ise ölçülen değer ile gerçek değer arasındaki fark olarak tanımlanır (Ellison ve ark 2000). Preanalitik, analitik ve postanalitik olmak üzere hatalar üçe ayrılmaktadır (Westgard 2008). Preanalitik hatalar, örnek alımından önce yapılan, (yanlış test istenmesi, hasta ile ilgili çevresel ve fiziksel faktörler), numune alımı esnasında yapılan (ıslak ve/veya kirli malzeme kullanılması, infüzyon yapılan ekstremiteden örnek alınması, tam kan, serum, plazma cinsinden uygun numune alınmaması ve aç karnına alınması gereken numunelerin yeterli açlık sağlanmadan alınması) ve örneklerin laboratuvara ulaştırılmasında yapılan hataları (bekletilmiş numunenin gönderilmesi, yanlış etiketleme) kapsamaktadır. Analitik hatalar; büyük, sistematik ve rastgele hatalar olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Westgard 2008). Kullanılan prosedürünün hatalı olması, yanlış deney planlama ve hesaplama büyük hataları oluşturur. Deney tekrarlanmalı ya da sonuçlar iptal edilmelidir (Ellison ve ark 2000). Analiz sonucunu sabit ve belirli düzeyde değiştiren, nedeni bilinen ve ölçülebilen kesin değerlere sahip hatalar sistematik hatalardır ve bu tür hatalar sabit ve oransal olmak üzere iki tiptir (Westgard 2008). Sabit hata kaynaklarını genellikle girişimler oluşturur, bunun yanı sıra yanlış kör (blank) hazırlama da sabit hataya neden olabilmektedir. Oransal hata kaynaklarını, kalibratör değerinin doğru olmaması ve analitin bir kısmının yan ürünlere dönüşmesi oluşturur. Sabit hatalar girişim (interferans) çalışmalarıyla, oransal hatalar ise recovery (geri elde) çalışmalarıyla saptanmaktadır (Ellison ve ark 2000). Düzeltilemeyen ve kontrol edilemeyen birçok değişkene bağlı olan hatalar ise rastgele hatalar olarak adlandırılır. Ortamın sıcaklığındaki değişim, cihazın kararsızlığı, ayıraç ve kalibratör değişimleri, pipetleme hataları, zamanlama ve karıştırma işlemlerindeki değişiklikler, çalışanların değişmesi rastgele hatanın kaynağını oluşturmaktadır. Rastgele hata; tekrarlanabilirlik deneyleri ile saptanabilmektedir (Westgard 2008). Post analitik hatalar ise sonuçların raporlanması ve değerlendirilmesi aşamasında yapılan hataları kapsamaktadır. Toplam hata; sistematik hata ve rastgele hataların toplamından oluşmaktadır (Tietz 1992, Jung ve ark 2006). Toplam izin verilen hata ise (Total Allowable

Error, TEa), testin klinik yararını ortadan kaldıramayacak büyüklükteki hata olarak tanımlanmaktadır (Westgard 2008).

Doğruluk; geri elde, girişim çalışmaları ve yöntem karşılaştırma ile belirlenir.

1.7.2. Analitik aralık (Linearite)

Linearite; yöntemin örnekte hiçbir modifikasyon olmaksızın ölçebildiği konsantrasyon aralığıdır. Linearitenin sınırları kalibrasyon eğrisi çizilerek belirlenir. Bir yöntemin linearitesi dilüsyon işlemi yapılmaksızın beklenen değer in % 95-99'unu ölçebilmelidir. CLIA 88'e göre yöntemin linearitesi rapor edilebilir aralık olarak da tanımlanmaktadır (Tietz 1992, Jung ve ark 2006).

CLSI EP6-A protokolüne göre Linearite çalışması;

- Protokol en az 5 örneğin çift çalışılmasını kabul eder
- Lineer aralığı belirlemek için 9-11 düzey ve her örneğin 2 veya 4 tekrarlı çalışması önerilmektedir (ilk çalışma için lineer aralığı beklenenden %20-30 daha geniş tutmak gerekir).
- Modifiye yöntem veya laboratuvar içi kurulan yöntemi (in-house) doğrulamak için 7-9 nokta ve her düzeyde 2 veya 3 tekrar çalışma önerilmektedir.
- Laboratuvarda lineer aralığın geçerliliğinin kanıtlanması için 5-7 örnek ve her düzeyde 2 tekrar çalışma önerilmektedir (Westgard 2008). Linear aralık belirlenmesinde minimum analitik konsantrasyonu veya lineer aralığın en alt sınırı, çeşitli tıbbi karar sınırları ve maksimum analitik konsantrasyon veya linear aralığın üst sınırı konsantrasyonlarını içermesi önemlidir.

1.7.3. Analitik ölçüm limitleri

➤ Limit of blank (LOB)

Kör okumalarının belli bir olasılıkla karşılaşılabilecek en yüksek değer olarak tanımlanan LOB reaktif ve analit dışındaki örnek bileşenlerinin ölçümüdür

(Westgard 2008). Toplam hatayı etkilemesi nedeniyle kör ölçümlerinin düzeyi bilinmelidir. Daha doğru ve kesin ölçüm yapmanın mümkün olabilmesi için kör ölçüm düzeyinin düşük olması istenmektedir (Tietz 1992, Jung ve ark 2006).

LOB çalışmalarında çözücü ön işlemlerden geçirilerek standartlarla birlikte 20 defa okutularak analitin değeri hesaplanır.

- Kör örneği ve düşük seviye analit içeren örnek alınır.
- 60 tekrar olacak şekilde 5 gün ölçüm yapılır.
- $LOB = \text{Mean (blank)} + 1.65S \text{ (blank)}$

- $LOD = LOB + 1.65S \text{ (düşük seviye)}$

- $LOQ = \text{Bias (düşük seviye)} + 2S \text{ (düşük seviye)}$ olduğu ilk nokta olarak hesaplanır.

➤ **Limit of detection (LOD)**

Belirli bir olasılıkla saptanabilen en düşük analit miktarı olarak tanımlanmaktadır (Tietz 1992, Jung ve ark 2006). Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri tayin sınırı olarak belirlenir.

➤ **Limit of quantitation (LOQ)**

Belli bir kesinlik ve doğruluk değerinde kantitatif olarak ölçülebilen en küçük analit miktarıdır (Tietz 1992, Jung ve ark 2006). Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri kantitatif tayin limiti olarak belirlenir.

1.7.4. Tekrarlanabilirlik

Bir analitik yöntem uygulanarak tek bir örneğin ard arda analiz sonuçlarını aynı olarak analiz edebilme gücü, yöntemin kesinliğini verir. Rastgele hatayı belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Tietz 1992, Jung ve ark 2006).

CLSI EP5-A protokolüne göre kesinlik çalışması;

- Matriks klinik hasta örneklerine uygun olmalıdır.

- İki konsantrasyon önerilmektedir ancak daha fazlada kullanılabilir.
- Cihazın ölçüm aralığının büyük çoğunluğunu kapsayan konsantrasyonlar seçilmelidir.
- Eğer ikiden fazla konsantrasyon kullanılacaksa tıbbi karar konsantrasyonuna yakın değerler seçilmelidir.
- 20 çalışma günü ve günlük iki çalışma yapılması önerilmektedir (Westgard 2008).

1.7.5. Geri kazanım

Bir analitik yöntemin konsantrasyonu bilinen miktarda eklenen analiti doğru olarak ölçme kapasitesi olarak tanımlanan geri kazanım çalışmaları ile bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgi elde edilmiş olur. Çünkü içeriği bilinen örneğin matriksinde bulunan tüm bileşiklerin varlığında, analiti ne derece ölçtüğünü gösteririr (Tietz 1992, Jung ve ark 2006).

Kalibrasyon grafiği çizildikten sonra;

1. Tüpe 900 µl plazma havuzundan alınıp, 100 µl distile su eklenir.
2. Tüpe 20 µM'lık standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklenir
3. Tüpe 10 µM'lık standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklenir
4. Tüpe 5 µM'lık standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklenir.

Ön işlemler tamamlanarak okutulur ve eklenen standartlara göre %R değerleri hesaplanır.

1.7.6. Girişim (İnterferans)

Analitten başka bir bileşiğin etkisi ile veya örneğin özelliği nedeniyle, ölçülen analit konsantrasyonunda klinik olarak anlamlı bir biasın oluşumudur (Tietz 1992, Jung ve ark 2006, Burtis ve ark 2012).

1.7.7. Referans aralık doğrulama

CLSI'ya göre geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralığı temel alınarak yeni yöntemle karşılaştırmak amacıyla 20 sağlıklı birey numunesinin analizi yapılmaktadır. %10'undan fazlası aralık dışındaysa red edilmektedir.

1.7.8. Taşıma (Carryover)

Otomatize olarak çalışan sistemlerde, bir önceki numuneden sonraki numuneye aktarım olup olmadığını, eğer aktarım oluyorsa bunun kabul edilebilirliğini göstermek için yapılmaktadır. Bir sonraki numuneye aktarım olup olmadığını anlamak için yüksek ve düşük konsantrasyondaki numuneler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek okutulmaktadır. Taşıma çalışmalarında numunelerin düzenleme şekli ;

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11

GRUP 1: D2-D3-D6-D7-D8

GRUP 2: D4-D5-D9-D10-D11

Grup 1; düşüklerden sonra gelen düşük numunelerden oluşurken, Grup 2; yükseklerden sonra gelen düşük numuneleri içermektedir. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak grup ortalamaları arasındaki farkın total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı kabul edilebilmektedir (Westgard 2008).

1.7.9. Matris etkisi

Matris etkisi, standart solüsyon içindeki ve plazma gibi biyolojik matristeki aynı analitin analizlerinde farklı yanıtlar oluşturması şeklinde tanımlanmaktadır (Chambers ve ark 2007). Matris etkileri eş salınımlı matris bileşenlerinden kaynaklı hedef analitin iyonlaşmasını etkileyen iyon supresyon ya da bazı durumlarda iyon artırma sonucudur. Eş zamanlı salınan endojen fosfolipitler ve pek çok farklı bileşikten kaynaklanan matris etkisi çok değişken olabilir bu nedenle tahmin etmek zordur. Matris hedef analitin

iyonizasyonunu etkiler (Chambers ve ark 2007). İyonizasyon etkileri, çözelti fazında ya da gaz fazında oluşabilir. Biyolojik ekstraktlarda ESI (Elektro Sprey İyonizasyon) ile yapılan çalışmalar, iyon supresyonunun temel nedenini, uçucu olmayan ya da daha az uçucu çözünenlerden kaynaklanan spreyc damlacığı özelliklerinin değişimi olarak rapor etmişlerdir. Uçucu olmayan; endojen bileşikler, tuzlar, iyon eşleştirme ajanları, ilaçlar ve bunların metabolitleri damlacık oluşumunu ya da damlacık buharlaşma verimliliğini değiştirerek gaz fazında dedektöre ulaşan yüklü iyon miktarını etkiler (Annesley 2003).

1.7.10. Yöntem Karşılaştırma

Doğruluğu ölçmek amacıyla örnekler hem referans hem de geliştirilen yeni yöntemde eş zamanlı olarak çalışılır, sonuçlar karşılaştırılır ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek için regresyon analizi yapılır. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında metotlar arasında görsel değerlendirme saçılım grafiği (scatter plot) ve Bland Altman grafikleri (difference plot) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. İki metot ile elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki farkın ortalamalarına karşı gösterdiği saçılım ortalamalar (gerçek değer) ve farklar (hata) arasındaki olası korelasyonun değerlendirilmesine olanak sağlayan Bland-Altman uyum grafiği ile değerlendirilir. Ayrıca Bland – Altman grafiği farkların sistematik olarak sıfırdan farklı olup olmadığını (yanlılık) ve farkların ne kadar yaygın olduğunu (rastgele hata) değerlendirilmesini de sağlar.

Klinik çalışmalarda, iki metot arasındaki uyumu incelemede kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise regresyon analizidir. Bu analiz yönteminde ise; geliştirilen analiz metodu ve referans metot (X ve Y metotları) ile elde edilen verilerin bağımsız olduğu kabul edilir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Söz konusu tez çalışması, S.Ü. Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik kurul onayı (no: 2015/10) ile gerçekleştirilmiştir. 15202021 proje numarası ile S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce desteklenmiştir. Çalışmamızda Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Merkez Laboratuvarında rutin analizleri yapılmış hasta plazma havuzunun arta kalan kısımları kullanılmıştır. Kolorimetrik ölçümler S.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD Araştırma Laboratuvarında, HPLC analizleri S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD Araştırma Laboratuvarında , biyosensör tasarımı Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde mevcut cihazlar ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda, MDA'nın mevcut analitik yöntemlerle analizlerinde, yöntem performansına bağlı sınırlılıklar olması nedeniyle yeni bir analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, MDA tayinine yönelik sensör tasarımının yapılması ve böylelikle MDA tayininde metot validasyonunun temelini oluşturulması amaçlanmıştır. Mevcut kolorimetrik metottan ve referans yöntemden modifiye ettiğimiz HPLC kromatogramlarından elde ettiğimiz veriler ile tasarladığımız elektrokimyasal sensörün verileri karşılaştırılarak yöntem performansları değerlendirilmiştir. Bu düşüncelerden yola çıkarak analitik doğruluk, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, interferans, linearite, geri kazanım gibi birçok açıdan yöntem ile yöntemlerin performanslarının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan bu sensör ile, rutin laboratuvarlarda yapılan ve uzun süreç gerektiren biyokimyasal analiz yöntemlerinin yerine çok daha hızlı ve güvenilir olan biyosensörlerin kullanımının alternatif olarak sunulabilecek olması bakımından bilime katkı sağlayacak, kullanılacak nanomateryallerin bu amaçla ilk kez uygulanacak olması ile de biyokimya literatüründe önemli ve öncül yer edinecektir.

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler ticari olarak temin edilmiş, 3 ayrı yöntemle MDA tayini yapılmış ve her bir yöntem için kullanılan kimyasallar ve çözeltilerin hazırlanması aşağıda belirtilmiştir.

2.1.1. Kolorimetrik Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Plazma MDA analizleri Cayman marka TBARS ASSAY (katalog no: 10009055, Cayman Chemical Company, Michigan, USA) test kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

2.1.2. HPLC Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

- 1,1,3,3 tetraetoksipropan (Aldrich, $\geq 96\%$; CAS-No: 122-31-6)
- Bütillenmiş hidroksitolüen (Aldrich, $\geq 99\%$ CAS-No: 128-37-0)
- Potasyum iyodür (Sigma, $\geq 99,5\%$; CAS-No: 7681-11-0)
- Triklor asetik asit (Merck, $\geq 99,5\%$; CAS-No:76-03-9)
- TBARS (Merck, $\geq 99\%$; CAS-No: 504-17-6)
- n-bütanol (Merck, $\geq 99,0\%$; CAS-No: 71-36-3)
- Etanol (Merck, $\geq 99,9\%$; CAS-No: 64-17-5)
- Metanol (Merck, $\geq 99,8\%$; CAS-No: 67-56-1)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel-deHaën, %98,0-100,5 CAS-No: 7778-77-0)
- Di potasyum mono hidrojen fosfat (Riedel-deHaën, CAS-No: 7758-11-4)
- Potasyum hidroksit (Merck; $\geq 85\%$; CAS-No: 1310-58-3)

2.1.3. Biyosensör Tasarımı Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

- 1,1,3,3 tetraetoksipropan (Aldrich, $\geq 96\%$; CAS-No: 122-31-6)
- Altın (III) klorür trihidrat (Aldrich, $\geq 99,9\%$; CAS-No: 0016961254)
- Çok duvarlı karbon nanotüp (Aldrich, 95%; CAS-No: 308068-56-6)
- Grafen (Aldrich, CAS-No: 799084)

- Gliserol (Merck, $\geq 99,5\%$; CAS-No: 56-81-5)
- Sükröz (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$; CAS-No: 57-50-1)
- Asetonitril (JT-Baker, min 99,8%; CAS-No: 75-05-8)
- İzopropil alkol (Riedel, 99,9%; CAS-No: 67-63-0)
- Sodyum hidroksit (Merck, $\geq 99,0\%$; CAS-No: 1310-73-2)
- Borik asit (Merck, 99,5-100,5%; CAS-No: 10043-35-3)
- Orto-fosforik asit (Merck, 85,0%; CAS-No: 7664-38-2)
- Asetik asit (Merck, $\geq 99,8\%$; CAS-No: 64-19-7)
- Potasyum Klorür (Sigma, $\geq 99,0\%$; CAS-No: 7447-40-7)
- Hidroklorik asit (Merck, 37,0%; CAS-No: 7647-01-0)
- Sülfürik asit (Merck, 98,0%; CAS-No: 7664-93-9)
- Tetrabütülamonyum tetrafloroborat (Sigma-Aldrich, 99,0%; CAS-No: 429-06-1)
- Gümüş nitrat (Merck, 99,8–100,5%; CAS-No: 7761-88-8),
- Etanol (Merck, $\geq 99,9\%$; CAS-No: 64-17-5)
- Metanol (Merck, $\geq 99,8\%$; CAS-No: 67-56-1)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel-deHaën, %98,0-100,5 CAS-No: 7778-77-0)
- Di potasyum mono hidrojen fosfat (Riedel-deHaën, CAS-No: 7758-11-4)
- Potasyum hidroksit (Merck; $\geq 85\%$; CAS-No: 1310-58-3)
- pH metrenin kalibrasyonunda pH'ı 4,0; 7,0 ve 10,0 olan ticari tampon çözeltiler (VWR) kullanılmıştır.

2.1.4. Kolorimetrik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Kolorimetrik tayin için kullanılan tüm çözeltiler kit içeriğinde belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Test kiti içeriğinde yer alan kimyasal ayıracıların hazırlanması aşağıda belirtilmiştir.

❖ TBARS (Item no: 10009199): 2,0 g TBARS kit içeriğinde kullanıma hazır halde sunulmuştur.

❖ TBA asetik asit (Item no: 10009200): 40,0 mL TBA-asetik asit 160,0 mL HPLC-grade su ile muamele edilerek hazırlanmıştır.

❖ TBA-Sodyum Hidroksit (10x) (Item no: 100009201): 20,0 mL TBA-NaOH 180,0 mL HPLC-grade su ile muamele edilerek hazırlanmıştır.

❖ TBA-MDA Standardı (Item no: 100009202): 500,0 µM konsantrasyonundaki MDA standardı kit içeriğinde kullanıma hazır halde sunulmuştur. 250,0 µL MDA standardı 750,0 µL HPLC-grade su ile dilüe edilerek 125,0 µM konsantrasyonunda stok MDA standardı elde edilmiştir. 7 adet tüp alınarak seri dilüsyonlarla 50,0 µM, 25,0 µM, 10,0 µM, 5,0 µM, 2,5 µM, 1,25 µM ve 0,625 µM konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmıştır. 1 adet tüpe sadece HPLC-grade su alınarak (0,0 µM) blank olarak kullanılmıştır.

❖ TBA SDS solüsyonu (Item no: 100009203): kit içeriğinde kullanıma hazır halde sunulmuştur.

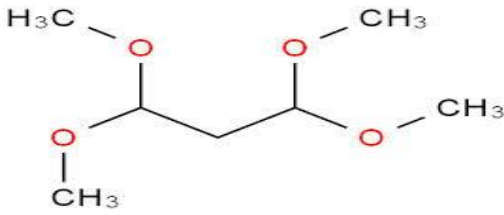
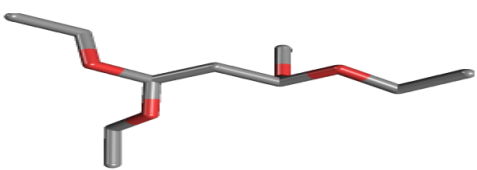
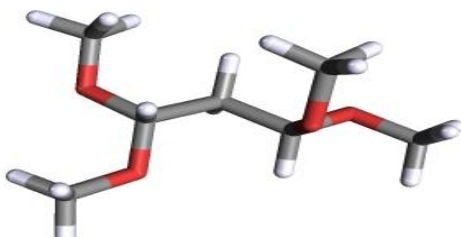
❖ Renk Ayırıcı: 530,0 mg TBA (Item no: 100009199) 50,0 ml TBA-asetik asit solüsyonu ile muamele edilmiş, ardından TBA-NaOH ile karıştırılıp çözünmesi sağlanmıştır.

2.1.5. HPLC Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çizelge 2.1.'de hakkında bilgiler verilen 1,1,3,3, tetraetoksi propan (TEP) maddesinin HPLC analizlerinde kullanılmak üzere 20,0; 10,0; 5,0; 2,50; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039 ve 0,0195 µM konsantrasyona sahip standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltiler hazırlanırken; ana stoktan 1 M'lık

çözelti elde edilene kadar etanol ile, daha düşük konsantrasyonlardaki standartlar için ise HPLC saflıkta su ile dilüsyon yapılmıştır.

Çizelge 2.1. TEP'in kimyasal özellikleri

Maddenin Adı	Malonaldehit
Maddenin IUPAC Adı	1,1,3,3-Tetraetoksipropan
Maddenin Kısa Adı	TEP
Maddenin Molekül Ağırlığı	220,31 g·mol ⁻¹
Elde Edilişi	Ticari
Maddenin Kapalı Formülü	C ₁₁ H ₂₄ O ₄
Sinonimleri	Malonaldehit, Bis-(Dietilasetal)
Yoğunluğu	0,919 g/cm ³
Erime ve Kaynama Noktası	-90°C ve 220°C
Fiziksel Özellikleri	Renksiz ve sıvı
Maddenin Molekül Yapısı	
Maddenin 2 Boyutlu Yapısı	
Maddenin 3 Boyutlu Yapısı	

- HPLC’de mobil faz olarak kullanılmak üzere 0,01 M’lık K_2HPO_4 (%30 Metanol) ve 0,01 M’lık KH_2PO_4 (%30 Metanol) tampon çözeltileri hazırlanarak karıştırılmış, 1,0 M’lık hidroklorik asit ve 1,0 M’lık KOH çözeltileri kullanılarak pH değeri 7,0’ye ayarlanmış hacim saf su ile litreye tamamlanmıştır.
- HPLC’de standartların ve numunelerin ön hazırlığı aşamasında kullanılmak üzere;
 - ❖ % 0,20’lik BHT çözeltisi etanolde hazırlanmıştır.
 - ❖ 10 N’lik NaOH çözeltisi HPLC saflıkta su ile hazırlanmıştır.
 - ❖ % 1’lik KI içeren % 7.2’lik TCA çözeltisi HPLC saflıkta su ile hazırlanmıştır.
 - ❖ % 0,6’lık TBA çözeltisi HPLC saflıkta su ile hazırlanmıştır.

2.1.6. Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

➤ Britton–Robinson (BR) tampon çözeltisi hazırlanırken 2,29 mL saf asetik asit, 2,69 mL %85’lik fosforik asit ve 2,472 g borik asit karıştırılıp hacim saf su ile litreye tamamlanmış ve ortamın iyonik şiddetinin sabit tutulması amacıyla ortama konsantrasyonu 0,1 M olacak şekilde potasyum klorür eklenmiştir. Hazırlanan BR tampon çözeltisi üzerine uygun hacimlerde 0,2 M sodyum hidroksit ve 0,2 M hidroklorik asit ilave edilerek farklı pH değerlerine ayarlamalar yapılmıştır.

➤ Elektrokimyasal olarak MDA tayininde kullanılmak üzere 50mM’lık KH_2PO_4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) hazırlanmış, 1,0 M’lık hidroklorik asit ve 1,0 M’lık NaOH çözeltisi ile pH değeri 6,8’e ayarlanmış hacim saf su ile litreye tamamlanmıştır.

➤ Dönüşümlü voltametri tekniği ile yapılan elektrokimyasal karakterizasyonda kullanılmak üzere; ferrosen çözeltisi 1,0 mM olacak şekilde 100 mM tetrabütülamonyum tetrafloroborat (TBATFB) içeren asetonitril (CH_3CN)

çözeltisinde ve potasyum ferrisiyanür çözeltisi 1,0 mM olacak şekilde pH'ı 2,0 olan BR tampon çözeltisinde hazırlanmıştır.

➤ Elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile yapılan elektrokimyasal karakterizasyonda kullanılmak üzere potasyum ferri/ferrosiyanür kimyasallarının 1,0 mM olacak şekilde 100 mM KCl'de çözeltileri hazırlanmıştır.

➤ Hazırlanan yüzeye ait biyosensör uygulamalarında kullanılmak üzere 1,0 M TEP çözeltisi etanolde hazırlanmıştır.

➤ Yalın GC elektrot yüzeylerinin MDA hassasiyetini artırmak amacıyla kullanılmak üzere;

❖ Ticari olarak temin edilen $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ maddesinin 10,0 mM'lık çözeltisi 0,1 M KCl ortamında hazırlanmıştır.

❖ Ticari olarak temin edilen grafenin 1,0 mg/mL olacak şekilde çözeltisi saf su ortamında hazırlanmıştır.

❖ Ticari olarak temin edilmiş çok duvarlı karbon nanotüpün (MWCNT) 1,0 mg/mL olacak şekilde çözeltisi saf su ortamında hazırlanmıştır.

2.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Kolorimetrik yöntemle MDA analizi çalışmaları Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD Araştırma Laboratuvarında, HPLC çalışmaları Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD İleri Teknik Araştırma Laboratuvarında, Biyosensör çalışmaları Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Sentez ve Ön Hazırlık Laboratuvarında multidisipliner prensiple gerçekleştirilmiştir. Her bir yöntem için kullanılan cihazlar ayrı ayrı başlıklar halinde verilmiştir.

2.2.1. Kolorimetrik Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Hasta numunelerinde ve hazırlanan standartlardaki MDA'nın kolorimetrik yöntemle tayini için 220-1000 nm Absorbans değer aralığında analiz imkanı

sunan BMG LABTECH SPECTROstar® Nano marka Dahili Küvet Odasına Sahip Ultra Hızlı UV/VIS Absorbans Mikrolaka Okuyucu (BMG LABTECH GmbH, Almanya) kullanılmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi MARS Veri Analizi Programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriğindeki prosedürün uygulanabilmesi için ısıtma işlemleri BM 302 (Nüve, Türkiye) marka Benmari, soğutma işlemleri Scotsman AF 100 (İtalya) marka buz makinası, santrifüj işlemleri için Beckman Coulter Mikrofuge 22R (Brea, Kaliforniya, ABD) marka soğutmalı santrifüj kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit prosedürüne göre hazırlanan numuneler ve standartların mikroküvetlere pipetlenmesi ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. HPLC Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Kromatografik yöntemle MDA analizi için Çizelge 2.2.'de detaylı olarak birimleri hakkında bilgi verilen Agilent HPLC 1200 Serisi (Almanya) kullanılmıştır. HPLC çalışmalarında Shimadzu Shim-Pack SBC-ODS; 2.5 mm X 15 cm, 5 µm kolon (228-17268-91, Japonya) kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. HPLC sistemini oluşturan birimler

<u>Birimin Adı</u>	<u>Markası ve Modeli</u>
Degazör	Agilent 1200 Series Degasser
Pompa	Agilent 1200 Series Quadratic Pump
Enjektör	Agilent 1200 Series Auto Sampler
Kolon Fırını	Agilent 1200 Series Column Oven
Dedektör	Agilent 1200 Series Fluorescence Detector

HPLC çalışmalarında kullanılacak olan çözeltilerin hazırlanmasında tartım işlemleri AND GH Analytical Balance marka hassas terazi (Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Karıştırma işlemleri Heidolph marka vortex (Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Standart ve numunelerin analiz için hazırlanması sırasında TCA ile çökelek oluşturan proteinlerin ayrılması Beckman Coulter Allegra X-22R (Brea, Kaliforniya, ABD) marka santrifüj cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

HPLC analizi prosedüründe uygulanan inkübasyon işlemleri Elektro-mag marka ve M5040P model etüv (Nüve, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan numuneler ve standartların viallere pipetlenmesi ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada yapılan yüzey hazırlama, elektrokimyasal karakterizasyon ve elektrokimyasal olarak MDA tayini deneylerinde dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve open circuit potential (açık devre potansiyeli) tekniklerinin uygulanması amacıyla Gamry Reference 3000 potansiyostat/galvonostat cihazı (Warminster, USA) PHE 200, EIS 300 ve PV 220 yazılımları eşliğinde kullanılmıştır.

Hücre sistemi olarak; çalışma, referans ve karşıt elektrodu bünyesinde bulunduran üç elektrotlu Bioanalytical System (BAS) C3 hücre sistemi (West Lafayette, Indiana, ABD) kullanılmıştır. BAS hücre sisteminin özelliği sayesinde deneyler esnasında adsorpsiyonu engellemek ve oksijeni uzaklaştırarak inert bir ortam sağlamak için %99,99 saflıkta Argon gazının geçirilmesi otomatik olarak yapılabilmektedir.

C3 hücre sisteminde BAS Model MF-2012 (West Lafayette, Indiana, ABD) GC çalışma elektrodu, platin tel (Pt) yardımcı elektrot BAS Model MW-1032 (West Lafayette, Indiana, ABD), sulu ortamlarda Ag/AgCl/KCl'doy (BAS model MF-2052) (West Lafayette, Indiana, ABD) ve susuz ortamlarda ise

içerisinde CH₃CN'de 0,010 M AgNO₃ ve 100 mM TBATFB olacak şekilde hazırlanmış dolgu çözeltisiyle doldurulmuş Ag/Ag⁺ elektrotları (BAS model MF-2062) (West Lafayette, Indiana, ABD) referans elektrot olarak kullanılmışlardır.

Bu tez çalışmasında hazırlanmış olan yüzeylerin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla;

❖ Sıvı/sıvı ve sıvı/katı numuneler arasında temas açısı ölçümlerinin yanısıra katı numunelerin yüzey serbest enerjileri ile yüzey ve arayüzey geriliminin ölçülmesinde de kullanılabilen Dataphysics OCA15 pro marka ve model (Almanya) temas açısı ölçüm cihazı (Contact Angle) yüzey ıslanabilirliğinin (hidrofilik/hidrofobik) tespiti için kullanılmıştır.

❖ NSG30 tipi ile non-contact modda tarama yapılarak nanometre seviyesinde yüzey morfolojisinin aydınlatılması için NT-MDT marka ve NTegra Solaris model (Rusya) Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılmıştır.

❖ SEM-ZEISS LS-10 marka ve modelde (Almanya) taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Bu işlem yüzeyin kusursuz bir görüntü sunabilmesi için yüzeyler üzerine altın kaplama yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmalarında kullanılacak olan çözeltilerin hazırlamasında tartım işlemleri AND GH Analytical Balance marka (Japonya) terazi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Camsı karbon elektrot yüzeyini temizlemek ve bazı maddeleri çözmek için BANDELIN marka RK 100 (Almanya) model sonikatör kullanılmıştır. pH ölçümleri, VWR 1100L (Radnor, Pensilvanya, ABD) model pH metre ile yapılmıştır. Karıştırma işlemleri Heidolph marka (Almanya) vortex kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması süresince yapılan işlemlerde kullanılan cihazların kalibrasyonu, periyodik aralıklarla yapılmıştır.

2.2.4. Plazma Havuzunun ve Hasta Grubunun Oluşturulması

Hastalardan alınan kan örnekleri çalışıldıktan sonra arta kalan plazmanın alınabilir duruma getirilebilmesi için hemogram tüpleri Sigma marka soğutmalı 3K30 santrifüj (Almanya) kullanılarak santrifüj edilmiştir.

Kolorimetrik, HPLC ve biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere Selçuk Üniversitesi Selçuk Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran 250 kadın ve 250 erkekten oluşan sağlıklı bireylerin çalışılmış hemogram örneklerinin her birinden 1 mL plazma alınarak plazma havuzu oluşturulmuştur. Oluşturulan plazma havuzunun hemoliz değeri ölçülmüş ve hemoliz + olarak bulunmuştur. Çalışmalarda hasta grubu olarak; Selçuk Üniversitesi Selçuk Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran ve LDL seviyeleri;

- 50-129 mg/dL aralığında olan (düşük),
- 130-159 mg/dL aralığında olan (orta),
- ≥ 160 mg/dL olan (yüksek),

ve her bir grupta 15 kişi bulunan 3 grup oluşturulmuş; Kolorimetrik, HPLC ve Biyosensör çalışmada kullanılmak üzere herbir hasta numunesi 3'er porsiyonlanarak kullanım anına kadar -80°C 'de saklanmıştır. Hasta grubunda kullanılan kan örnekleri de yine hastaların arta kalan plazmalarından elde edilmiş, 3'er porsiyonlanarak kullanım anına kadar -80°C 'de saklanmıştır.

2.3. Kolorimetrik Yöntemle MDA Tayini

Kolorimetrik yöntemle MDA tayini için uygulanan işlem basamakları maddeler halinde verilmiştir;

5 mL'lik etiketlenmiş deney tüplerinin her birine 100 μ L standart veya plazma örneği alınır.



Her bir deney tüpüne 100 μ L SDS solüsyonu ilave edilerek vortekslenir.



Her bir deney tüpüne 4 mL renklendirici reaktif ilave edilir.



1 saat boyunca kaynar su banyosunda bekletilir.



Hızlı bir şekilde buz banyosuna yerleştirilerek soğuması sağlanır. 10 dk buz banyosunda bekletilerek reaksiyon sonlandırılır.



Tüpler 10 dk boyunca +4°C'de 1.600x g'de santrifüj edilir.



Oda sıcaklığında 30 dk stabil olan standartlar ve plazma örneklerinden 150 μ L alınarak sırasıyla mikropelatelere pipetlenir.



532 nm dalga boyunda SPECTROstar Nano (BMG LABTECH GmbH, ALMANYA) cihazında absorbansı ölçülür. Değerler, μ M olarak hesaplanır.

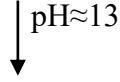
2.4. HPLC ile MDA Tayini

HPLC ile MDA tayini için (Hong ve ark 2000)'nın geliştirdiği floresan temelli yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre numune ve standartların hazırlanması işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

250 µL plazma/standart alınır.



25 µL BHT + 12,5 µL NaOH ilave edilir.



60°C'de 30 dk. inkübe edilir.



%1 oranında KI içeren 1,5 mL TCA



10 dk. buz içerisinde soğutulur.



2500 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.



1 mL süpernatant + 0,5 mL TBA



Karıştırılır ve 95°C'de 30 dk. inkübe edilir.



Soğutulur ve n-bütanol ile ekstrakte edilir.



Bütanollü tabakadan viallere alınarak numuneler analiz için hazır hale getirilmiş olur.

HPLC çalışma koşulları Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. HPLC çalışma koşulları

<i>Mobil Faz:</i>	0.01M KH ₂ PO ₄ (%30 metanol) + 0.01M K ₂ HPO ₄ (%30 metanol)
<i>Akış Hızı:</i>	1 mL /dk
<i>Kolon Türü:</i>	Shimadzu
<i>Fırın Sıcaklığı:</i>	30°C
<i>Uygulanan Prosedür:</i>	(Hong ve ark 2000)
<i>Dedektör Türü:</i>	Floresan Dedektör (530-560 nm)
<i>Enjeksiyon Hacmi:</i>	20 µL

2.5. MDA Analizine Yönelik Biyosensör Tasarımı

MDA analizine yönelik biyosensör tasarımı gerçekleştirmek için uygulanan işlem basamakları aşağıda sunulmuştur.

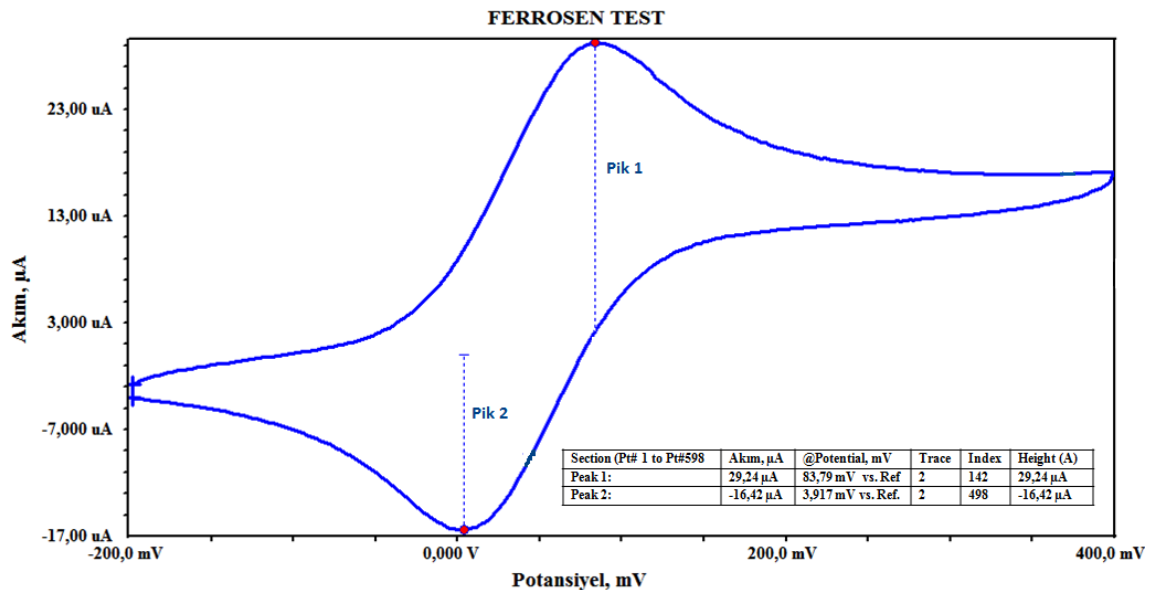
2.5.1. Çalışmada Kullanılan Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi

İnertliği, düşük elektriksel direnci, düşük zemin akımı, geniş potansiyel aralığında çalışılabilmesi, kolay üretilmesi, yenilenebilir yüzeyi ve düşük maliyeti gibi birçok avantaja sahip olmasından dolayı elektrokimyasal analizlerde yaygın olarak kullanılan karbon esaslı katı elektrotlar içerisinde camsı karbon elektrotlar mükemmel mekanik ve elektriksel özellikleri, geniş potansiyel aralığı, kimyasal inertliği ve tekrarlanabilir performansı ile daha çok tercih edilmektedir (Ye ve ark 2012, Nardiello ve ark 2015, Arun ve Sankaran 2016).

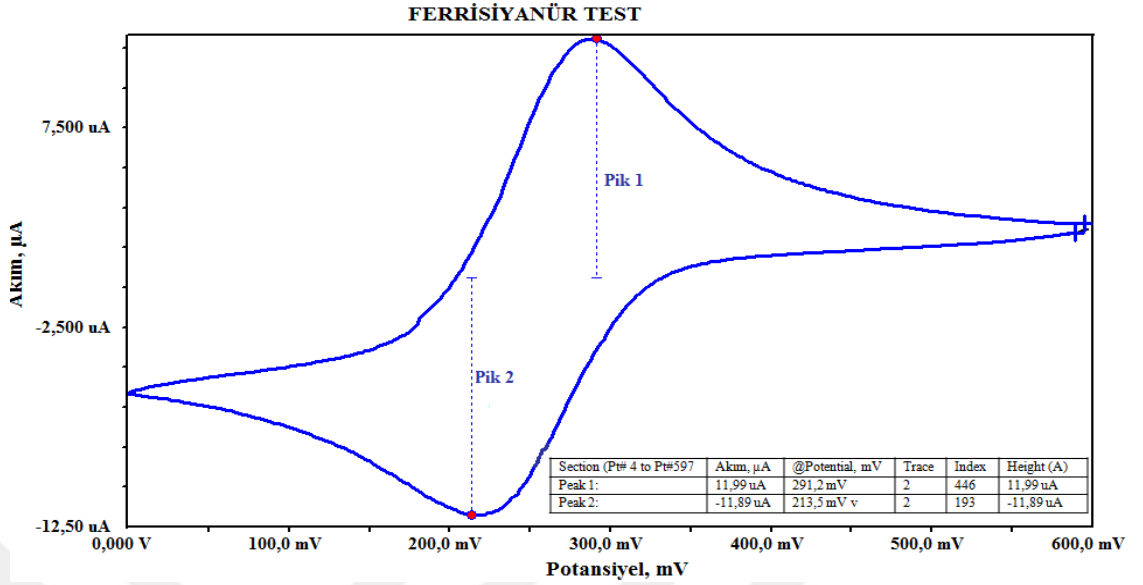
Elektrokimyasal analizlerde; elektrot yüzeyinin yeteri kadar temiz olmaması durumunda pik akımında azalma ve pik potansiyelinde kayma meydana gelmekte ve bu da analiz sonucunu olumsuz etkilemektedir. Bu yüzden elektrot yüzeyinin temizliği önem arz etmektedir. Elektrot yüzeyinin analizden önce temizlemesindeki amaç elektron transferini engelleyen adsorplanmış maddelerin yüzeyden uzaklaştırılması, elektrot yüzeyinin mikro yapısının değiştirilmesi ve buna bağlı olarak analiz sonuçlarının doğru ve güvenilir çıkması olarak açıklanabilir. Çalışma elektrodu olarak kullanılan camsı karbon (GC) elektrot saf su ile yıkandıktan sonra, sırasıyla kadife yüzeylere uygulanmış 0,30 ve 0,05 µm

boyutlarına sahip süspansiyon şeklindeki alümina tozları ile eşit sayıda dairesel hareketlerle parlak ve düzgün hale getirilerek temizlenmiştir. Burada farklı boyuttaki alümina tozların karışmaması önemlidir. Bu nedenle 0,30 µm boyutundaki alümina süspansiyonu ile temizlenen elektrot yüzeyi saf sudan geçirilmiş daha sonra bu yüzey 0,05 µm boyutundaki alümina süspansiyonu ile muamele edilmiştir. 0,05 µm boyutundaki alümina tozu ile temizlenen elektrot yüzeyindeki alümina tozları yüzeyin saf su ile yıkanmasıyla uzaklaştırılmış, yüzey saf suda 3 dakika sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Yüzeyde kalması olası diğer safsızlıklar asetonitril ile 3 dakika sonikasyon işlemi uygulanarak uzaklaştırılmıştır. Yüzeyi temizlenmiş ve parlatılmış olan elektrot, elektroanalitik çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.

Elektrot temizliğinin kontrol edilebilmesi için yukarıda belirtilen prosedürlerle temizlenmiş GC elektrot yüzeyleri elektrokimyasal olarak (i) 100 mM TBATFB içeren CH₃CN’de hazırlanmış 1,0 mM ferrosen çözeltisinde -0,2/+0,4 V potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında (ii) pH’ı 2,0 olan BR tampon çözeltisinde hazırlanmış 1,0 mM Fe(CN)₆³⁻ çözeltisinde +0,6/0,0 V potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında Ag/Ag⁺ ve Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektrotlarına karşı dönüşümlü voltametri tekniği ile karakterize edilmiş ve redoks reaksiyonlarına ait piklerin potansiyel farkları değerlendirilmiştir. İlgili testlere ait voltamogramlar Şekil 2.1. ve 2.2.’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Yalın GC elektrodun Ag/Ag⁺ referans elektroduna karşı ferrosen ile yüzey testi



Şekil 2.2. Yalın GC elektrodun Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroda karşı potasyum ferrisiyanür ile yüzey testi

Şekil 2.1. ve 2.2.'de verilen voltamogramlara ait pik potansiyelleri farkı (ΔE_p) ferrosen ve potasyum ferrisiyanür çözeltileri için sırasıyla 79,87 mV ve 77,70 mV olarak hesaplanmıştır. Tersinir bir elektrot reaksiyonu için pik potansiyelleri farkının $59/n$ olması gerektiği göz önüne alındığında 79,87 mV ve 77,70 mV; olarak hesaplanmış sonuçlar her iki redoks probun da temizlenmiş yalın GC elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak aktif olduğunu ve indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarının olması gereken şekilde meydana geldiğini dolayısıyla elektrot yüzeyinin yeteri kadar temiz olduğunu göstermiştir. Yapılan işlemlerden sonra çalışma elektrodu olarak GC elektrot elektroanalitik ölçümler için hazır hale getirilmiştir.

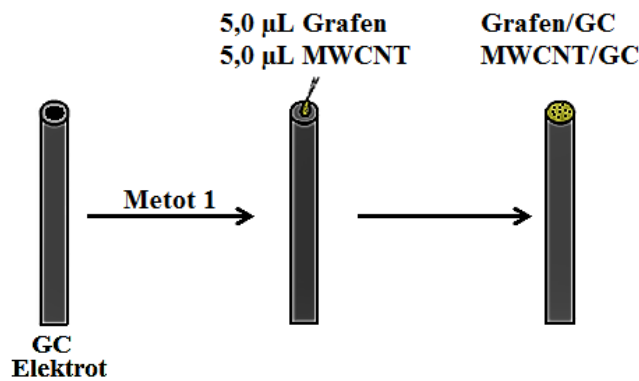
2.5.2. GC Elektrot Yüzeyinin Modifiye Edilmesi

Elektrot yüzeylerinin tabaka veya filmler ile kaplanarak elektrot yüzeyindeki elektron aktarım hızlarının değiştirilebilmesi, elektrokatalitik özelliği yüksek olan yüzeyler elde edilebilir. Bu nedenle, yüzey modifikasyonu, belirli bir türe karşı elektrodun duyarlı olabilmesi, malzemenin korozyona ve dış etkenlere karşı dayanıklılığının artırılması, elektron aktarım mekanizmasının açıklanabilmesi, enzimlerin modifiye elektrot yüzeyine tutturulması ile biyosensör yapımının

kolaylaştırılması amacıyla günümüzde önemli bir yer tutmaktadır. Modifikasyon, elektrot materyallerinin sınırlı olması sebebiyle elektrot yüzeylerini türevlendirebilmek için de sıklıkla başvuru alan bir yöntemdir. Böylece elektrot yüzeyi farklı bir çalışma alanı sunduğu gibi seçicilik ya da katalizörlük gibi özellikler de kazanabilir. Buna bağlı olarak elektrot türlerinde bir çeşitlilik sağlanmış olup yeni uygulama alanları oluşturulabilir. Bu çalışma fiziksel ve elektrokimyasal metotla GC elektrot yüzeyinin modifikasyonunun gerçekleştirilmesi ve elde edilen modifiye yüzeylerle MDA tayininin yapılmasının yanı sıra her iki yöntemin birleştirildiği kombine bir yüzey modifikasyonu ile de MDA tayininin gerçekleştirilmesini içermektedir. Her bir yöntemle hazırlanan yüzeyler aşağıda madeler halinde verilmiştir.

A. Fiziksel Modifikasyon:

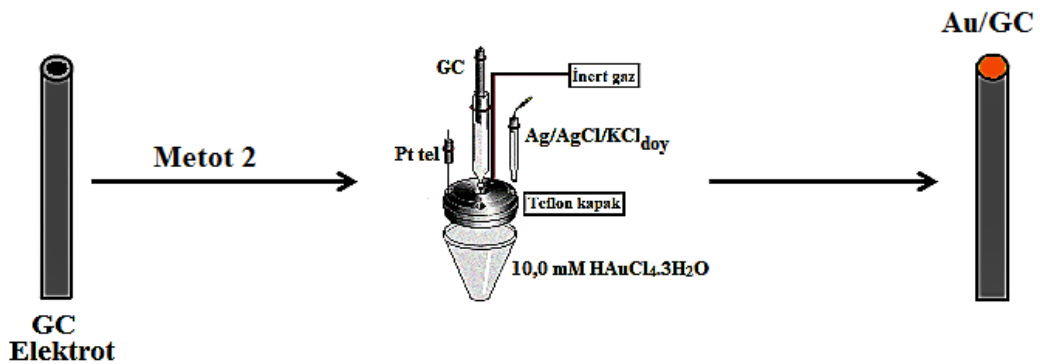
Bu yöntem ile modifikasyon için çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve grafenin (GR) 1,0 mg/mL olacak şekilde saf su ile süspansiyonları hazırlanmış ve bu dispers haldeki çözeltiler, prosedüre uygun olarak temizlenmiş yalın GC yüzeyine her defasında 5,0 μ L hacimde olmak üzere 3 kez damlatılmış ve her bir damlatma işleminin bir önceki damlanın oda sıcaklığında kurummasının ardından yapılmasına dikkat edilerek gerçekleştirilmiştir. Böylece, MWCNT-modifiye camısı karbon elektrot (MWCNT/GC) ve grafen-modifiye camısı karbon (GR/GC) elektrot şeklinde tanımlanan yüzeyler hazırlanmıştır. (Metot 1). Burada anlatılan işlem basamakları sonucunda hazırlanan elektrot yüzeyi Şekil 2.3.'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Elektrot yüzeylerinin Metot 1'e göre hazırlanmasının şematik gösterimi

B. Elektrokimyasal Modifikasyon:

Bu çalışmada kronoamperometri tekniği uygulanarak sabit potansiyelde akım değişimine bağlı olarak camı karbon elektrot yüzeyinde elektrobiriktirme işlemi ile altın maddesine ait bir film oluşumu sonucu elektrokimyasal modifikasyon yöntemi ile altın-modifiye camı karbon (Au/GC) elektrot yüzeyi hazırlanmıştır. Yalın GC elektrot yüzeyinin elektrokimyasal olarak modifikasyonunun yapılması için 10,0 mM'lık $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M KCl ortamında hazırlanmış ve hücreye alınmıştır. Hücre 3 elektrot sistemine yerleştirilmiş; çalışma elektrodu olarak temizleme basamaklarından geçmiş GC elektrot, referans elektrot olarak $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{doy}}$ referans elektrot ve karşıt elektrot olarak Pt tel kullanılmış, -300 mV potansiyel uygulanarak çeşitli zaman dilimlerinde (1800, 3600, 5400, 7200 ve 9000 sn) kronoamperometrik yöntemle elektrot yüzeyinde altının elektrokimyasal olarak biriktirilmesi sağlanmıştır (Metot 2). Burada anlatılan işlem basamakları sonucunda hazırlanan elektrot yüzeyi Şekil 2.4.'te şematize edilmiştir.

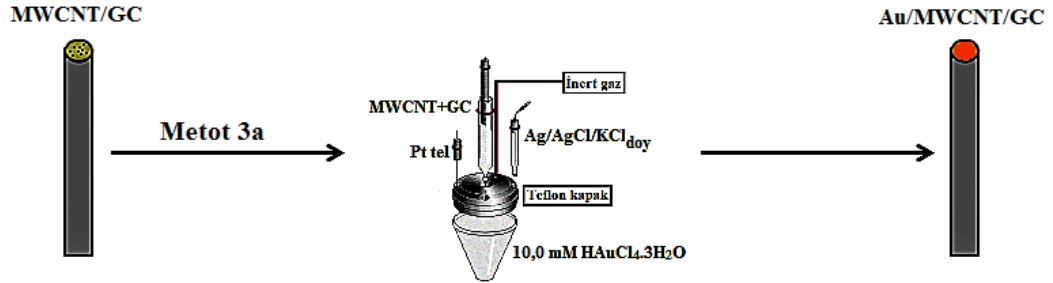


Şekil 2.4. Elektrot yüzeylerinin Metot 2'ye göre hazırlanmasının şematik gösterimi

C. Fiziksel ve Elektrokimyasal Modifikasyon

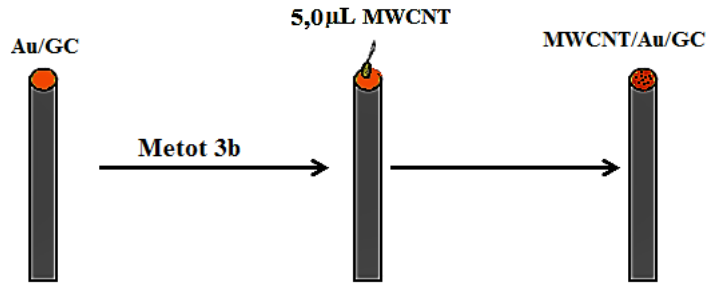
Yapılan deneyler sonucunda MDA molekülüne en iyi yanıt veren (Metot 1 ve Metot 2) iki yüzeyi oluşturan maddelerle, yine iki farklı metotla elektrot yüzeyinin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla GC elektrot yüzeyi önce yukarıda belirtildiği şekilde MWCNT ile hazırlanmış (Metot 1), elde edilen MWCNT/GC elektrot yüzeyine belirtilen şartlarda kronoamperometrik teknikle 7200 sn boyunca Au biriktirilmiş (Metot 2) ve elde edilen elektrot yüzeyi Au/MWCNT/GC olarak tanımlanmıştır (Metot 3a). Burada anlatılan işlem

basamakları sonucunda hazırlanan elektrot yüzeyi Şekil 2.5.'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.5. Elektrot yüzeylerinin Metot 3a' ya göre hazırlanmasının şematik gösterimi

Aynı zamanda Au/GC elektrot yüzeyi belirtilen şartlarda hazırlanmış (Metot 2) ve hazırlanan bu yüzeye 5,0 µL hacimde 3 kez MWCNT damlatılmış (Metot 1) elde edilen elektrot yüzeyi MWCNT/Au/GC olarak tanımlanmıştır (Metot 3b). Burada anlatılan işlem basamakları sonucunda hazırlanan elektrot yüzeyi Şekil 2.6.'da şematize edilmiş ve tüm yöntemlerle hazırlanan elektrot yüzeylerine ait kısaltmalar Çizelge 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.6. Elektrot yüzeylerinin Metot 3b'ye göre hazırlanmasının şematik gösterimi

Çizelge 2.4. Şekil 2.3.-2.6.'da gösterildiği şekilde hazırlanan elektrot yüzeylerine ait kısaltmalar

Metot 1	MWCNT/GC	3 kez 5 μ L MWCNT damlatılması sonucu elde edilen modifiye GC elektrot yüzeyi
	GR/GC	3 kez 5 μ L GR damlatılması sonucu elde edilen modifiye GC elektrot yüzeyi
Metot 2	Au/GC	Kronoamperometrik yöntemle GC elektrot yüzeyinde altın biriktirilmesi sonucu elde edilen modifiye GC elektrot yüzeyi
Metot 3a	Au/MWCNT/GC	3 kez 5 μ L MWCNT damlatılmış GC elektrot yüzeyine kronoamperometrik yöntemle altın biriktirilmesi sonucu elde edilen modifiye GC elektrot yüzeyi
Metot 3b	MWCNT/Au/GC	Kronoamperometrik yöntemle GC elektrot yüzeyinde altın biriktirilmesi sonucu elde edilen GC elektrot yüzeyine 3 kez 5 μ L MWCNT damlatılması sonucu elde edilen modifiye GC elektrot yüzeyi

Metot 3a ve 3b'ye göre hazırlanmış olan elektrotlarla MDA tayini gerçekleştirilmiş bu iki yöntemle hazırlanan elektrotlardan en iyi cevabı veren yüzey üzerinden deneysel çalışmalara devam edilmiştir. Bu nedenle Metot 3b'ye göre hazırlanan elektrot ileri uygulamalara ve karakterizasyon çalışmalarına dahil edilmemiştir.

2.5.3. Yalın ve Modifiye Yüzeylerin Karakterizasyonu

Bölüm 2.5.1. ve 2.5.2'de anlatıldığı şekilde temizlenmiş ve modifiye edilmiş olan GC elektrot yüzeylerinin çeşitli tekniklerle karakterizasyonları

yapılmıştır. Elektrokimyasal karakterizasyon için redoks problemler varlığında dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır.

Daha önceki bölümlerde belirtildiği şekilde temizlenmiş yalın GC ve temizlenme sonrası modifiye edilmiş GC [MWCNT/GC; GR/GC; Au/GC ve Au/MWCNT/GC] elektrot yüzeylerini dönüşümlü voltametri tekniği ile karakterize etmek amacıyla (i) 100 mM TBATFB içeren CH₃CN'de hazırlanmış 1,0 mM ferrosen çözeltisinde, -0,2/+0,4 V potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında, (ii) pH'ı 2,0 olan BR tampon çözeltisinde hazırlanmış 1,0 mM potasyum ferrisiyanür çözeltisinde, +0,6/0,0 V potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında Ag/Ag⁺ ve Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektrotlarına karşı voltamogramlar kaydedilmiştir.

Dönüşümlü voltametri tekniği ile yapılan elektrokimyasal karakterizasyona ek olarak yalın ve modifiye yüzeyler elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile de karakterize edilmiş ve bu amaçla 75000-0,05 Hz frekans aralığında, 1,0 mM ferri/ferrosiyanür karışımı içeren 100 mM KCl çözeltisinde, Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrileri kaydedilmiştir.

Elektrokimyasal tekniklerin yanı sıra yalın ve hazırlanan modifiye GC yüzeylerin topografik ve morfolojik özelliklerinin aydınlatılması amacıyla; Yüzey Temas Açısı Ölçümü (Contact Angle), Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) ve Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

Yalın GC ve modifiye GC elektrot [MWCNT/GC; GR/GC; Au/GC ve Au/MWCNT/GC] yüzeylerine 5,00 µL distile su, iğnenin ucunun elektrot yüzeyine temas etmesini engellemek için non-contact modda mikro şırınga enjeksiyon sistemi kullanılarak damlatılmış ve yüzeylerin su damlasıyla oluşturduğu temas açıları Dataphysics OCA15 pro marka ve model (Almanya) temas açısı ölçüm cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler sağ ve sol açı değerlerinin ortalaması olarak verilmiş ve ortalama değerler üzerinden veriler yorumlanmıştır.

❖ Yüzeyi kaplayan parçacıkların büyüklükleri ve şekli, elektriksel yük ve manyetiklik gibi bu parçacıkların birbirleriyle olan etkileşimleri, yüzeyde meydana gelen aşınma, korozyon, pürüzlendirme gibi nanomekanik özellikleri hakkında bilgi sağlamanın yanı sıra örnek yüzeyinin görünümü, atomların madde içindeki düzenlenmeleri, yüzey üzerinde bulunan moleküler yapılar arasındaki ilişkiler ve sertlik, yansıma gibi maddesel özellikler hakkında fikir edinilmesini de sağlar. Yalın ve modifiye GC elektrot yüzeylerinin topografisini incelemek amacıyla hazırlanan tüm elektrot yüzeylerinin NT-MDT marka ve NTegra Solaris model (Rusya) Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile $75 \times 75 \mu\text{m}$; $50 \times 50 \mu\text{m}$ ve $25 \times 25 \mu\text{m}$ tarama alanlarında NSG30 tipi ile non-contact moda görüntüleri alınmış, 3 boyutlu olarak işlenmiş ve sonuçlar Average Roughness (Ortalama Pürüzlülük) değerleri kullanılarak yorumlanmıştır.

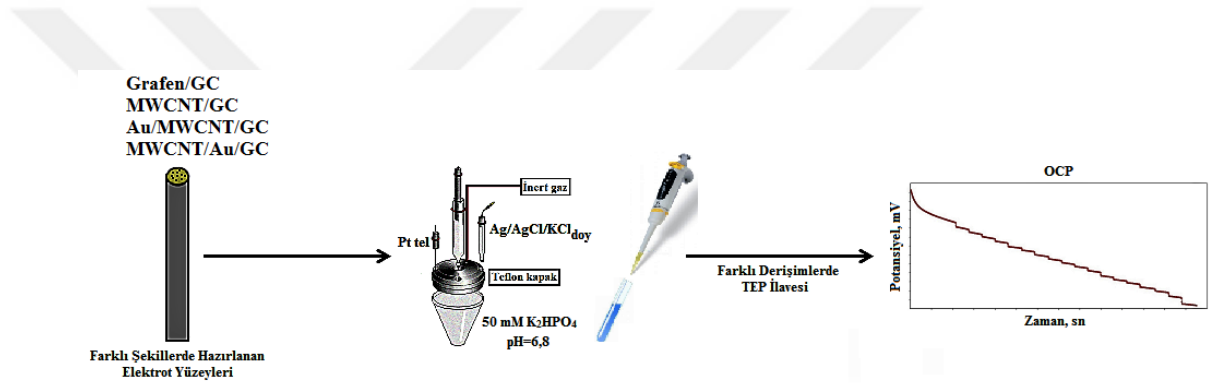
Taramalı elektron mikroskobunda (Scanning Electron Microscope, SEM), görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan ve çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkileşimlerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilmektedir. Dolayısıyla SEM elektrooptik prensibe dayalı çalışan bir cihazdır. Çalışmamızda kullandığımız yalın ve modifiye GC elektrot yüzeylerinin yüzey morfolojilerinin belirlenmesi için SEM-ZEISS LS-10 (Almanya) marka ve modelde taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Bu işlem yüzeyin kusursuz bir görüntü sunabilmesi için yüzeyler üzerine altın kaplama yapılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5.4. Uygulama Çalışmaları

MWCNT/GC; Grafen/GC; Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinin MDA molekülüne karşı elektrokimyasal yanıtları incelenmiştir. Uygulamayı gerçekleştirebilmek ve HPLC sonuçlarıyla karşılaştırmasını yapabilmek için HPLC sisteminde uygulanan şartlar aynen biyosensör uygulamalarına da yansıtılmıştır. Bu nedenle 50 mM K_2HPO_4 tampon çözeltisinin (PBS) 1,0 M'lık hidroklorik asit ve 1,0 M'lık NaOH çözeltisi ile pH değeri 6,8'e ayarlanmış hacim saf su ile litreye tamamlanmış ve metanol-fosfat tamponu

karışımı hazırlanarak (%65 K_2HPO_4 - %35 metanol) elektrokimyasal ölçümlerde tampon sistemi olarak bu karışım kullanılmıştır. MDA'nın sıcaklığa duyarlı olması ve ortam sıcaklığına bağlı olarak sistemin yanıtında ciddi farklılık oluşturması nedeniyle çalışma boyunca sıcaklık değeri (kolon sıcaklığında olduğu gibi) $30^\circ C$ 'de sabit tutulmuştur.

Yukarıda anlatılan şekillerde hazırlanan GC elektrotların, 5,0 mL pH'ı 6,8 olan fosfat (PBS) tampon çözelti ortamında Ag/AgCl/ KCl_{doy} referans elektrodu kullanılarak farklı tetraetoksipropan (TEP) konsantrasyonlarına karşı potansiyometrik ölçümleri üçer kez tekrarlanarak kaydedilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan işlemler Şekil 2.7.'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. Hazırlanan elektrot yüzeylerinde farklı konsantrasyonlarda TEP ilavesi ile OCP ölçümleri

Alınan OCP ölçümlerinin sonuçları değerlendirilmiş ve optimum yüzey Au/GC olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan modifiye elektrot yüzeylerinin tampon çözelti ortamında kararlılığını belirlemek amacıyla yüzeyler 0; 2; 4; 6; 8; 12; 18; 24 ve 36 saat boyunca tampon ortamında bekletilerek OCP ölçümleri alınmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Tekrar üretilebilirlik çalışmalarında yüzey optimal şartlarda her defasında yeniden hazırlanarak elektrot yüzeylerinin MDA'ya karşı elektrokimyasal yanıtları OCP yöntemi uygulanarak farklı konsantrasyonlarda 1,1,3,3-tetraetoksipropanın ortama ilavesi sonucu incelenmiştir. Bu amaçla optimum şartlarda üç farklı elektrot hazırlanmış üç ölçümden elde edilen sonuçlar 1,1,3,3-tetraetoksipropanın konsantrasyonuna karşı potansiyel farkı şeklinde grafiğe aktarılarak kaydedilmiş ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise Au/GC yüzeyi bir kez optimum şartlarda hazırlanmış, elektrot yüzeylerinin MDA'ya karşı elektrokimyasal yanıtları OCP yöntemi uygulanarak farklı konsantrasyonlarda

1,1,3,3-tetraetoksipropanın ortama ilavesi sonucu incelenmiş, elde edilen sonuçlar potansiyomogram olarak kaydedilmiş, elektrot yüzeyleri saf su ile yıkanmış, tampon ortamı tazelenmiş ve tekrar 1,1,3,3-tetraetoksipropanın ortama ilavesiyle OCP ölçümü alınarak potansiyomogramı kaydedilmiştir. Bu işlem için optimal şartlarda 3 farklı elektrot hazırlanmış ve her bir elektrot yüzeyinde ardarda 3'er kez ölçüm alınmış, her bir ölçüm sonucunda elde edilen veriler 1,1,3,3-tetraetoksipropanın konsantrasyonuna karşı potansiyel farkı şeklinde grafiğe aktarılarak kaydedilmiş ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

2.6. İstatistiksel Analiz

Sunulan tez çalışmasında istatistiksel analizler için SPSS, Med-Calc ve Minitab paket programları kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilks testleri yapılarak kontrol edilmiştir. LDL ve MDA değişkenlerine ilişkin grup ortalamaları arasında fark olup olmadığını test etmek amacıyla SPSS paket programı kullanılarak ANOVA ve Welch testleri uygulanmıştır. Minitab paket programı kullanılarak HPLC ve potansiyometrik biyosensörün kullanıldığı elektrokimyasal sensörler ile analiz edilen MDA değerlerinin tekrarlanabilirliği, varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Kolorimetrik ve biyosensör ölçümleriyle elde edilen MDA değerlerinin uyum analizinde ise, MadCalc paket programı kullanılarak Deming Regresyon ve Bland-Altman yöntemleri uygulanmıştır.

3. BULGULAR

Bu tez çalışması 3 ana bölümden oluşmakta olup, birinci bölüm MDA tayini için geleneksel ve yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan kolorimetrik çalışmaları, ikinci bölüm MDA tayinine yönelik HPLC analiz yönteminin geliştirilmesini üçüncü bölüm ise MDA tayini için daha önce denenmemiş farklı nanomateryaller kullanılarak biyosensör tasarlanmasını kapsamaktadır. Dolayısıyla söz konusu tez çalışması ile MDA tayini için literatürdeki mevcut HPLC metotlarından modifiye HPLC metodunun geliştirilmesinin yanısıra yeni bir biyosensör tasarımının yapılması da sağlanmıştır. Kolorimetrik analizler için kullanılan ticari test kiti, modifiye edilen HPLC metodu ve de tasarlanmış olan biyosensör ile hasta kan örneklerinde yapılan çalışmalarla, metotların performans standartlarını tarafsız olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle yöntemin geçerlilik standartlarının hesaplamaları yapılmış ve bu metotların birbirleri ile uyum ve üstünlükleri istatistiksel olarak tespit edilerek kapsamlı bir çalışma ortaya konulmuştur.

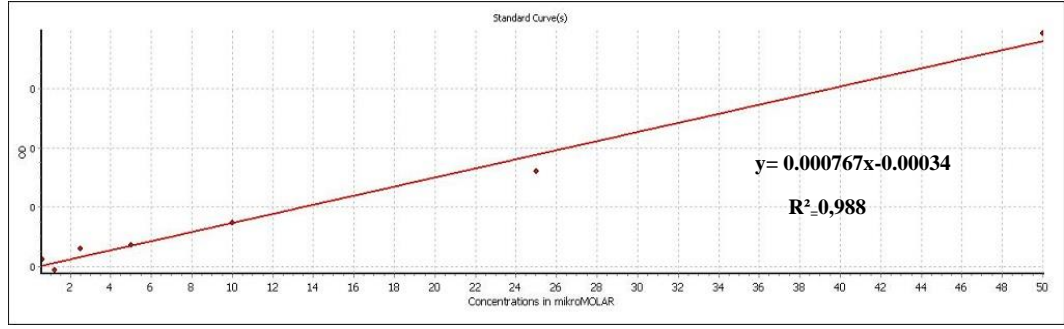
3.1. Kolorimetrik Yöntem ile MDA Analizine Ait Bulgular

3.1.1. Kolorimetrik test kiti bilgileri

Plazma MDA analizlerinde kullanılan Cayman marka (katalog no: 10009055, Cayman Chemical Company, USA) TBARS test kitinin içeriğinde lineer test aralığı 0-50 μM olarak belirtilmiştir.

3.1.2. Standart grafiği

Kolorimetrik yöntemle MDA analizine dair standart grafiği Şekil 3.1.'de gösterildiği şekilde olup, 50,0; 25,0; 10,0; 5,0; 2,50; 1,25; 0,625 ve 0 μM konsantrasyonlarındaki standartların her birinin 532 nm dalga boyunda SPECTROstar Nano (BMG LABTECH GmbH, ALMANYA) cihazında verdiği absorbans değerleri grafikte belirtilmiştir. Standart grafiğine ait denklem $y=0.000767x-0.00034$ iken R^2 değeri 0,988 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Kolorimetrik analize ait standart grafiği

3.1.3. Linearite Çalışması

Plazma MDA linearite verileri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir. 50 μM başlayıp seri dilusyonlarla 0,625 μM 'a kadar alınan ölçümlerin uygunluk yüzdesi hesaplanmıştır. Linearite çalışması için 7 düzeyden iki tekrarlı ölçümler alınmıştır (Westgard 2008, Gün 2014). Ölçümlerin ortalamaları alınmış ve elde edilen ortalama değerin beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılması ile ölçümlerin uygunluk % değerleri bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Plazma MDA linearite verileri

<u>MDA</u> <u>(μM)</u>	<u>Dilasyon</u> <u>No</u>	<u>MDA (μM)</u> <u>1.Ölçüm</u>	<u>MDA (μM)</u> <u>2. Ölçüm</u>	<u>Ölçümlerin</u> <u>Ortalaması</u>	<u>% Uygunluk</u>
50	1	54,26	49,18	51,72	103,44
25	2	19,47	23,25	21,36	85,428
10	3	9,43	10,74	10,09	100,85
5	4	4,87	5,39	5,13	102,64
2.5	5	0,83	0,44	2,62	104,72
1.25	6	0,80	0,60	0,70	56,04
0.625	7	0,50	0,41	0,46	72,72

3.1.4. Tekrarlanabilirlik çalışması

Çalışmamızda tekrarlanabilirlik değerleri olarak ticari test kiti prosedüründeki değerler dikkate alınmış ve diğer çalışma metotları ile kıyaslanmalarında bu değerler kullanılmıştır. Kit içeriğinde, kolorimetrik MDA analizi için gün-içi CV (Coefficient of Variation) değeri 10 insan plazması bazında % 5,5 ve günler-arası değeri 8 insan plazması bazında %5,9 olarak bildirilmiş ve diğer metotlarla karşılaştırmalar yapılmıştır.

3.1.5. Girişim çalışması

Kit prosedüründe TBARS yöntemi ile MDA analizinde 250 mM sükrözün girişime (interferansa) neden olduğu belirtilmiş olup, söz konusu madde biyosensörde denenmiştir.

3.1.6. Hemoliz, ikterik, lipemik ve dondur-çöz etkisinin belirlenmesi çalışması

Oluşturulan plazma havuzunun hemoliz değeri ölçülmüş ve (+) bulunmuştur. Hemolizli numune ise (+++) olarak değerlendirilmiştir. Dondurma ve çözme işleminin MDA ölçümüne etkisini belirlemek amacıyla plazma havuzu -80°C’de dondurulmuştur. 1. ve 3. gün dondurulup çözülerek kolorimetrik olarak MDA tayini yapılmış ve değerler kaydedilmiştir. İkterik, hemoliz ve lipemik numuneler ile dondurup çözme işlemi gerçekleştirilen numunelerin ölçüm sonuçları kaydedilmiş ve Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Hemoliz, ikterik, lipemik ve dondur-çöz yapılmış plazma numunelerinde ölçülen MDA değerleri

<u>Plazma Özelliği</u>	<u>ÖlçülenMDA Değerleri (µM)</u>	<u>Bazal MDA Değerleri (µM)</u>	<u>% Fark</u>
Hemoliz (+++)	7,5	6,35	18,1
İkterik	4,1	6,35	35,4
Lipemik	8,04	6,35	26,6
1. Don-Çöz	5,77	6,35	9,1
2. Don-Çöz	5,20	5,77	11,0

Çizelge 3.2.'de ifade edildiği üzere hemoliz ve lipemik numuneleri sırasıyla %18,1 ve %26,6 daha yüksek okunmuştur. İkterik numune ile dondurulup çözülen numuneler ise sırasıyla %35,4; %9,1 ve %11,0 daha düşük okunmuştur. Numune dondurulup çözüldüğünde MDA değeri 5,77 µM ve ikinci kez dondurulup tekrar çözüldüğünde ise 5,20 µM olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla dondurulup tekrar çözüme sayısı arttıkça MDA değerleri daha düşük çıkmaktadır.

3.1.7. Yüksek-orta-düşük LDL düzeyli hastalarda MDA değerlerinin belirlenmesi

Çalışmamızda, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Merkez Laboratuvarına gelen hemogram tüplerindeki hasta plazma örneklerinin arta kalan kısımları kullanılmış olup, hastaların LDL-kolesterol düzeyleri normal seviyeli (<130 mg/dL) (Grup 1), orta riskli seviyeli (130-159 mg/dL) (Grup 2) ve yüksek riskli seviyeli (≥ 160 mg/dL) (Grup 3) vakalar (Tietz 1992) olarak ayrılarak her bir grup için n sayısı 15 olarak belirlenmiştir.

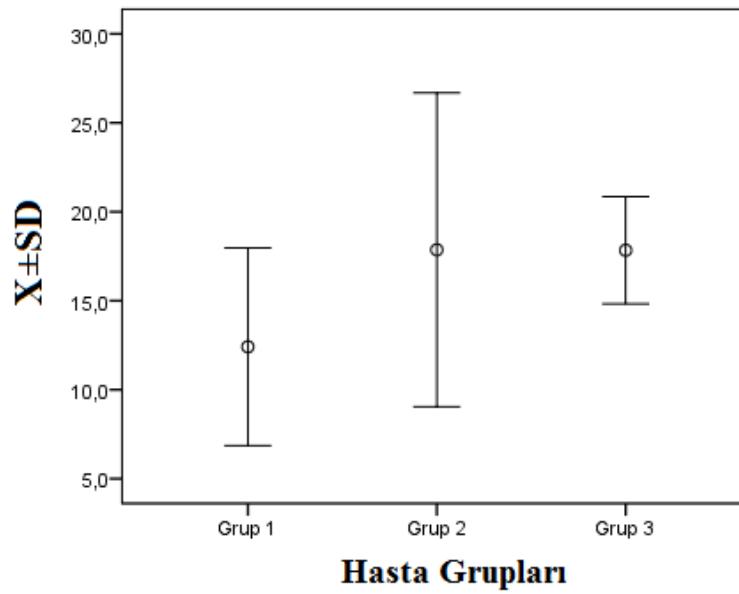
Kolmogorov-Smirnov test istatistiği uygulanmış ve her bir gruba ilişkin kolorimetri metodu ile ölçülen MDA değerleri için normallik varsayımı sağlanmıştır ($p > \alpha = 0,05$). Kolorimetri ölçümlerine göre grup varyansları homojen olmadığından MDA değişkenlerinin grup ortalamaları arasında fark olup olmadığını belirlemek için Welch Testi uygulanmıştır.

Welch testi sonucuna göre Kolorimetri ölçümlerine ilişkin MDA değişkeninin grup ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Welch istatistiği=5,517; $p = 0,011 < \alpha = 0,05$). Çoklu karşılaştırma Tamhane test istatistiği sonucuna göre MDA grup ortalamalarından sadece Grup 1 ve Grup 2 ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p < \alpha = 0,05$).

Kolorimetrik ölçümlere ilişkin MDA değişkenlerinin gruplara göre minimum, maksimum değerleri, ortalamaları ve standart sapmaları Çizelge 3.3.'te, ilgili verilere ait grafik ise Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kolorimetrik ölçümlere ilişkin MDA değişkenlerinin gruplara göre minimum-maksimum değerleri, ortalamaları ve standart sapmaları

	<i>Minimum MDA değeri (μM)</i>	<i>Maksimum MDA değeri (μM)</i>	<i>Ort. \pm St. Sapma (μM)</i>
Grup 1 (Normal LDL düzeyine sahip vakalar)	5,92	23,25	12,41 \pm 5,55
Grup 2 (Orta risk LDL düzeyine sahip vakalar)	6,96	39,26	17,87 \pm 8,82
Grup 3 (Yüksek risk LDL düzeyine sahip vakalar)	12,69	23,12	17,84 \pm 3,01



Şekil 3.2. Kolorimetrik ölçümlere ilişkin MDA değişkenlerinin gruplara göre minimum-maksimum değerleri, ortalamaları ve standart sapmaları

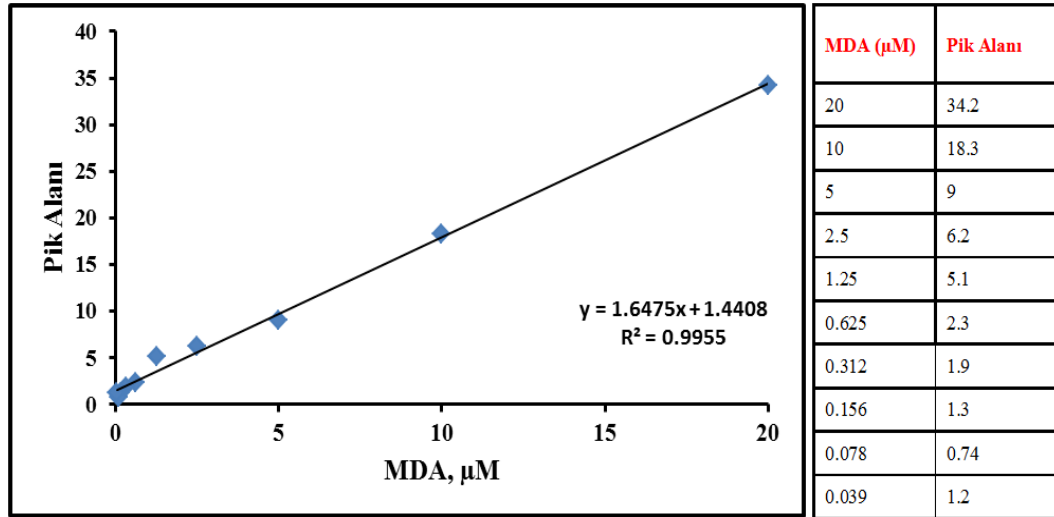
3.2. HPLC Yöntemiyle MDA Analizine Ait Bulgular

3.2.1. HPLC yöntem bilgileri

Plazma MDA analizleri, (Hong ve ark 2000) tarafından geliştirilen Total plazma TBA-MDA düzeylerinin ölçümü için modifiye metot ve (Seljeskog ve ark 2006) tarafından geliştirilen metotlar modifiye edilerek Agilent HPLC 1200 Serisi (Almanya) cihazında Shimadzu Shim-Pack SBC-ODS; 2.5 mm X 15 cm kolon (228-17268-91, Japonya) kolon kullanılarak Çizelge 2.3.'de verilen çalışma şartlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Standart grafiği

HPLC metodu ile MDA analizine dair standart grafiği Şekil 3.3.'te gösterildiği şekilde olup, 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.312; 0.156; 0.078 ve 0,039 µM konsantrasyonlarındaki standartların her birinin HPLC çalışma koşullarında oluşturduğu pik alanı grafikte belirtilmiştir. Standart grafiğine ait denklem $y=1.6475x + 1.4408$ iken R^2 değeri 0.9955 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. HPLC analizine ait standart grafiği

3.2.3. Linearite Çalışması

Plazma MDA Linearite verileri Çizelge 3.4.'te gösterilmektedir. 20 µM başlayıp seri dilusyonlarla 0,312 µM'a kadar alınan ölçümlerin uygunluk yüzdesi hesaplanmıştır. Linearite için 7 düzey iki tekrarlı çalışılmıştır (Westgard 2008).

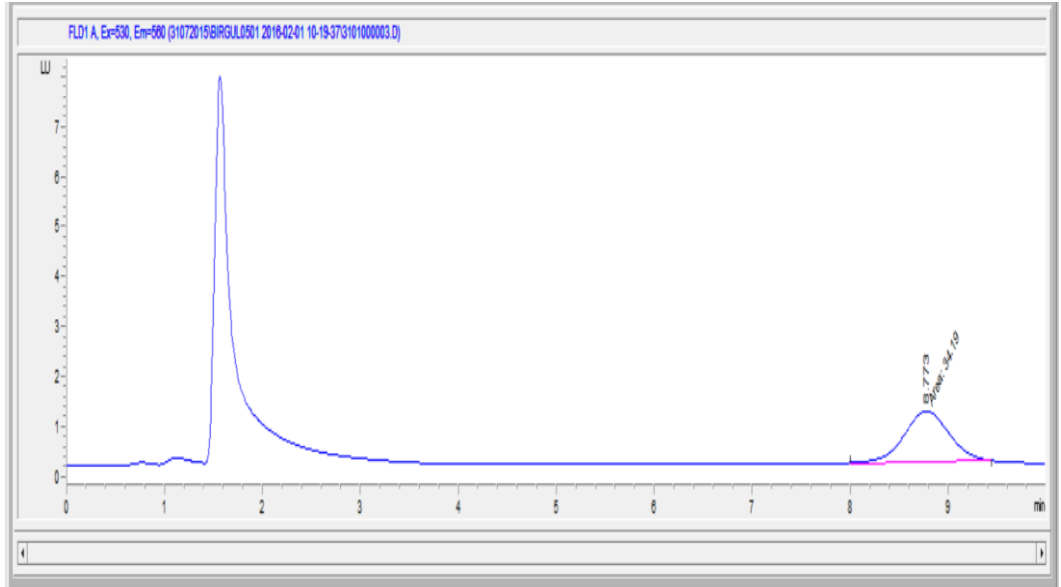
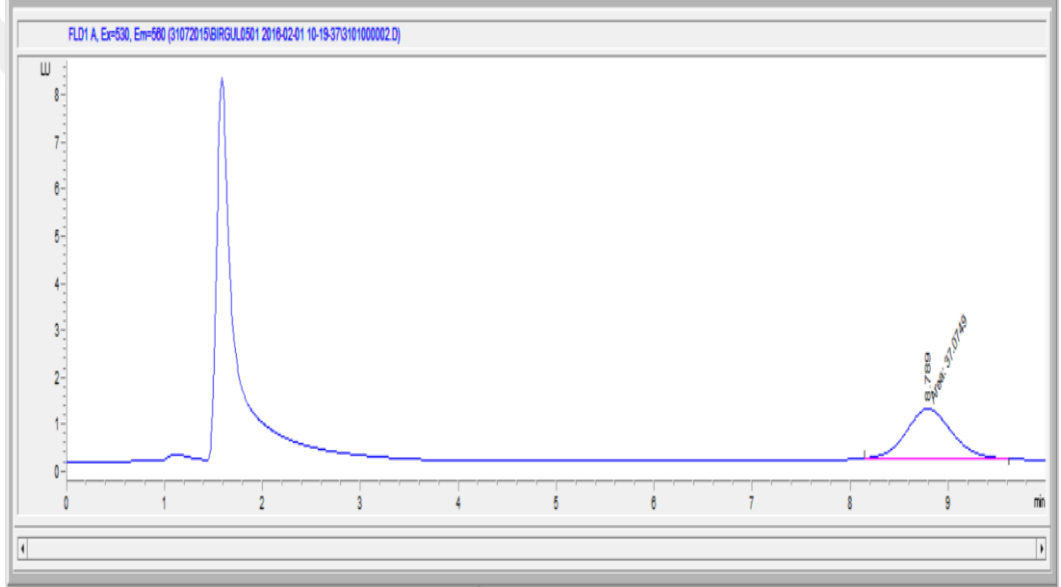
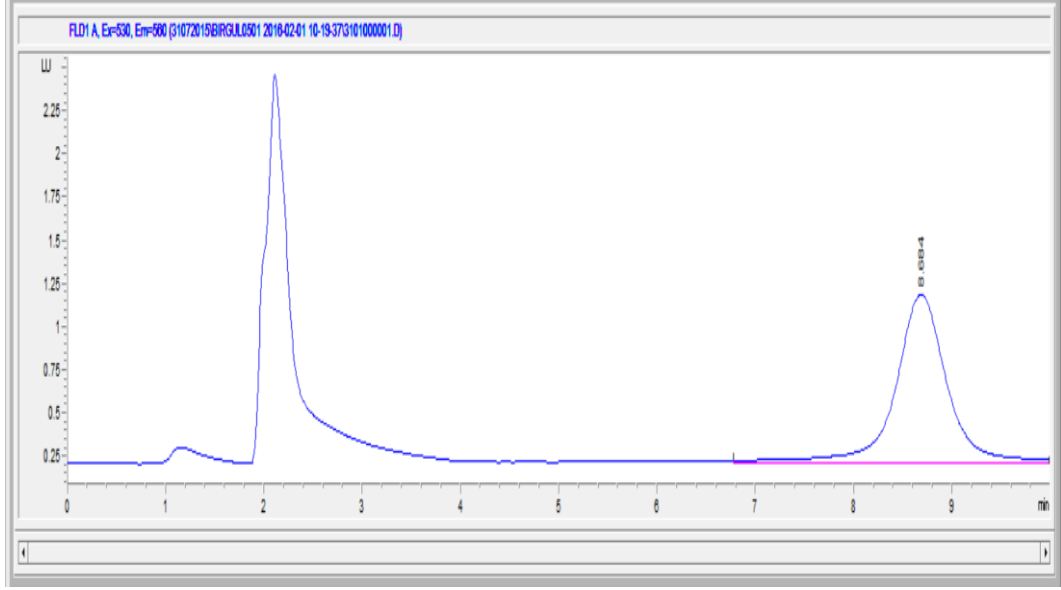
Ölçülen değerin beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılması ile uygunluk % değerleri ifade edilmiştir.

Çizelge 3.4. MDA linearite verileri

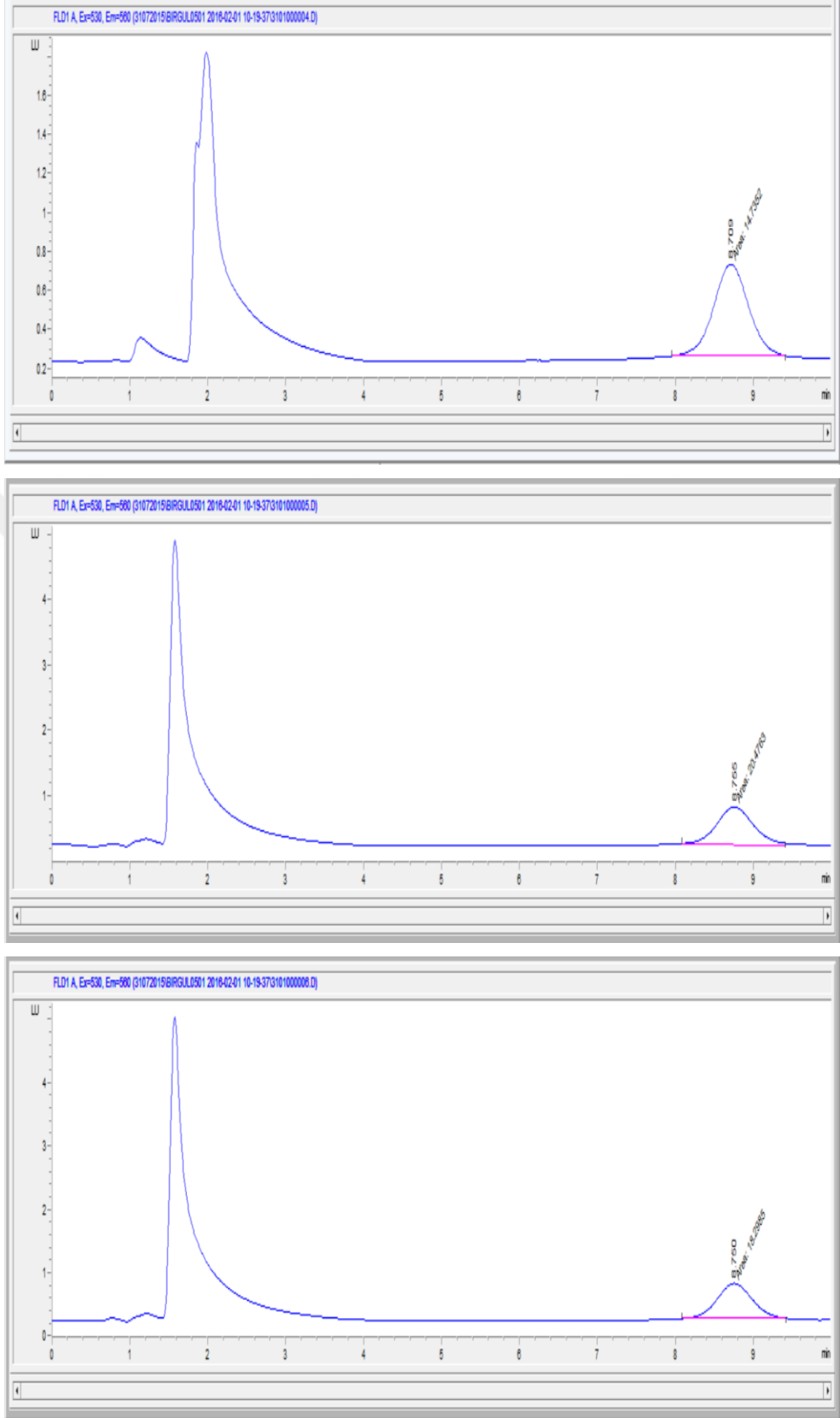
<u>MDA</u> <u>(μM)</u>	<u>Dilüsyon</u> <u>No</u>	<u>MDA (μM)</u> <u>1. Ölçüm</u>	<u>MDA (μM)</u> <u>2. Ölçüm</u>	<u>Ölçümlerin</u> <u>Ortalaması</u>	<u>% Uygunluk</u>
20	1	21.34	19.64	20.49	102.46
10	2	8.05	11.57	9.81	98.08
5	3	4.47	5.86	5.17	103.30
2,5	4	2.46	3.44	2.95	117.98
1,25	5	1.86	1.98	1.92	153.41
0,625	6	0.52	0.76	0.64	102.87
0,312	7	0.28	0.40	0.34	108.79

3.2.4. Tekrarlanabilirlik çalışması

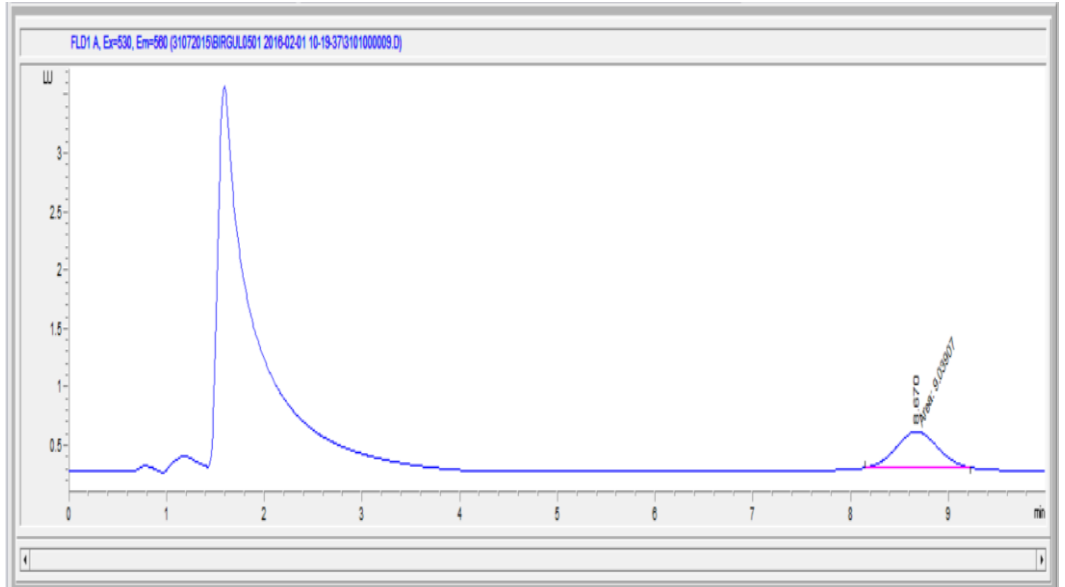
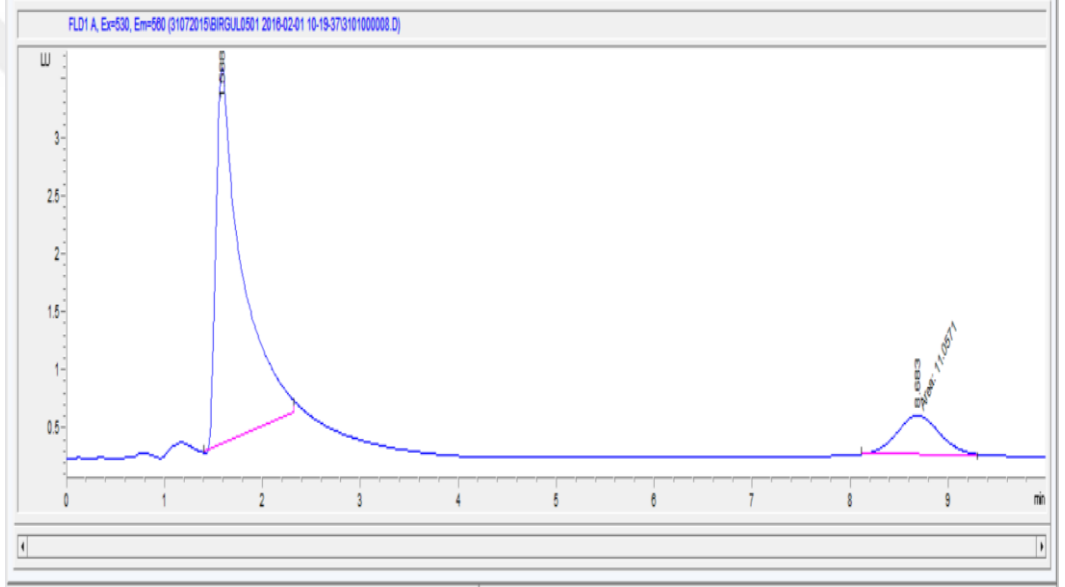
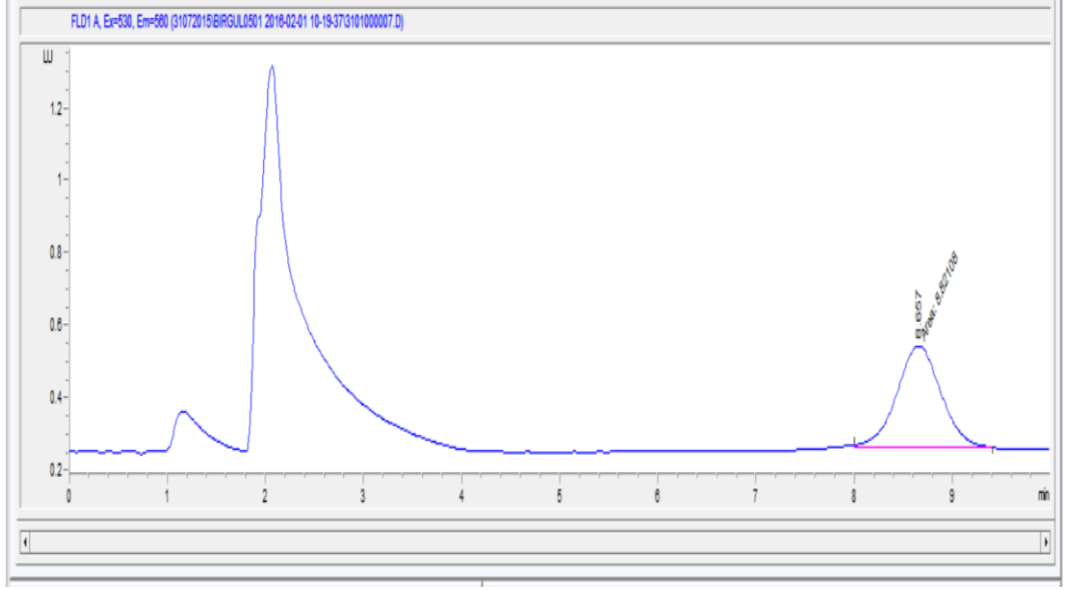
Plazma MDA tekrarlanabilirlik çalışmalarının HPLC sonuçları Şekil 3.4. - 3.13.'te verilmiş ve bu sonuçlara ait ortalama, standart sapma ve değişim katsayıları (Coefficient of Variation, CV) Çizelge 3.5.'te verilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışması için 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.312 ve 0.156 μ M konsantrasyonlardaki standartlar gün içerisinde ard arda 3 kez okutulmuştur. Numunelerin 2SD aralığındaki dağılımları ise Şekil 3.14.'te verilmiştir.



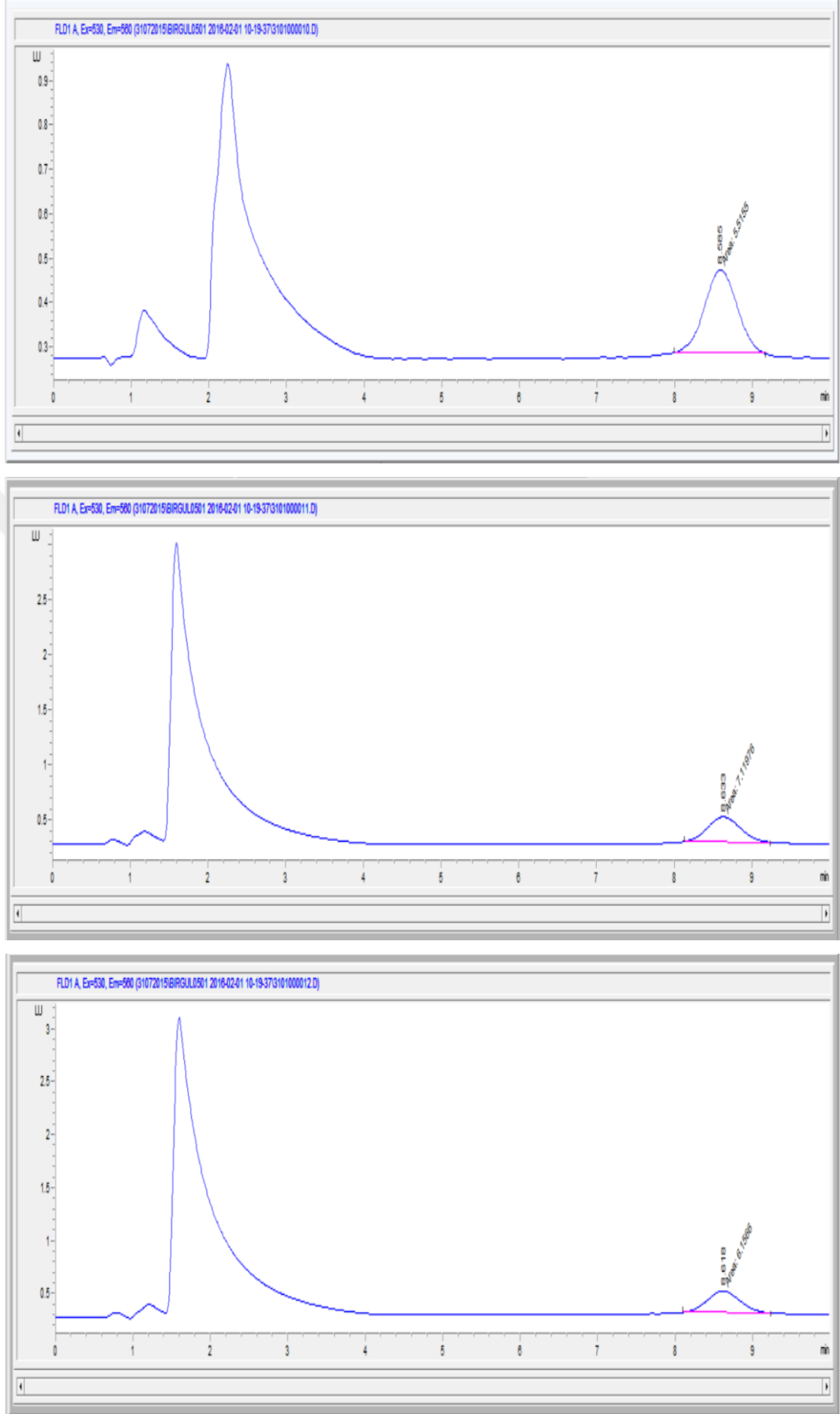
Şekil 3.4. 20 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



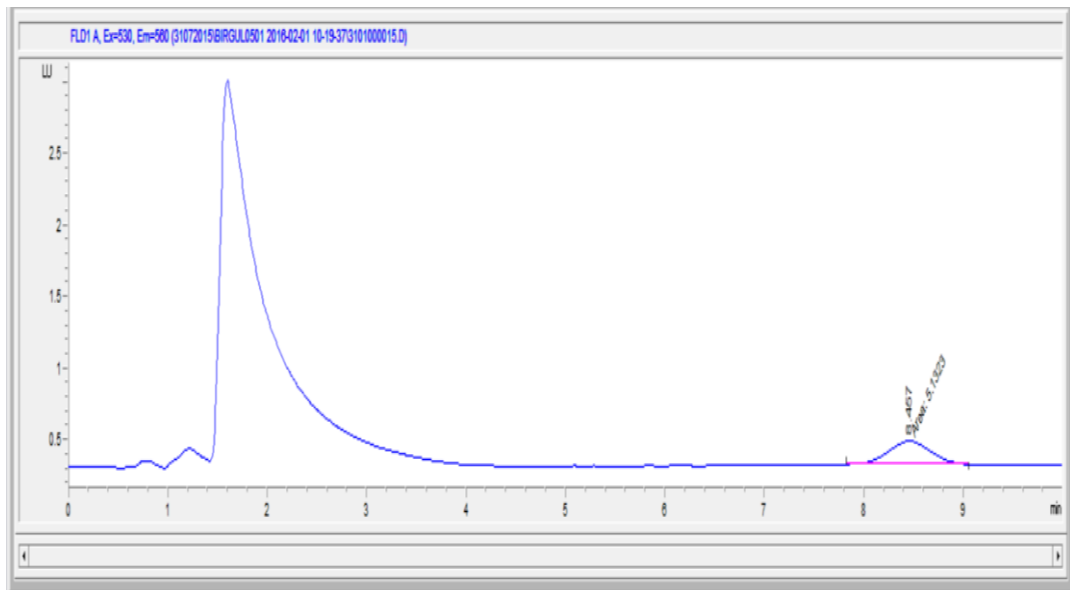
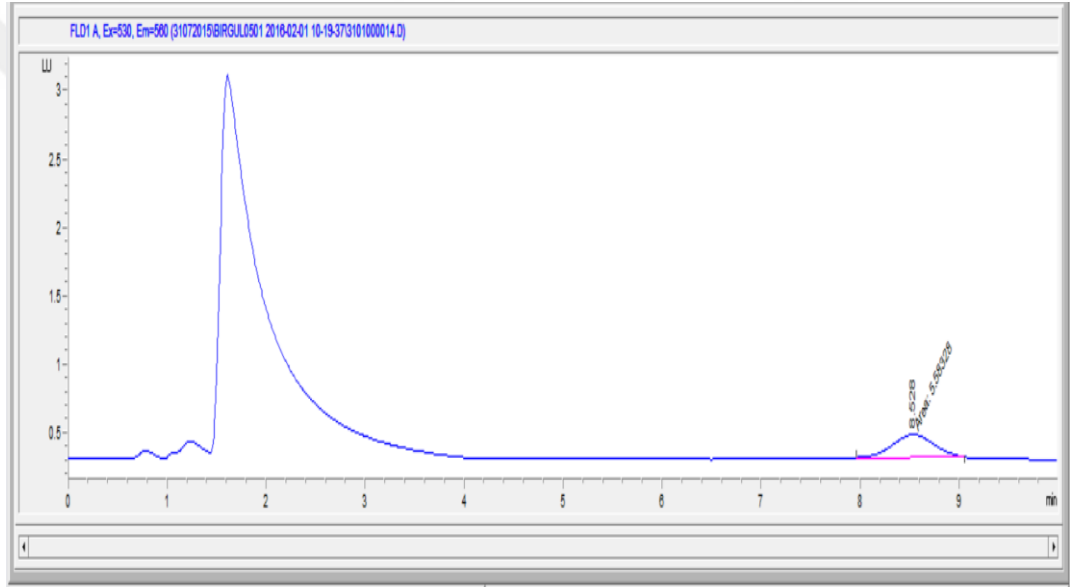
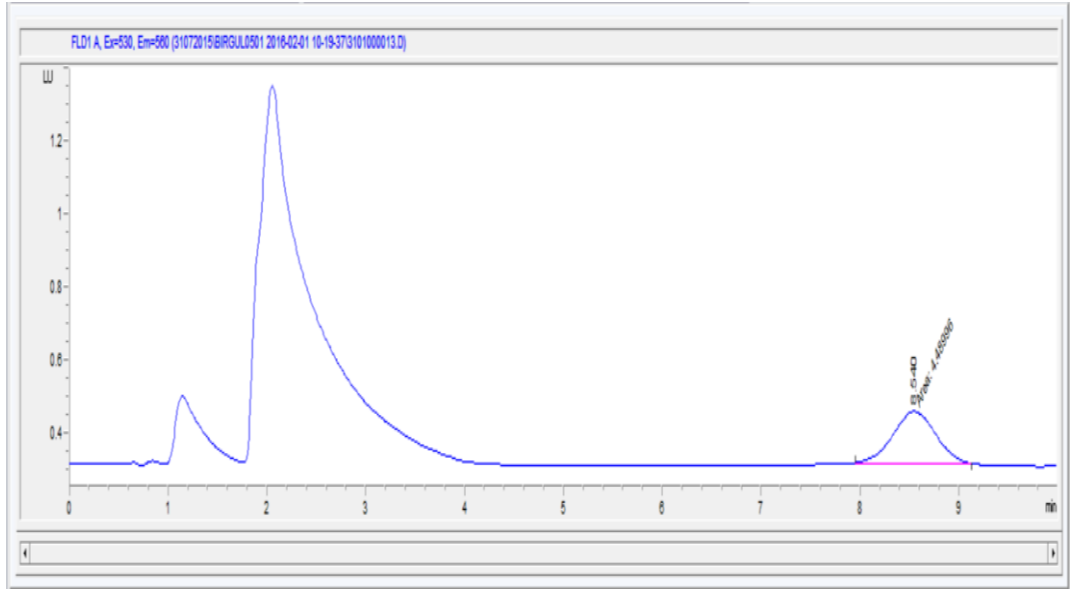
Şekil 3.5. 10 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



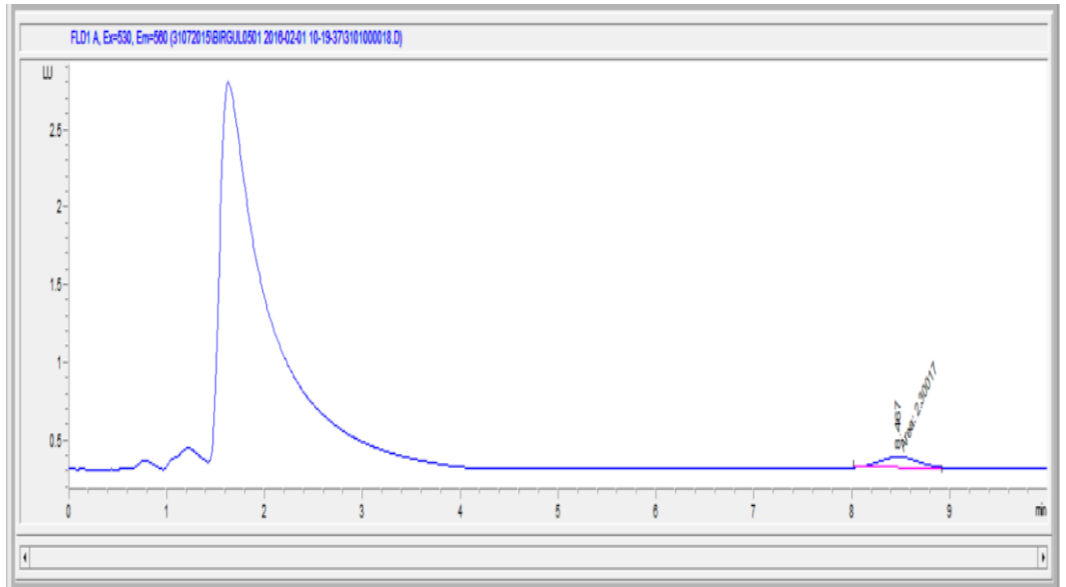
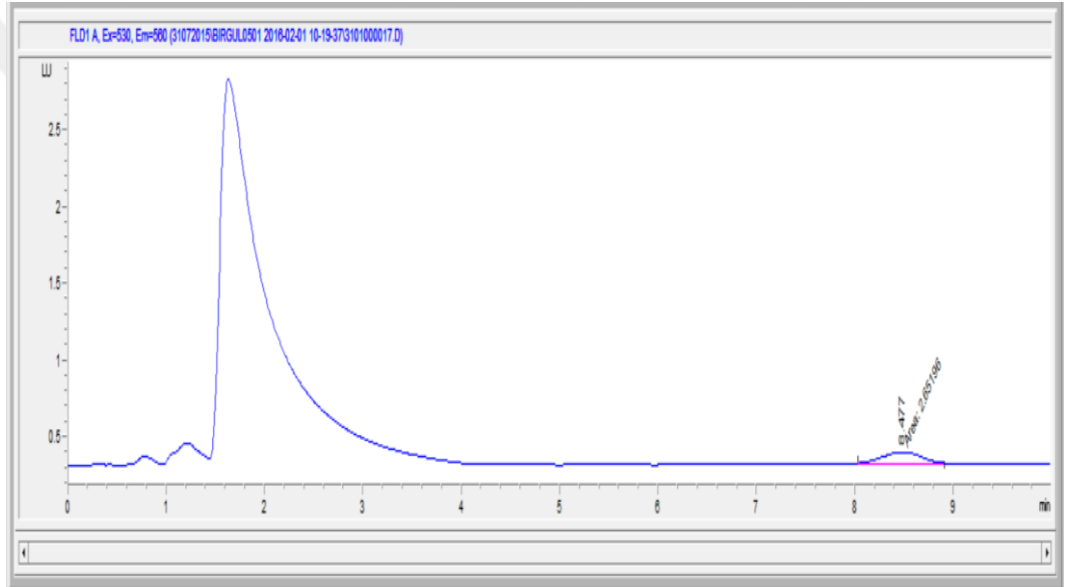
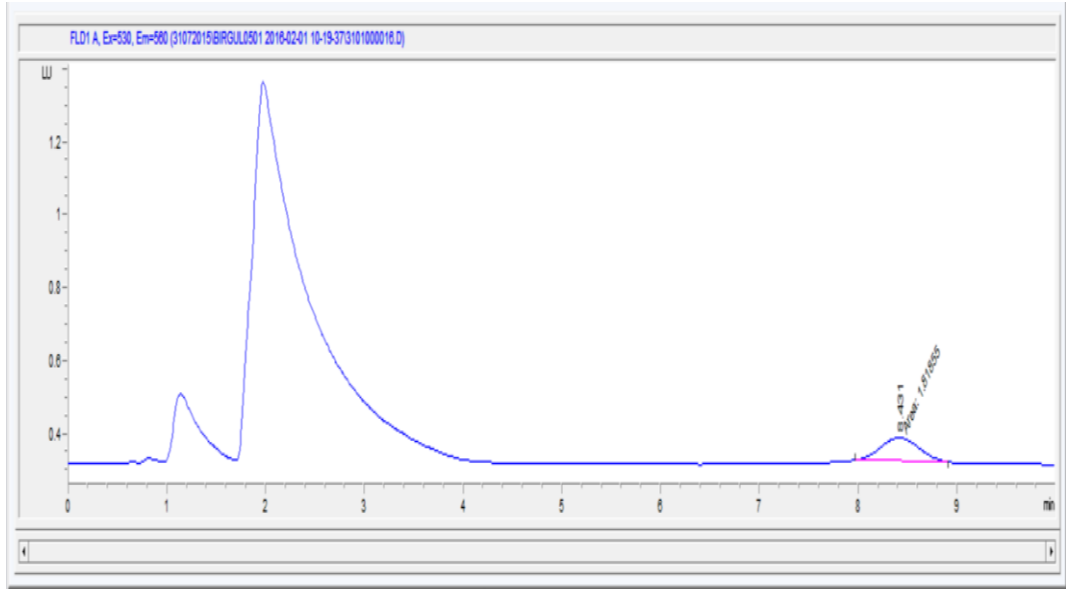
Şekil 3.6. 5 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



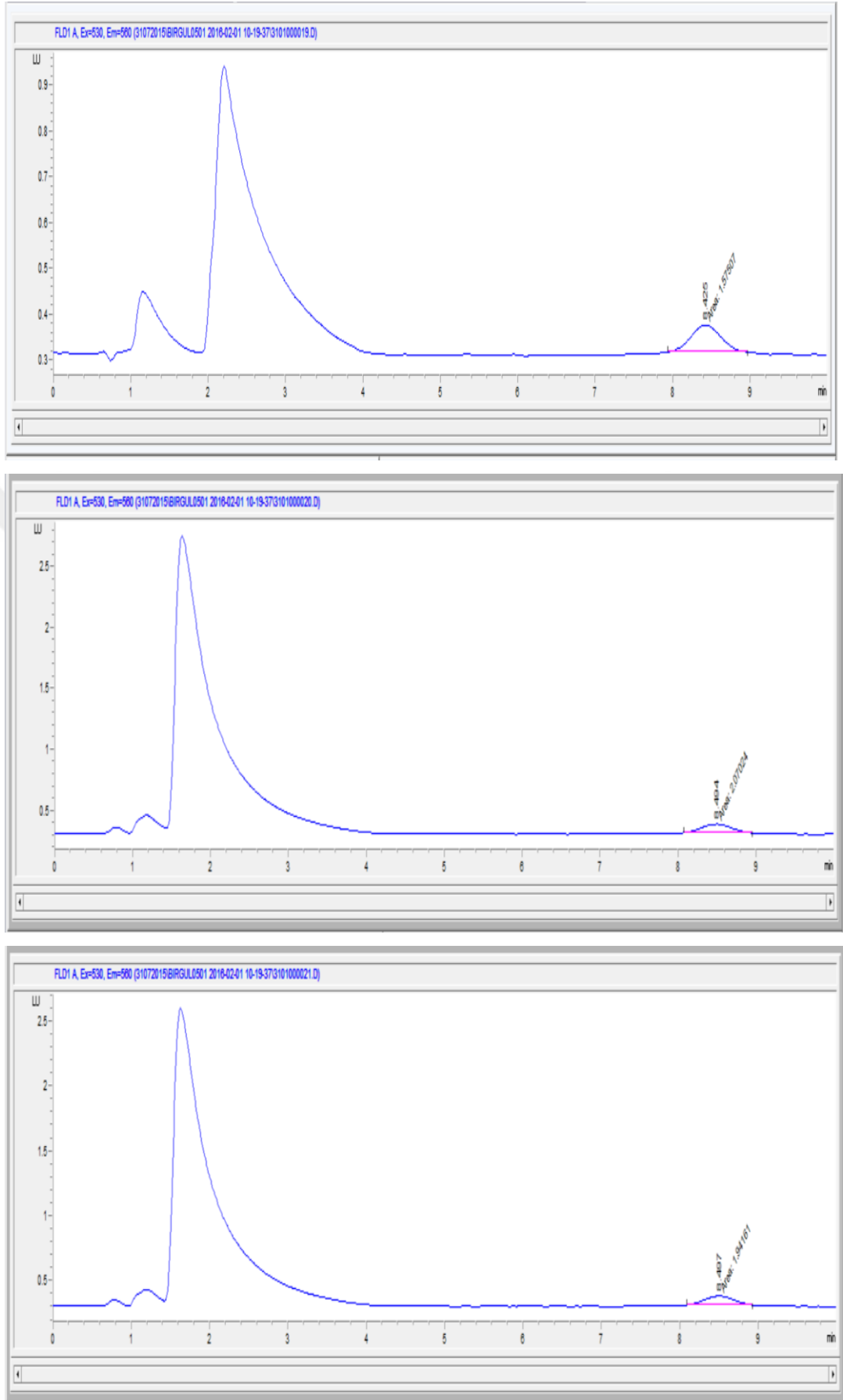
Şekil 3.7. 2,5 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



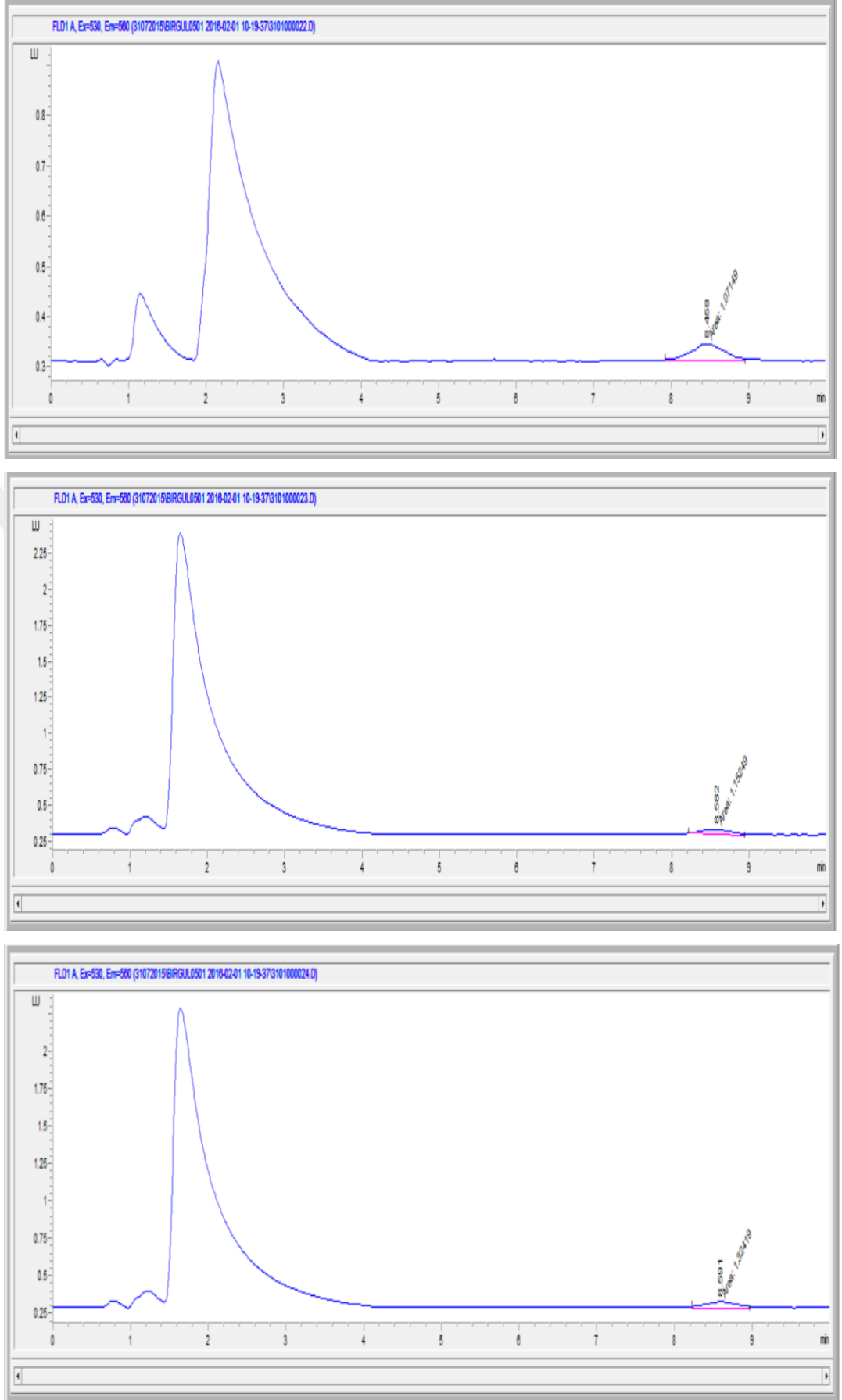
Şekil 3.8. 1,25 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



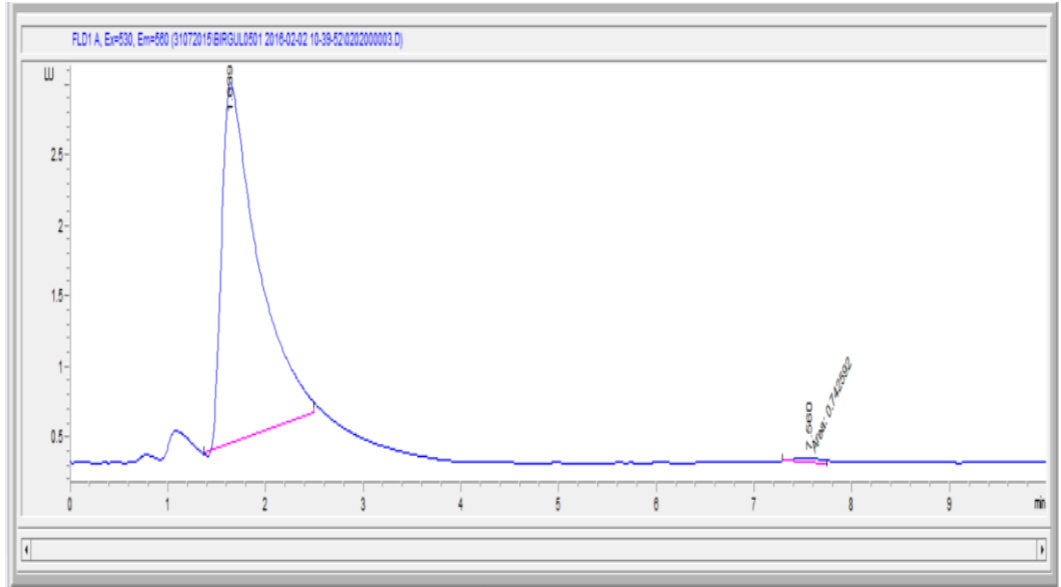
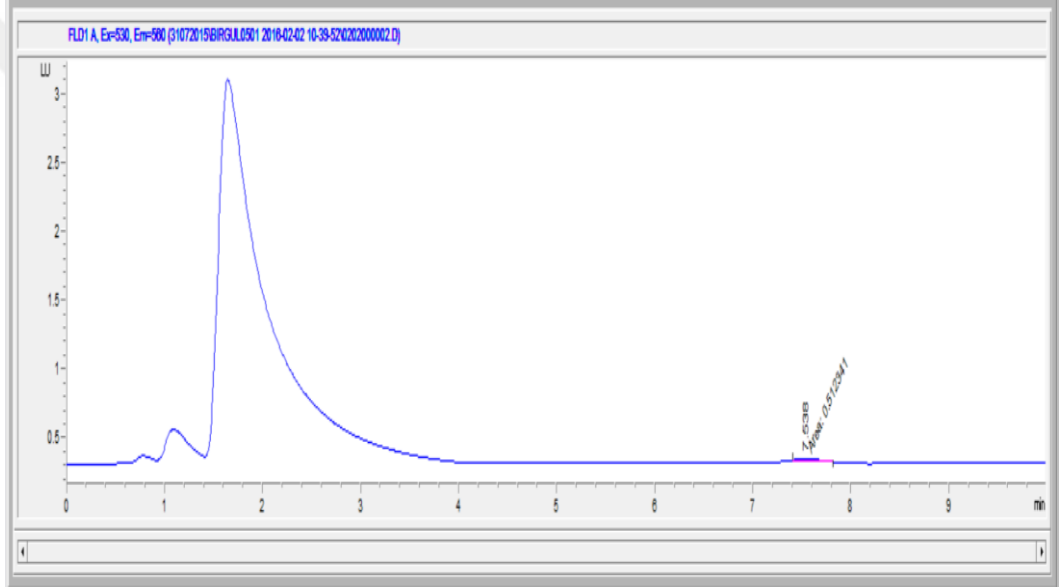
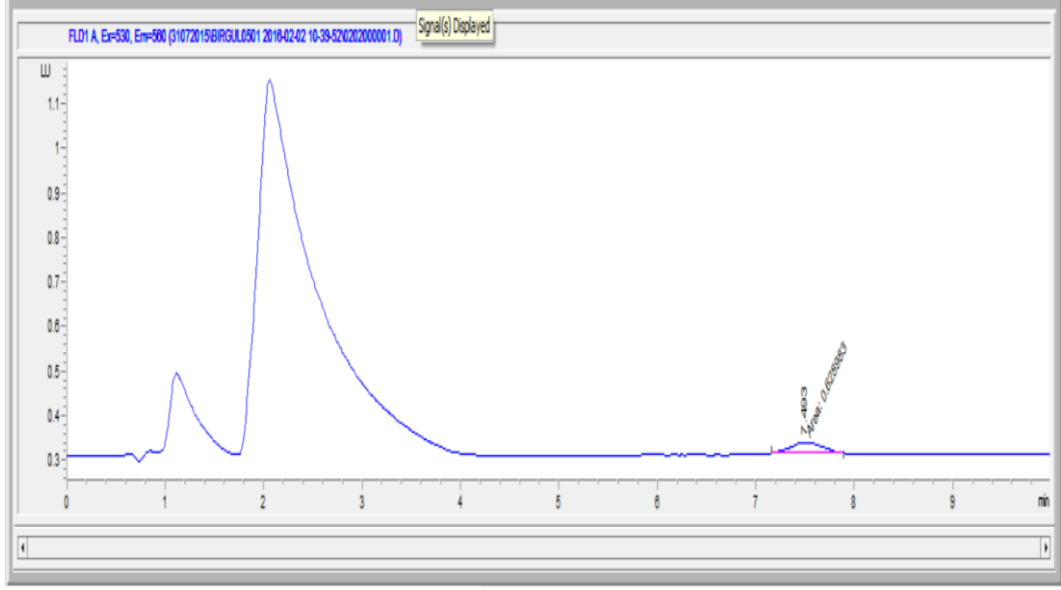
Şekil 3.9. 0,625 μ M MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



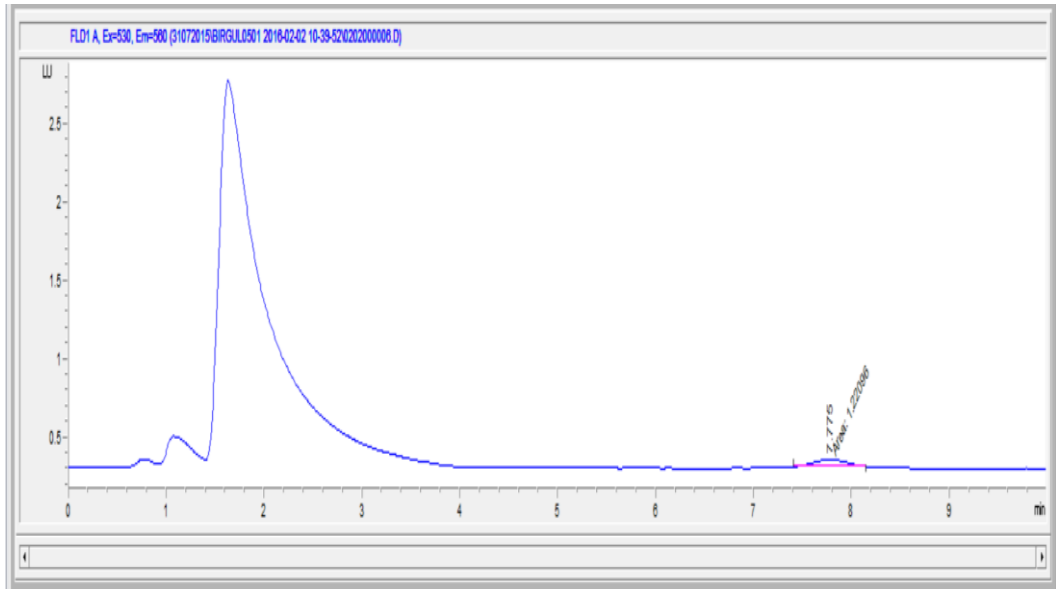
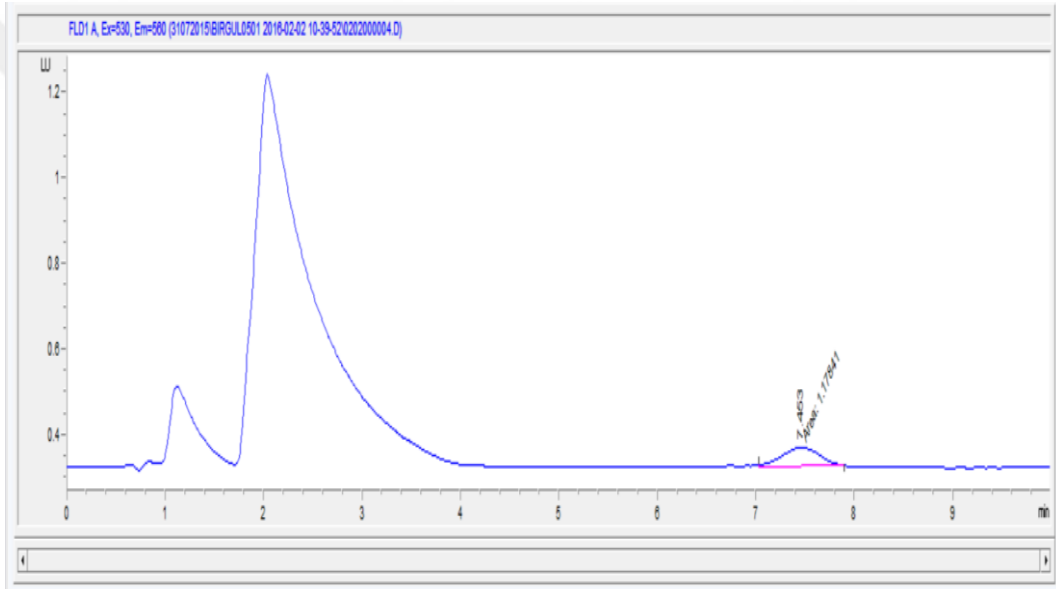
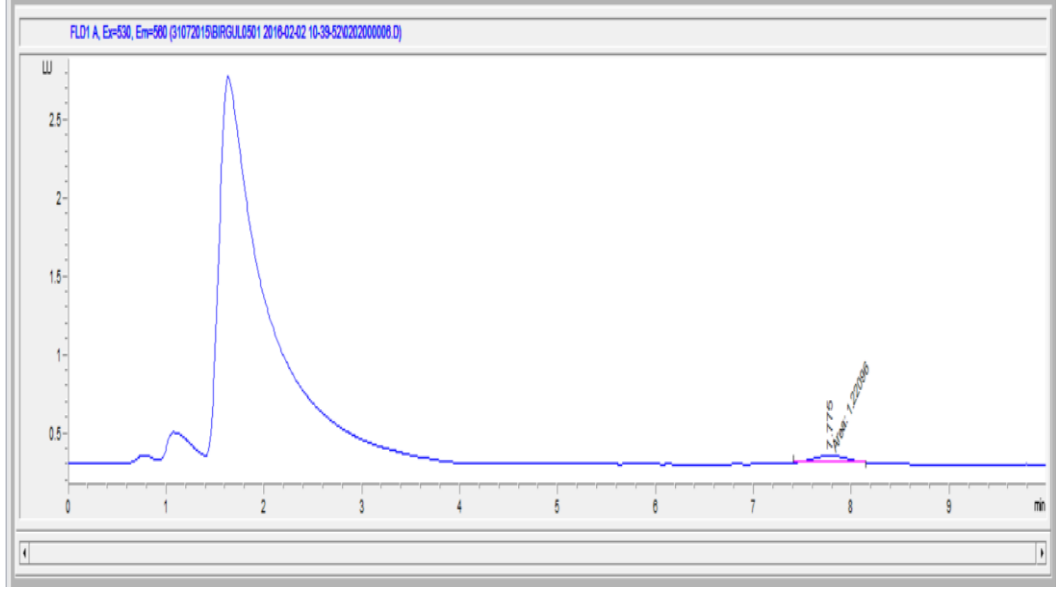
Şekil 3.10. 0,312 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



Şekil 3.11. 0,156 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



Şekil 3.12. 0,078 µM MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları



Şekil 3.13. 0,039 μ M MDA standardına ait üç ölçümün tekrarlanabilirlik kromatogramları

Çizelge 3.5. HPLC yöntemiyle plazma MDA tekrarlanabilirlik çalışmalarına ait ortalama, standart sapma, CV ve 2SD Aralığı

<u>MDA μM</u>	<u>Ortalama</u>	<u>Standart Sapma</u>	<u>Varyasyon Katsayısı (CV)</u>	<u>2 SD Aralığı</u>
20	20,56	0,90	%4,41	18,75-22,38
10	9,96	1,72	%17,20	6,52-13,39
5	5,16	0,75	%14,44	3,67-6,65
2,5	3,19	0,47	%14,70	2,25-4,13
1,25	2,49	0,32	%12,94	1,85-3,13
0,625	0,85	0,26	%30,97	0,32-1,38
0,312	0,62	0,15	%23,83	0,32-0,91
0,156	0,23	0,059	%25,69	0,11-0,35

MDA için ortalama değerimizin % 25'ini izin verilebilir hata kabul edersek;

20 μ M'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $20 \times 0,25 = 5 \mu$ M'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $5 \div 4 = 1,25$ 'dir. $0,907 < 1,25$ olduğu için 20 μ M MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

10 μ M'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $10 \times 0,25 = 2,5 \mu$ M'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $2,5 \div 4 = 0,625$ 'dir. $1,717 > 0,625$ olduğu için 10 μ M MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

5 μ M'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $5 \times 0,25 = 1,25 \mu$ M'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $1,25 \div 4 = 0,3125$ 'dir. $0,745 > 0,3125$

olduğu için 5 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

2,5 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $2,5 \times 0,25 = 0,625$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $0,625 \div 4 = 0,156$ 'dır. $0,47 > 0,156$ olduğu için 2,5 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

1,25 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $1,25 \times 0,25 = 0,313$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $0,313 \div 4 = 0,078$ 'dir. $0,32 > 0,078$ olduğu için 1,25 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

0,625 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $0,625 \times 0,25 = 0,156$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $0,156 \div 4 = 0,039$ 'dur. $0,26 > 0,156$ olduğu için 0,625 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

0,312 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $0,312 \times 0,25 = 0,078$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $0,078 \div 4 = 0,0195$ 'tir. $0,15 > 0,078$ olduğu için 0,312 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

0,156 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $0,156 \times 0,25 = 0,039$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dir. $0,039 \div 4 = 0,00975$ 'tir. $0,059 > 0,00975$ olduğu için 0,312 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeyde değildir.

3.2.5. Geri elde çalışması

Geri elde çalışmasında MDA için 20, ve 10,0 µM'lık standartlar kullanılmıştır. Standartlar 20 µM'dan başlanarak 0.039 µM'a kadar seri dilüsyonla elde edilmiş ve kalibrasyon grafiği bu 10 noktaya göre çizilmiştir. Geri kazanım çalışması için;

1. Tüpe plazma havuzundan 1000,0 µL alınmıştır.

2. Tüpe 20,0 μM 'lık standarttan 250,0 μL alınıp, 750,0 μL plazma havuzundan eklenmiştir.
3. Tüpe 20,0 μM 'lık standarttan 200,0 μL alınıp, 800,0 μL plazma havuzundan eklenmiştir.
4. Tüpe 10,0 μM 'lık standarttan 125,0 μL alınıp, 875,0 μL plazma havuzundan eklenmiştir.
5. Tüpe 5,0 μM 'lık standarttan 125,0 μL alınıp, 875,0 μL plazma havuzundan eklenmiştir.

Numune hazırlığı ve diğer ön işlemler tamamlanarak örnekler cihaza verilmiş ve eklenen standartlara göre %R değerleri hesaplanmış ve ilgili veriler Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. MDA için geri elde verileri

	<u>Ölçülen Değer</u> (μM)	<u>Eklenen</u> <u>Konsantrasyon</u> (μM)	<u>Geri Elde</u> <u>Değeri</u> (μM)	<u>%</u> <u>Recovery</u>
Plazma	0,29	---	---	---
Plazma Havuzu + 20 μM 'lık MDA	5,37	5,0	5,08	101,5
Plazma Havuzu + 20 μM 'lık MDA	4,05	4,0	3,76	94,0
Plazma Havuzu + 10 μM 'lık MDA	1,47	1,25	1,18	94,56
Plazma Havuzu + 5 μM 'lık MDA	0,91	0,625	0,62	99,84

3.3. Biyosensör Çalışmalarına Ait Bulgular

Biyosensör tasarımına ait çalışmalar kendi içerisinde 3 temel bölümden oluşmaktadır. Birinci bölüm elektrot yüzeylerinin çeşitli nanopartiküllerle modifikasyonuna, ikinci bölüm modifiye elektrot yüzeylerinin karakterize edilmesine ve yalın yüzeye ait sonuçlarla karşılaştırılmasına, üçüncü bölüm; modifiye elektrot yüzeylerine ait elektrokimyasal olarak MDA tayinine dair çalışmaları içermektedir. Bu çalışmada karbon oksidasyonunun yavaş kinetiğinden dolayı özellikle pozitif yönde geniş bir potansiyel aralığında kullanılabilen karbon elektrotlar tercih edilmiştir. Katı yüzeylerde filmlerin oluşturulması sonucu kısıtlı elektrot yüzeylerinin çeşitliliğinin artırılabilirdiği ve bu şekilde modifiye yüzeylerin moleküler elektronikten analitik uygulamalara kadar kullanımının mümkün olduğu bilindiğinden çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılmasına olanak sağlayabilmek amacıyla MWCNT, GR ve $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ile GC elektrot yüzeyleri modifiye edilmiştir. Son yıllarda küçük boyutları (1–100 nm) ve buna bağlı olarak yüzey/hacim oranının büyük olması, hedef molekülleri bağlama özelliklerinin farklı olması, kuvvetli iletkenlikleri ve yapısal sağlamlılıkları gibi avantajlarından dolayı nanomateryaller biyosensör uygulamalarında ilgi çekici yapılar olduğundan elektrot yüzeylerinin hazırlanmasında bu materyaller tercih edilmiştir (Nikalje 2015, Săndulescu ve ark 2015, Tilmaciu ve Morris 2015, Shivaramakrishnan ve ark 2017). Modifiye edilen GC elektrot yüzeyleri 100 mM TBATFB içeren CH_3CN çözeltisindeki 1,0 mM ferrosen ve pH'ı 2,0 olan BR tampon çözeltisindeki 1,0 mM potasyum ferrisiyanür redoks proplar varlığında dönüşümlü voltametri tekniği ile ve 100 mM KCl çözeltisindeki 1,0 mM potasyum ferri/ferrosiyanür redoks çifti varlığında elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elektrokimyasal karakterizasyon tekniklerine ek olarak hazırlanan elektrot yüzeyleri; yüzey temas açışı ölçümü (contact angle), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak karakterize edilmiştir. Farklı karakterizasyon teknikleri kullanılarak elde edilen veriler yalın GC elektrot yüzeyine ait verilerle karşılaştırılmıştır.

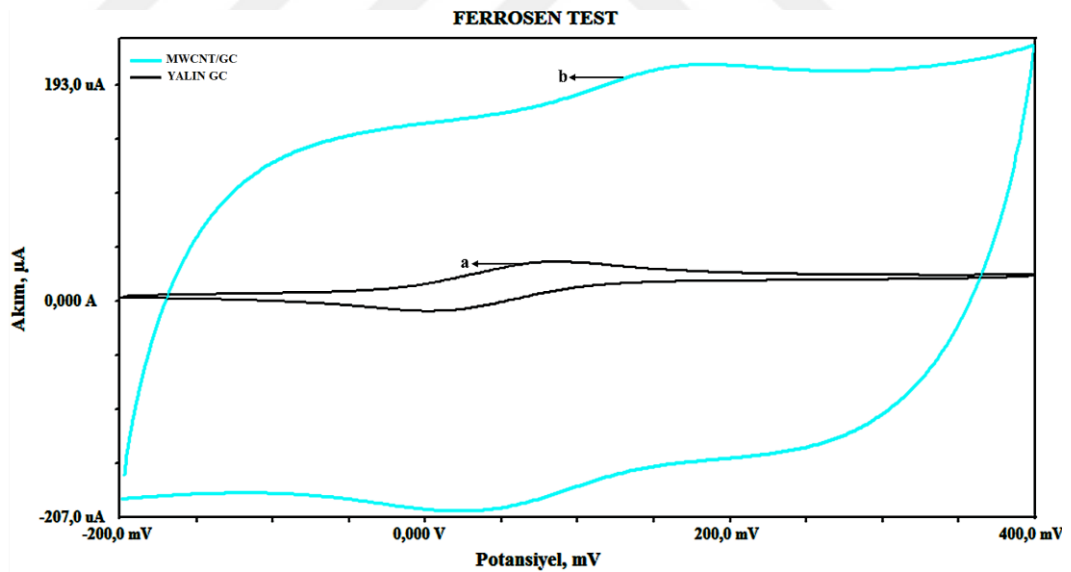
Yüzeyler MDA tayininde kullanılmıştır. Her basamakta elde edilen sonuçlar değerlendirmeleriyle birlikte Bölüm 3.3.1’de verilmiştir.

3.3.1. Elektrot Yüzeylerinin Karakterizasyonu

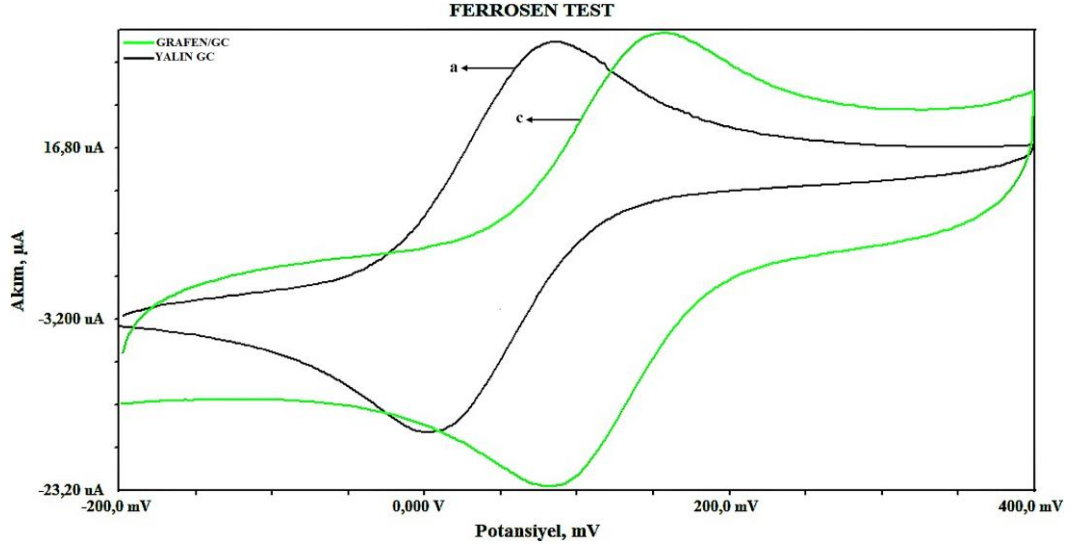
Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinin karakterizasyonu dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi, atomik kuvvet mikroskopisi ve yüzey temas açısı ölçüm teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

➤ Elektrot Yüzeylerinin Dönüşümlü Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Karakterizasyonu

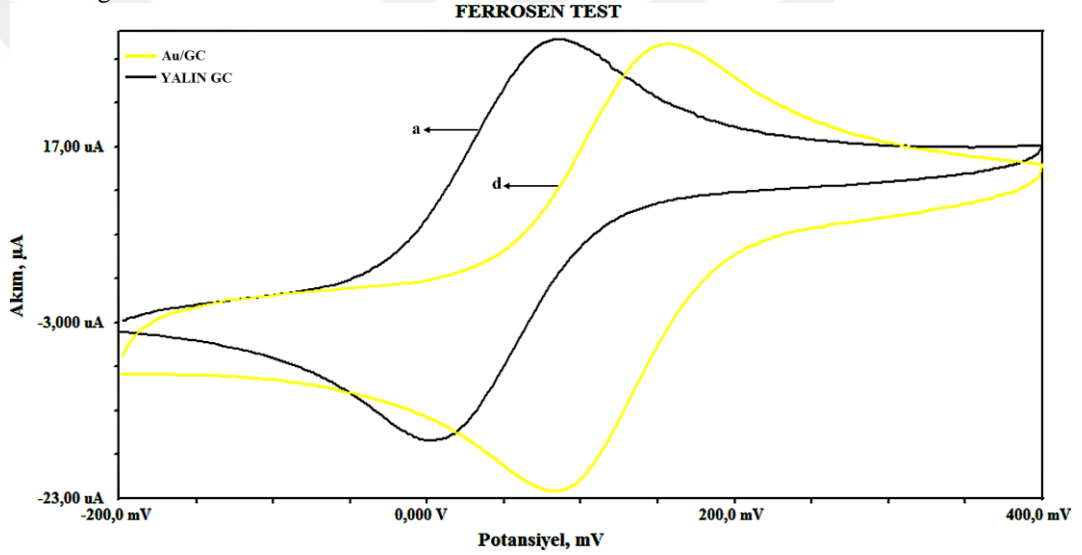
Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrotlarında ferrosen ve potasyum ferrisiyanür redoks problemlerinde dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiş ve yalın ve modifiye elektrotlara ait verilerin karşılaştırılması şeklinde Şekil 3.14.-3.23.’te verilmiştir



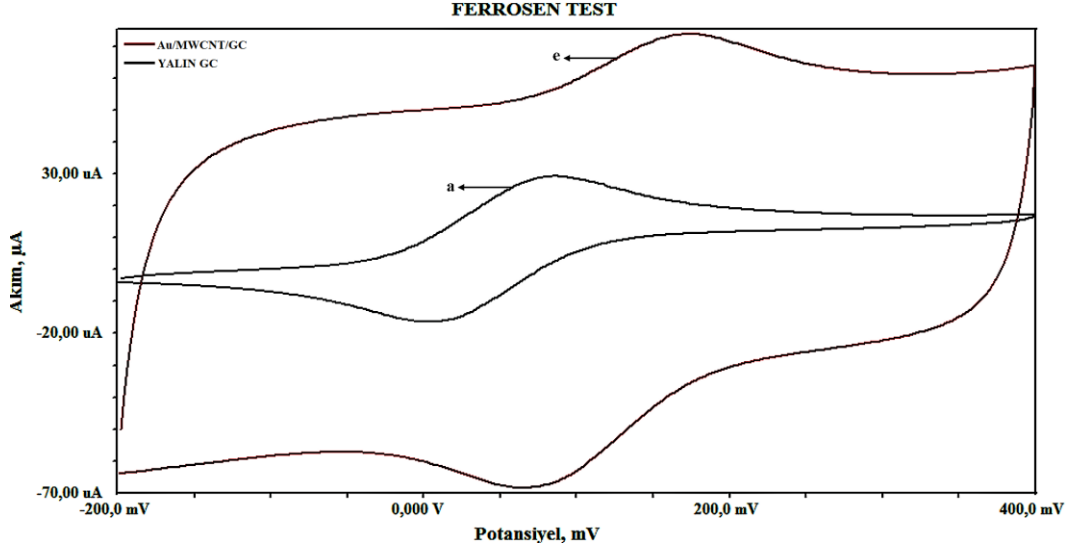
Şekil 3.14. (a) Yalın GC ve (b) MWCNT/GC elektrotta 100 mM TBATFB içeren CH₃CN ortamındaki ferrosen redoks problemlerine ait Ag/Ag⁺ referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



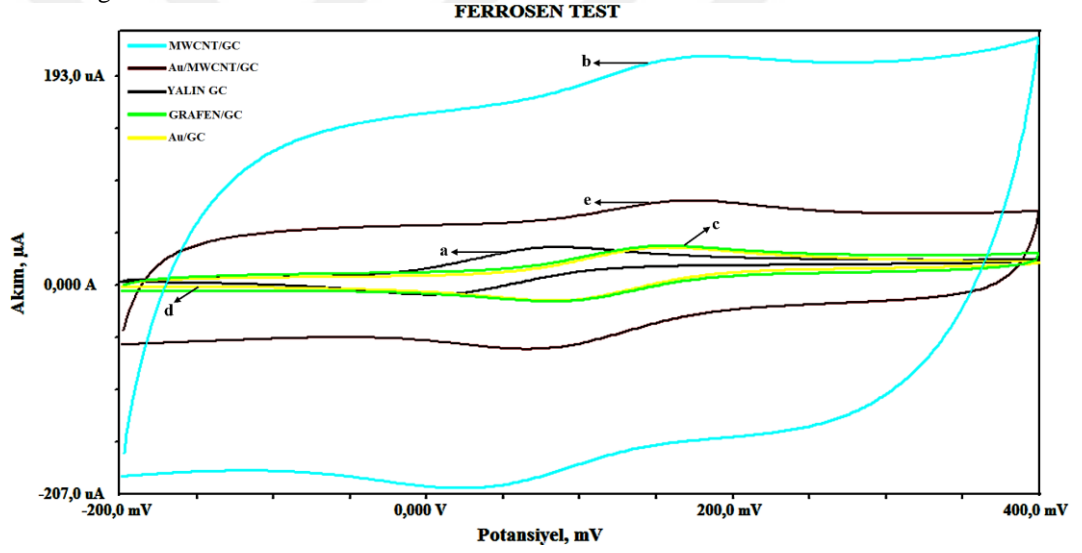
Şekil 3.15. (a) Yalın GC ve (c) GR/GC elektrotta 100 mM TBATFB içeren CH_3CN ortamındaki ferrosen redoks probuna ait Ag/Ag^+ referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



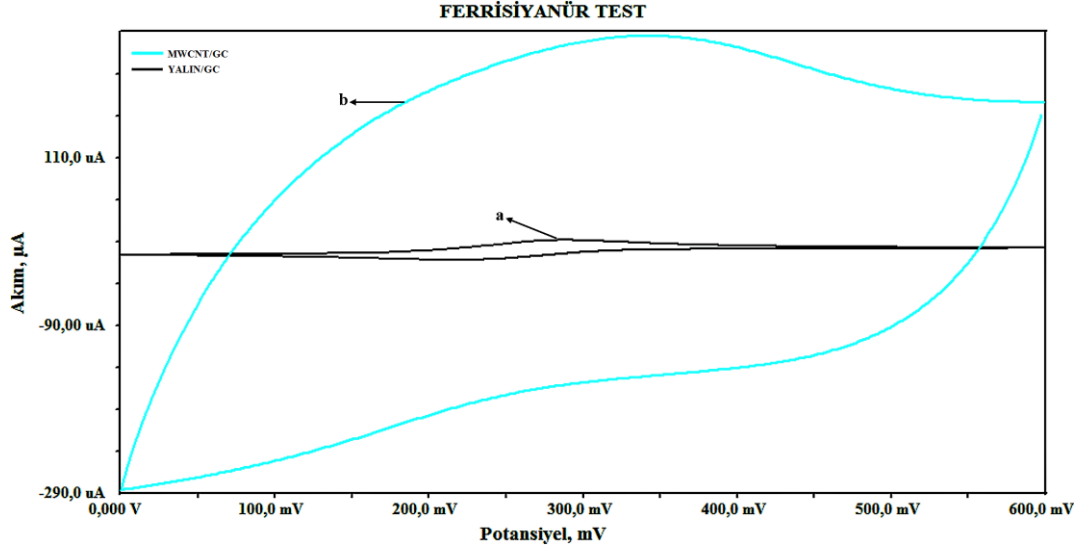
Şekil 3.16. (a) Yalın GC ve (d) Au/GC elektrotta 100 mM TBATFB içeren CH_3CN ortamındaki ferrosen redoks probuna ait Ag/Ag^+ referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



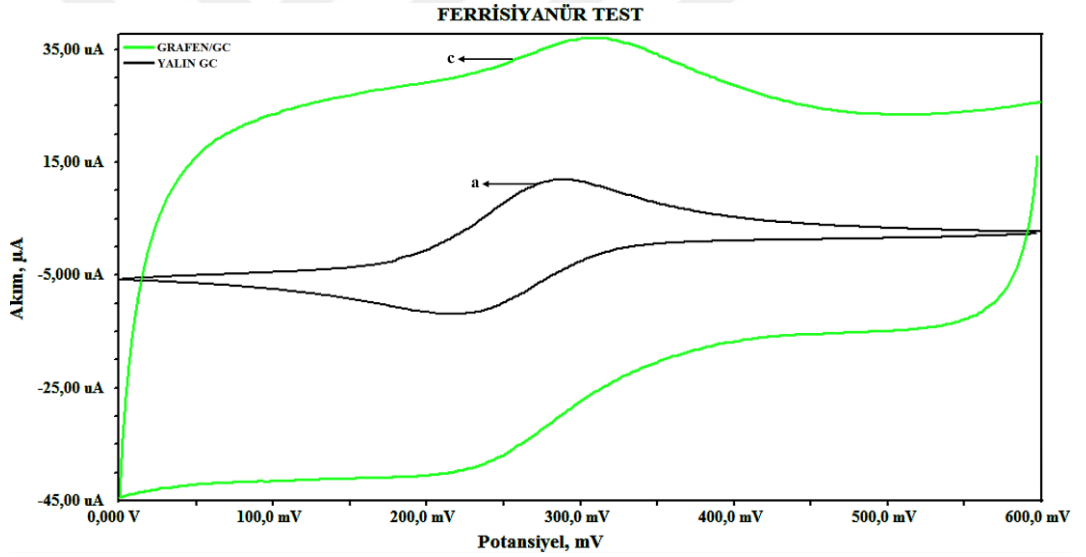
Şekil 3.17. (a) Yalın GC ve (e) Au/MWCNT/GC elektrotta 100 mM TBATFB içeren CH_3CN ortamındaki ferrosen redoks probuna ait Ag/Ag^+ referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



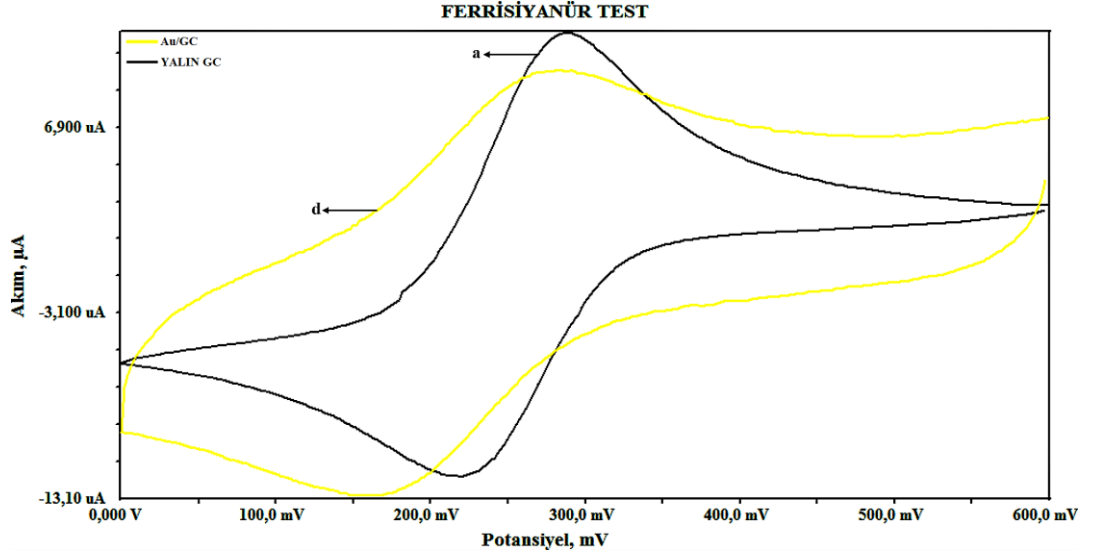
Şekil 3.18. (a) Yalın GC, (b) MWCNT/GC, (c) GR/GC, (d) Au/GC ve (e) Au/MWCNT/GC elektrotta 100 mM TBATFB içeren CH_3CN ortamındaki ferrosen redoks probuna ait Ag/Ag^+ referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



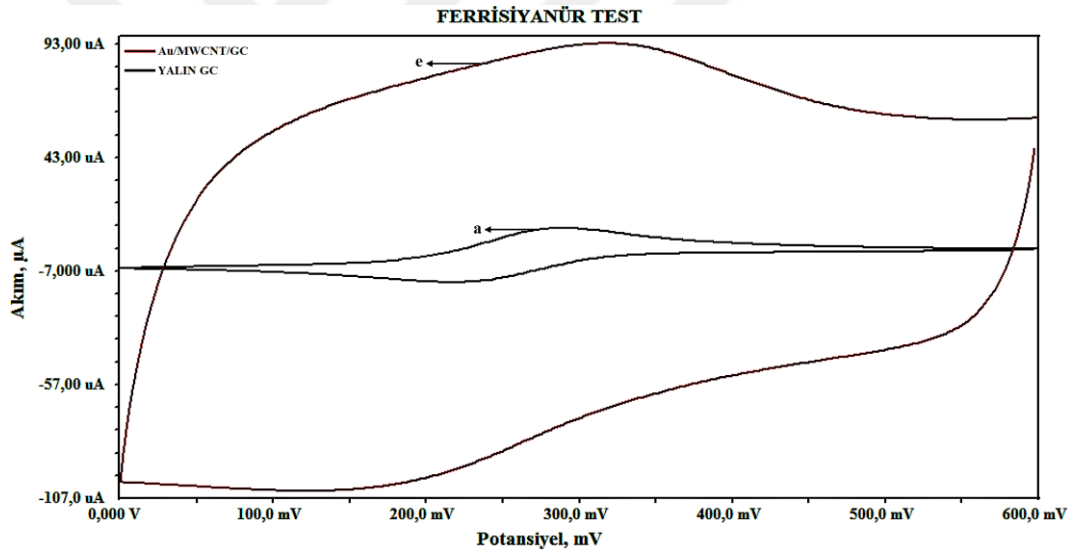
Şekil 3.19. (a) Yalın GC ve (b) MWCNT/GC elektrotta pH'ı 2,0 olan BR ortamındaki potasyum ferrisiyanür redoks probuna ait Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



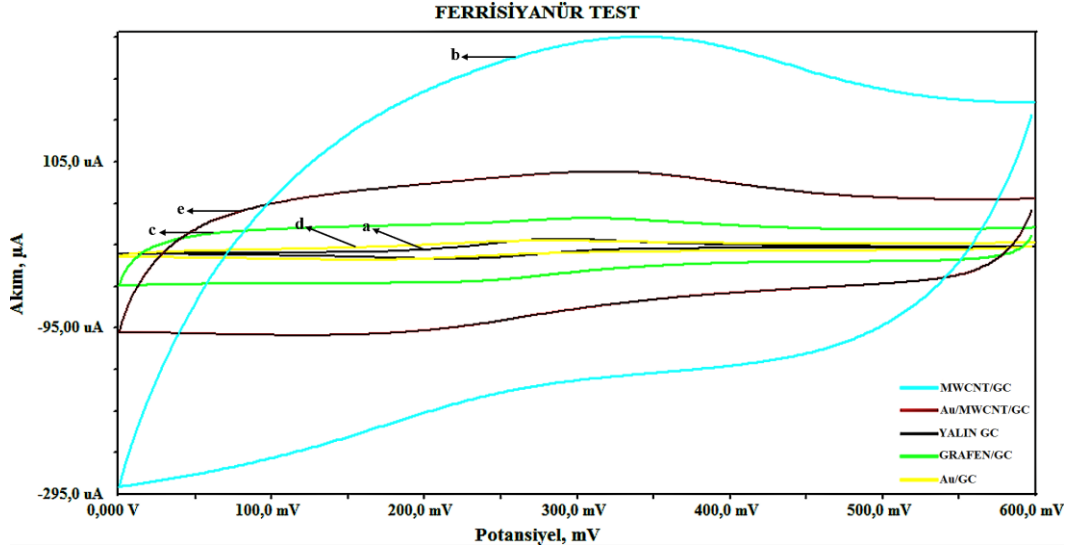
Şekil 3.20. (a) Yalın GC ve (b) GR/GC elektrotta pH'ı 2,0 olan BR ortamındaki potasyum ferrisiyanür redoks probuna ait Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



Şekil 3.21. (a) Yalın GC ve (c) Au/GC elektrotta pH'ı 2,0 olan BR ortamındaki potasyum ferrisiyanür redoks probuna ait Ag/AgCl/KCl_{doğ} referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



Şekil 3.22. (a) Yalın GC ve (e) Au/MWCNT/GC elektrotta pH'ı 2,0 olan BR ortamındaki potasyum ferrisiyanür redoks probuna ait Ag/AgCl/KCl_{doğ} referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar



Şekil 3.23. (a) Yalın GC, (b) MWCNT/GC, (c) GR/GC (d) Au/GC ve (e) Au/MWCNT/GC elektrotta pH'ı 2,0 olan BR ortamındaki potasyum ferrisiyanür redoks probuna ait Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı kaydedilen voltamogramlar

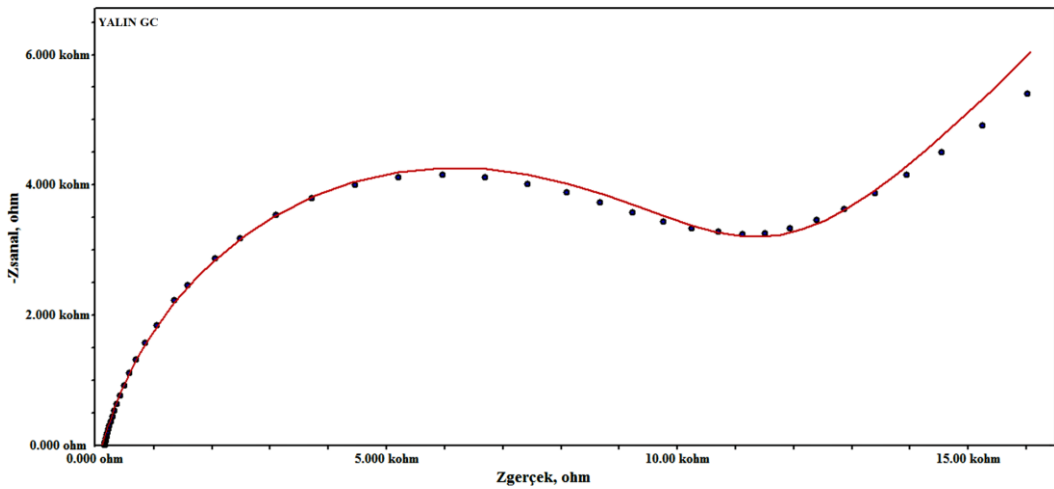
Şekil 3.14.-3.23.'te verilen voltamogramlar incelendiğinde ferrosen ve potasyum ferrisiyanür redoks problemlerine ait indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları için; yalın GC elektrot yüzeyinin elektron transferine modifiye yüzeylere göre daha az izin verdiği ve modifiye yüzeylerin elektron transferini katalizlediği görülmektedir. MWCNT yüzey iletkenliğine hem indirgeme hem de yükseltgenme yönünde katalizleyici etkiye bulunurken, grafen ve altın yüzeylerin indirgeme yönünde elektron transferini katalizlediği yükseltgenme yönünde neredeyse hiç etkisinin olmadığı, Au/MWCNT/GC elektrodun ise elektron transferini Au/GC elektrodun göre daha fazla katalizlediği görülmüştür. Bu durum MWCNT'ün çok iyi elektrokatalitik özellik göstermesinden kaynaklanmaktadır (Konuk ve Oktay 2007, Sahoo ve ark 2010).

Tüm redoks prob testlerine ait voltamogramlar incelendiğinde modifikasyonlar sonucunda karbon yüzeyde bir filmin oluşması ile yalın GC elektrot yüzeyinden farklı yüzeyler elde edildiği düşünülmüştür.

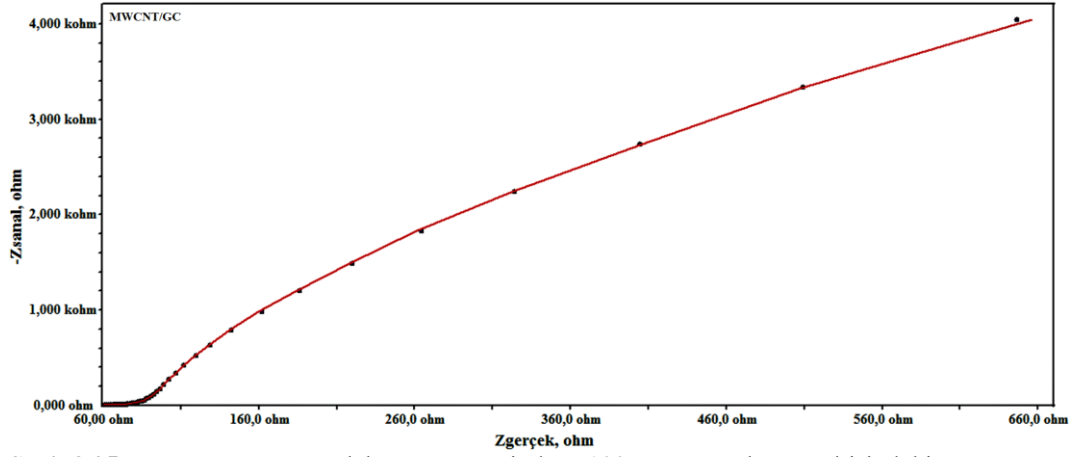
➤ Elektrot Yüzeylerinin Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Tekniği ile Karakterizasyonu

Optimum şartlarda MWCNT, GR, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ maddeleriyle modifiye edilen GC elektrot yüzeyleri 75000-0,05 Hz frekans aralığında, potasyum ferri/ferrosiyaniür çözeltisinde $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{doy}}$ referans elektroduna karşı elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile karakterize edilmiş ve elde edilen sonuçlar simüle edilerek Şekil 3.24.-3.28.'da verilmiştir. Modifiye yüzeylerden elde edilen sonuçlar ile yalın GC elektrot yüzeyinin karakterizasyon sonuçları karşılaştırılmış ve ilgili Nyquist eğrileri Şekil 3.29.'da verilmiştir.

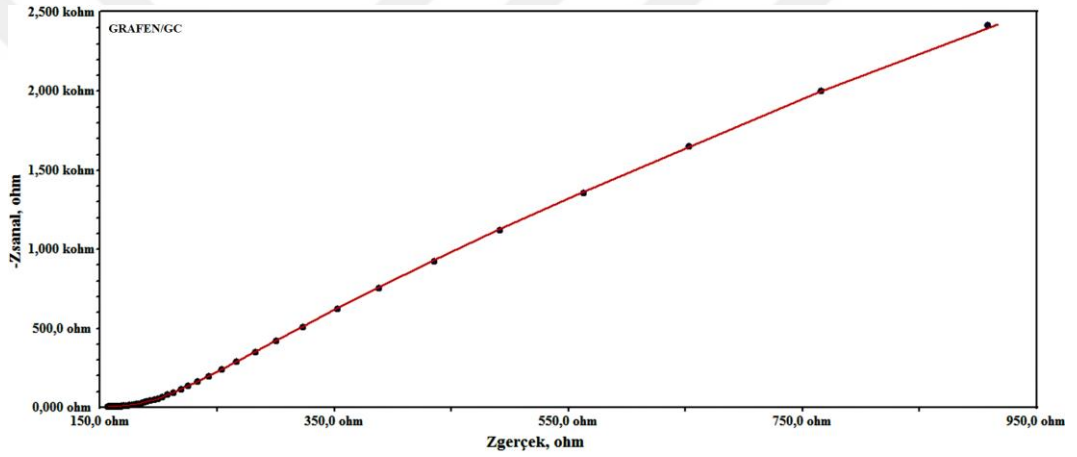
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde yalın GC elektrot yüzeyi potasyum ferri/ferrosiyaniür redoks çiftinin elektron transferine karşı bir direnç gösterirken MWCNT, GR, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ maddeleriyle ile modifiye edilen GC elektrot yüzeylerinin elektron transferini katalizlediği tespit edilmiştir. Benzer durum Şekil 3.14. ve 3.23.'te verilen ferrosen ve potasyum ferrisiyaniür redoks problemlerine ait voltamogramlarda da gözlemlenmiştir. Dolayısıyla dönüşümlü voltametri tekniği ile yapılan ölçümlerle elde edilen sonuçların elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniğiyle alınan ölçüm sonuçlarıyla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde; GC elektrot yüzeyinde modifikasyon sonrası bir filmin oluştuğu belirlenmiştir.



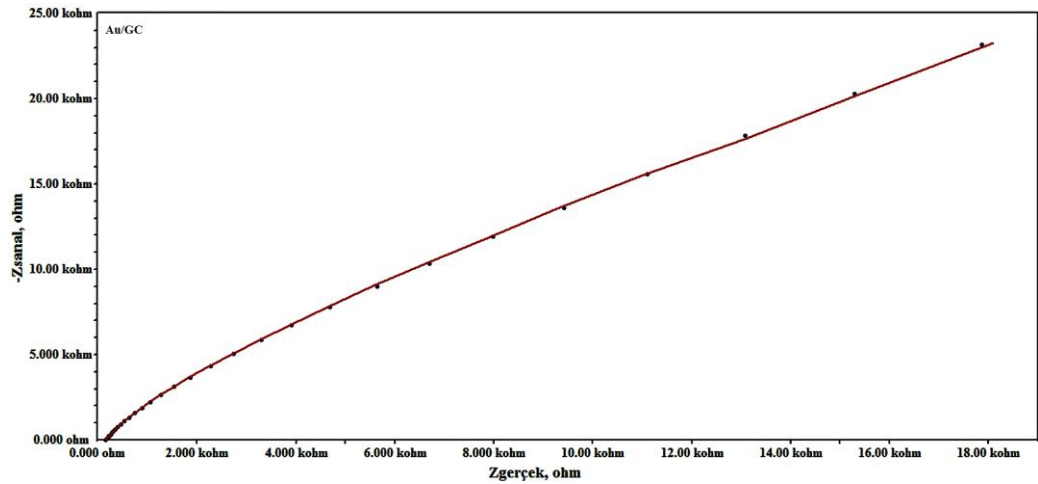
Şekil 3.24. Yalın GC elektrot yüzeyinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferri/ferrosiyaniür redoks çiftinin $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{doy}}$ referans elektroduna karşı Nyquist eğrisinin simülasyonu



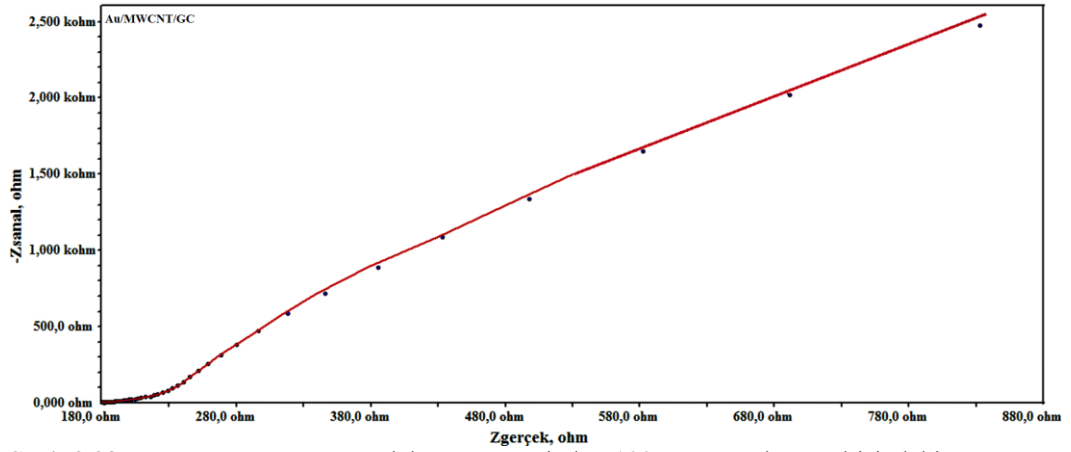
Şekil 3.25. MWCNT/GC elektrot yüzeyinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferri/ferrosiyandır redoks çiftinin Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrisinin simülasyonu



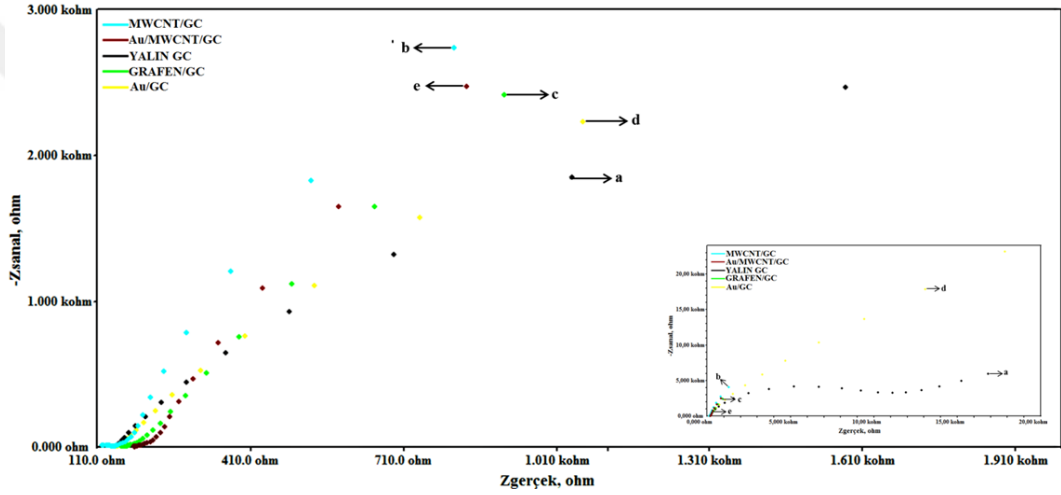
Şekil 3.26. GR/GC elektrot yüzeyinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferri/ferrosiyandır redoks çiftinin Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrisinin simülasyonu



Şekil 3.27. Au/GC elektrot yüzeyinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferri/ferrosiyandır redoks çiftinin Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrisinin simülasyonu



Şekil 3.28. Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferri/ferrosiyandır redoks çiftinin Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrisinin simülasyonu



Şekil 3.29. Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/ MWCNT/GC elektrot yüzeylerinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferri/ferrosiyandır redoks çiftinin Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrileri

Şekil 3.24.-3.28.'de verilen Nyquist eğrilerinin simülasyonları sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.7.'de ve her bir yüzeye ait Nyquist eğrileri Şekil 3.29.'da verilmiştir. Şekil 3.29.'da görsel olarak verilen Nyquist eğrileri üzerinde yapılan yorumlarımız, simülasyon eğrilerinin rakamsal değerlerini kapsayan Çizelge 3.7.'deki verilerin çeşitli eşitliklere uygulanması sonucunda yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyleri arasındaki farklılığın gösterilmesiyle rakamsal bir anlam kazanmıştır.

Çizelge 3.7. Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/ MWCNT/GC elektrot yüzeylerinde 100 mM KCl çözeltisindeki potasyum ferro/ferrisiyanür redoks çiftinin Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektroduna karşı Nyquist eğrilerinin simülasyon değerleri

Simülasyon Verileri	Yalın GC	MWCNT/GC	Grafen/GC	Au/GC	Au/MWCNT/GC
Ru (ohms)	140,4	140,2	170,3	100,0	189,0
Y0 (S*s ^a)	2,862x10 ⁻⁶	370,0x10 ⁻⁶	570,0x10 ⁻⁶	13,58x10 ⁻⁶	600,0x10 ⁻⁶
Alpha (m)	827,3x10 ⁻³	845,0x10 ⁻³	812,8x10 ⁻³	870,7x10 ⁻³	847,3x10 ⁻³
Wd (S*s ^{^(1/2)})	152,2x10 ⁻⁶	500,0x10 ⁻⁶	360,6x10 ⁻⁶	33,44x10 ⁻⁶	200,0x10 ⁻⁶
Rp (ohms)	10,28x10 ³	610x10 ³	1120,0x10 ⁸	600x10 ⁴	500x10 ³

Çizelge 3.7.'de verilen her bir yüzeye ait simülasyon verilerinin R_p değerinin Eşitlik 3.1.'e uygulanması sonucu yüzeylerin yüzde kaplanma oranı MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC için sırasıyla %98,31; %99,99; %98,92; %97,94 olarak hesaplanmıştır.

$$\%Q = \left[1 - \left(\frac{R_p}{R_p'} \right) \right] * 100$$

Eşitlik 3.1.

İlgili eşitlikte R_p ve R_p' sırasıyla yalın ve modifiye GC elektrot yüzeylerine ait direnç değerlerini ve Q ise kaplanmanın yüzde olarak oranını ifade etmektedir.



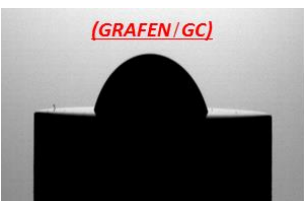
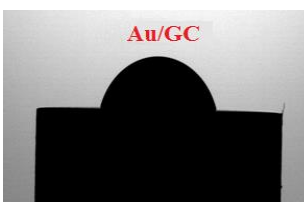

Elektrokimyasal yöntemlerde ölçümlerin doğruluğu ve duyarlılığını negatif yönde etkilediğinden dolayı kapasitif akımın düşük olması istenir. Au/MWCNT/GC ve Au/GC elektrotlara ait dönüşümlü voltamogramlar incelendiğinde; Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyindeki elektriksel iletkenlik yüksek olmasına rağmen Au/GC elektrotla alınan ölçümdeki kapasitif akım değerinin minimuma yakın olması sebebiyle çalışmalarda optimum yüzey olarak Au/GC elektrot tercih edilmiştir.

➤ Elektrot Yüzeylerinin Yüzey Temas Açısı Ölçüm Tekniği (Contact Angle) ile Karakterizasyonu

Temas açısı ölçüm tekniği Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinin hidrofobik/hidrofilik özelliklerinin tespiti amacıyla kullanılmıştır. Temas açısı ölçümleri hava ortamında oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş, su damlası manuel olarak mikro şırınga ile oluşturulmuş sabit

damla yöntemi kullanılarak GC elektrot yüzeyine uygulanmıştır. Hem sol hem de sağ temas açısı ve damla boyut parametreleri, dijitalleştirilmiş görüntüden otomatik olarak hesaplanmıştır. Verilerin sağ ve sol açı değerlerinin ortalaması hesaplanmış ve verilerle istatistiksel analizler yapılmıştır. Temas açısı ölçümleri sonucunda, yüzeylerin hava ortamında ortam sıcaklığında su damlası ile etkileşimine dair görüntüleri ve temas açısı değerleri Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/ MWCNT/GC elektrot yüzeylerine ait su temas açısı ölçüm sonuçları

<u>Yüzey</u>	<u>Ortalama Temas Açısı (°)</u>	<u>Yüze Ait Görüntü</u>
Yalın GC	71,85°±0,04	 YALIN GC
MWCNT/GC	75,95°±0,53	 (MWCNT / GC)
GR/GC	78,90°±0,08	 (GRAFEN / GC)
Au/GC	72,30°±0,33	 Au/GC
Au/MWCNT/GC	74,15°±0,86	 Au/MWCNT/GC

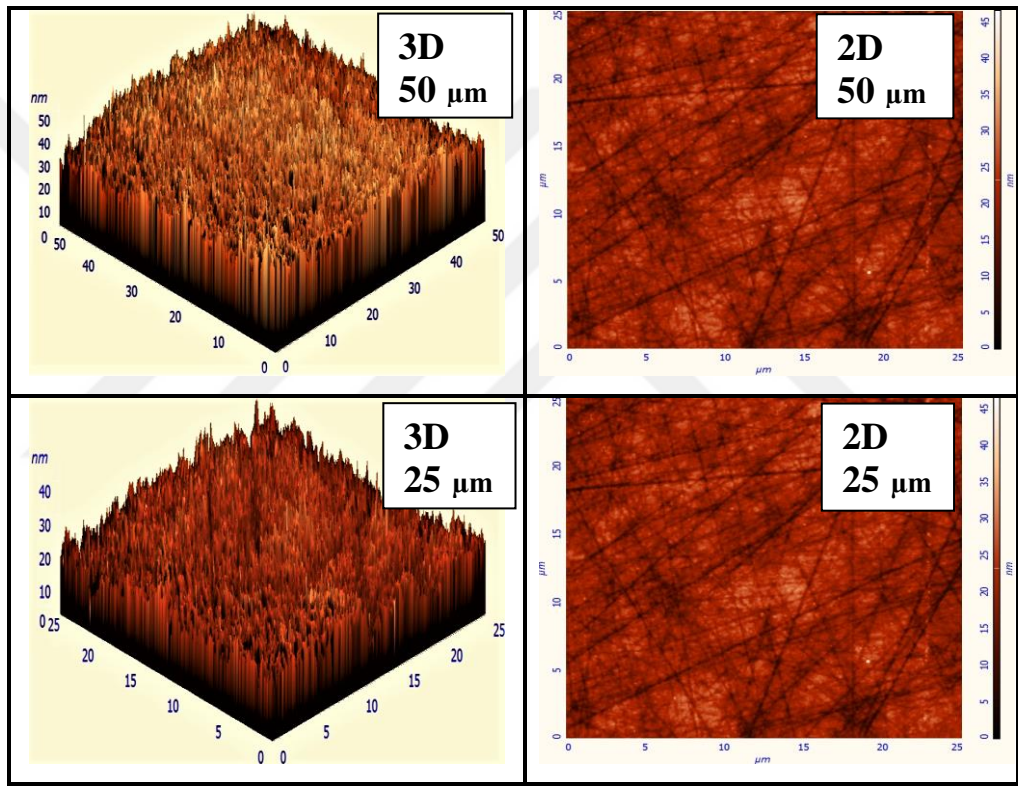
Çizelge 3.8.'deki temas açısı değerleri incelendiğinde, Yalın GC, MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinin su damlasıyla yaptığı temas açılarının sırasıyla $71,85^{\circ} \pm 0,04$; $75,95^{\circ} \pm 0,53$; $78,90^{\circ} \pm 0,08$; $72,30^{\circ} \pm 0,33$ ve $74,15^{\circ} \pm 0,86$ olduğu görülmektedir. Bu durum modifiye GC elektrot yüzeylerinin yalın GC elektrot yüzeyinden farklı bir karakterde olduğunu ve yalın yüzeyin modifikasyon sonucunda hidrofilik özelliğini bir miktar kaybettiğini göstermektedir. Modifiye yüzeyler içerisinde en hidrofilik olan yüzeyin Au/GC, en hidrofobik yüzeyin ise Grafen/GC olduğu tespit edilmiştir. MWCNT/GC elektrot yüzeyinin yüzeye Au elektrobiriktirme işlemi uygulanmasından sonra hidrofobik özelliğini bir miktar kaybettiği görülmüştür.

MWCNT ve GR yapısal olarak C=C bağları içerdiğinden elektrot yüzeylerinin bu yapılarla modifikasyonu sonucunda yüzeyin su ile yaptığı temas açısı, yalın yüzeyin yaptığı temas açısına göre nispeten daha yüksek bulunmuştur. Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyinin MWCNT/GC elektrot yüzeyine göre su temas açısının nispeten daha düşük olması, Au ve MWCNT varlığının elektrot yüzeyinde yapmış olduğu çoklu defektlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Yang ve ark 2013). Standart sapmanın Au/MWCNT/GC elektrotta diğer elektrotlara göre nispeten yükselmesi de yüzeyde oluşan sıyrılma dolayısıyla bu elektrot yüzeyinin homojenliğini kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

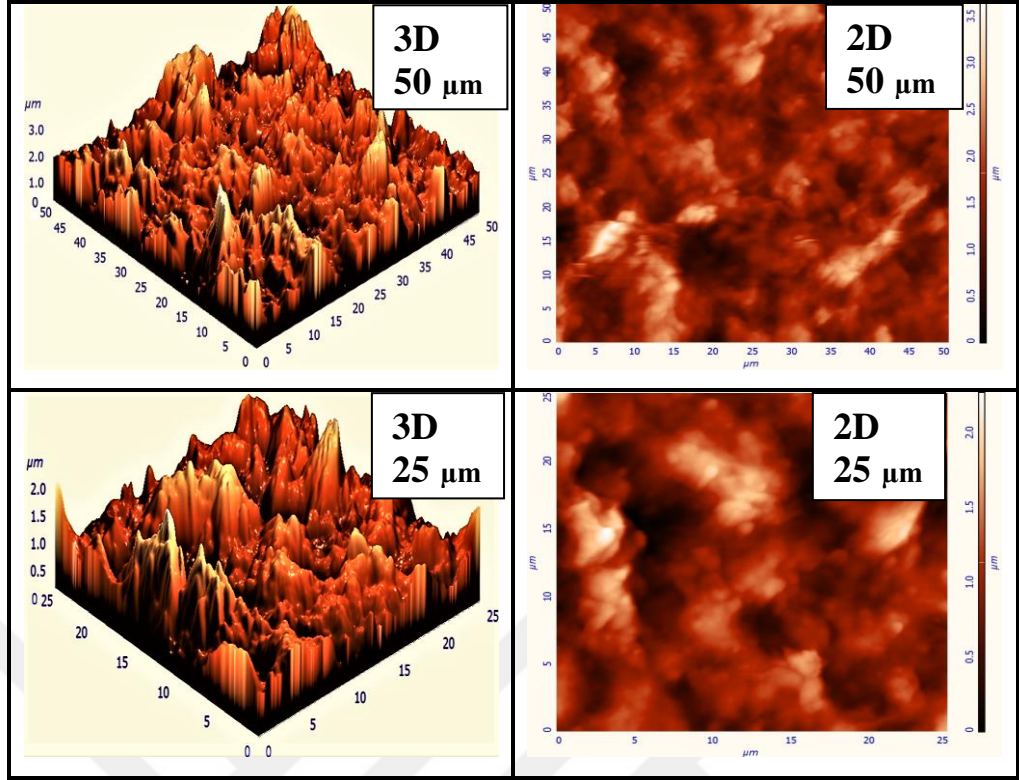
➤ Elektrot Yüzeylerinin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Karakterizasyonu

Yüzey topografisini angström (Å) seviyesinden 100 mikrona (μ) kadar ölçebilen bir metot olan AFM; elektrostatik, Van der Waals, sürtünme ve magnetik kuvvet gibi güçlerin oluşturduğu küçük hareketlerin optik araçlarla ölçülmesi ile hemen hemen her türlü numune yüzeyinin morfolojisinin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında moleküler düzeyde yüzey görüntüleme amacıyla kullanılan ve hassas bir iğnenin yüzeyi taramasıyla, yüzeyin yüksek çözünürlüklü görüntüsünü veren bir görüntüleme tekniği olan AFM katı elektrot yüzeylerinin morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. Non-Contact Mode ile hava ortamında 50 μ m alanda tarama yapılmış ve yüzeylerin hem iki boyutta hem de üç boyutta görüntüleri

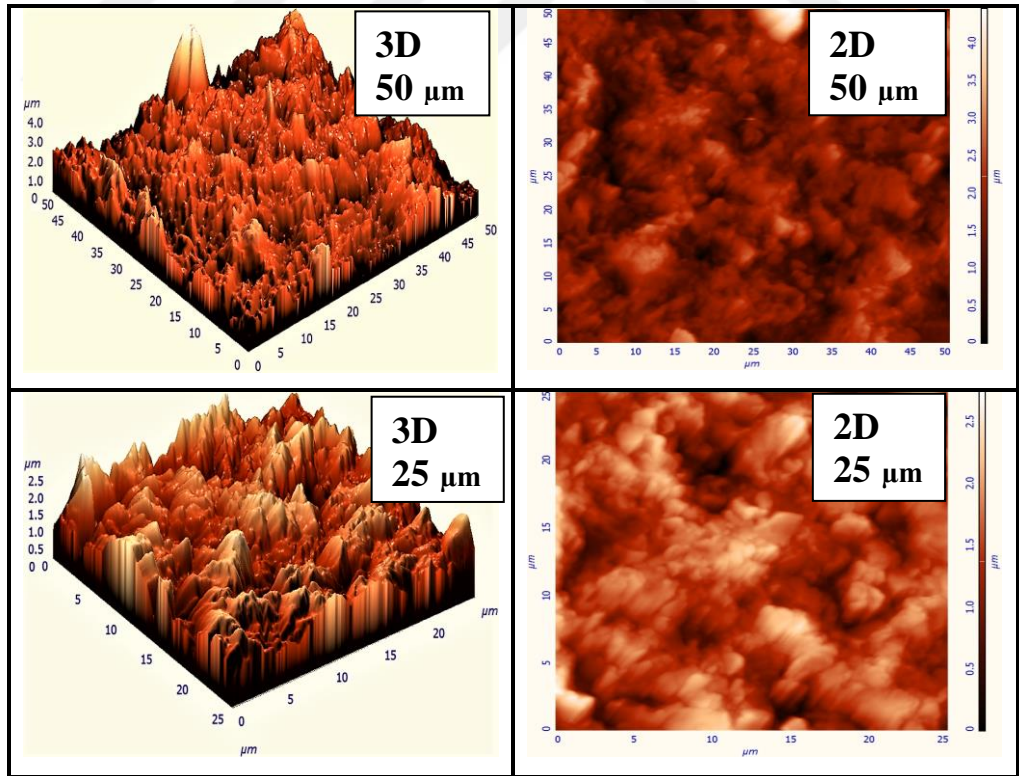
alınmıştır. Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC, Au/MWCNT/GC modifiye elektrot yüzeylerinin yüzey pürüzlülüğü değerleri Ra (Area Roughness) ve yüzeyler üzerindeki çukur ve tepeciklere göre hesaplanılan ortalama bir değer olan RMS (Root Mean Square) değerleri Çizelge 3.9.'da, yüzeye ait görüntüler ise Şekil 3.30.-3.34.'te verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde Yalın GC elektrot yüzeyine göre MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinde Ra ve RMS değerlerinde artış olması, yüzey pürüzlülüğünde bir artış olduğunu ve yalın elektrot yüzeylerinin modifiye olduğunu göstermektedir.



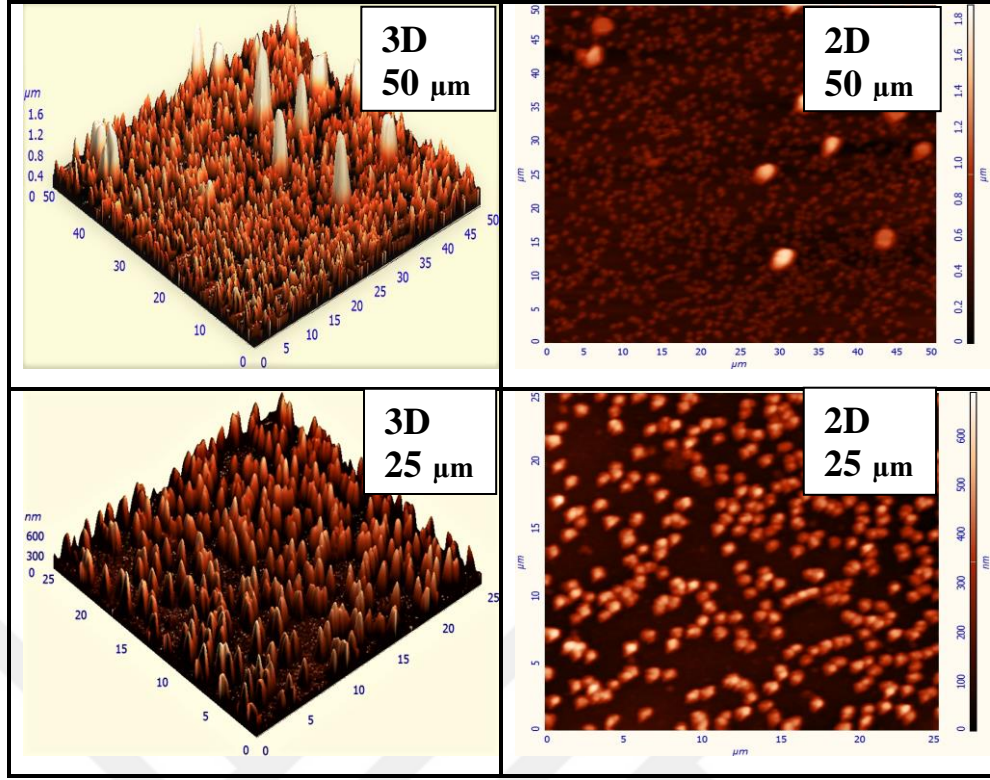
Şekil 3.30. Yalın GC elektrot yüzeyinin 50 μm'lik ve 25 μm'lik alanına ait AFM görüntüleri



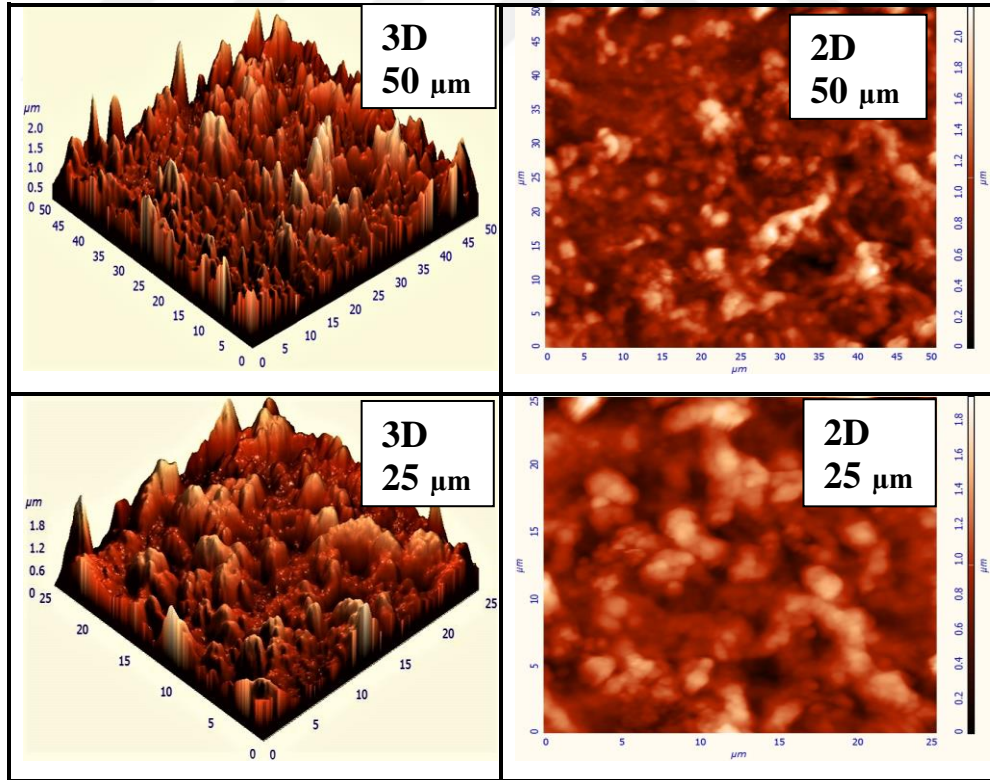
Şekil 3.31. MWCNT/GC elektrot yüzeyinin 50 μm 'lik ve 25 μm 'lik alanına ait AFM görüntüleri



Şekil 3.32. GR/GC elektrot yüzeyinin 50 μm 'lik ve 25 μm 'lik alanına ait AFM görüntüleri



Şekil 3.33. Au/GC elektrot yüzeyinin 50 μm 'lik ve 25 μm 'lik alanına ait AFM görüntüleri



Şekil 3.34. Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyinin 50 μm 'lik ve 25 μm 'lik alanına ait AFM görüntüleri

Çizelge 3.9. Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/ MWCNT/GC elektrot yüzeylerinde 50 ve 25 μm 'lik alanlara ait Ra ve RMS değerleri

<u>Yüzey</u>	<u>Ra (nm)</u> <u>(50 μm)</u>	<u>RMS (nm)</u> <u>(50 μm)</u>	<u>Ra (nm)</u> <u>(25 μm)</u>	<u>RMS (nm)</u> <u>(25 μm)</u>
Yalın GC	3,71014	4,66959	3,32697	4,199
MWCNT/GC	371,515	473,227	271,139	344,542
GR/GC	402,81	518,919	288,749	364,201
Au/GC	125,778	212,855	112,586	131,33
Au/MWCNT/GC	227,68	291,835	205,152	254,619

Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC 50 μm 'lik alanda her bir elektrot yüzeyi için sırasıyla Ra değerleri 3,71014; 371,515; 402,81; 125,778 ve 227,68 nm ve RMS değerleri 4,66959; 473,227; 518,919; 212,855 ve 291,835 nm olarak bulunmuştur.

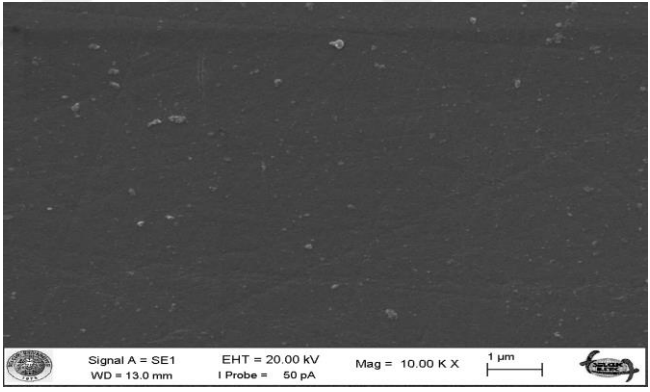
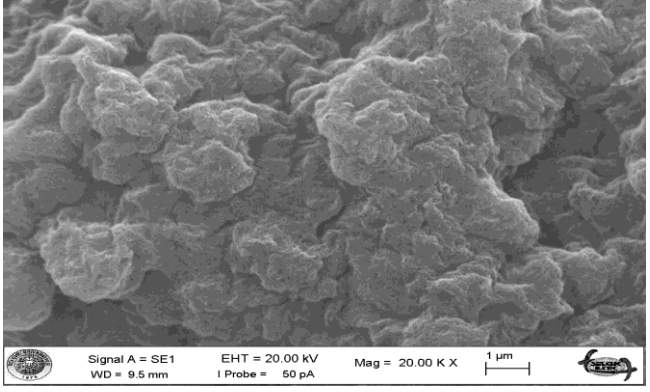
Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC 25 μm 'lik alanda ise her bir elektrot yüzeyi için sırasıyla Ra değerleri 3,32697; 271,139; 288,749; 112,586 ve 205,152 nm ve RMS değerleri 4,199; 344,542; 364,201; 131,33 ve 254,619 nm olarak bulunmuştur.

Yalın ve modifiye elektrot yüzeylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek Ra ve RMS değerine sahip yüzeylerin MWCNT ve GR ile modifiye edilen yüzeyler olduğu bununda moleküllerin boyutu ve yapısal dağılımıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyinde ise MWCNT/GC elektroda göre nispeten daha düşük Ra ve RMS değerlerinin gözlemlenmesi ise yüzeyin altın kaplanması sırasında yüzeyden bir miktar sıyrılma olduğunu ve yüzeyin homojenliğini kısmen kaybettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda temas açısındaki standart sapma artışıyla da uyumludur.

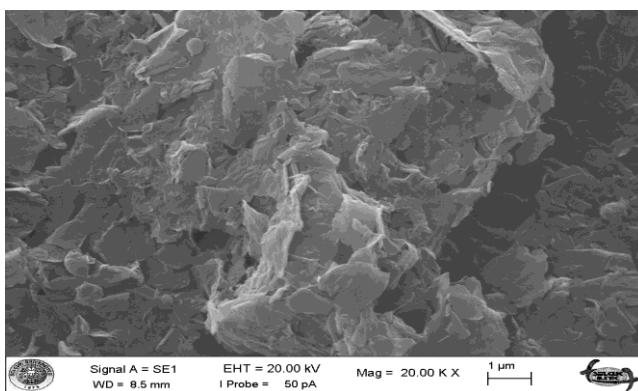
➤ Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu

SEM çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibine dayanan ve yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde sıkça başvurulan bir yöntemdir. Yalın GC, MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyleri 1 µm alanda SEM tekniği ile karakterize edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10.'da verilmiştir. Yalın GC yüzeyinin SEM görüntüsü incelendiğinde homojen bir morfolojisinin olması nedeniyle yüzeyin temiz ve modifiye edilmeye hazır olduğu bunun yanısıra MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerine ait görüntüler incelendiğinde ise elektrot yüzeyinin homojen bir şekilde söz konusu nanopartiküllerle modifiye olduğu görülmektedir.

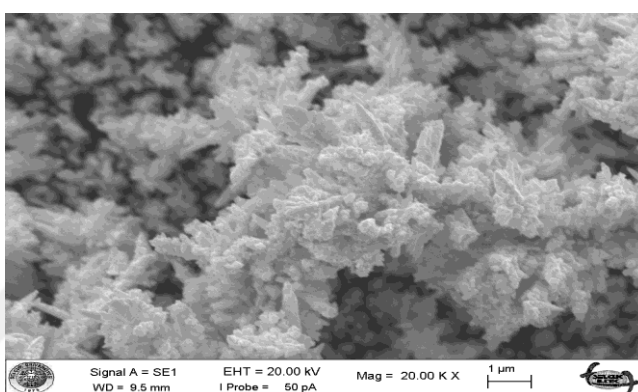
Çizelge 3.10. Yalın GC, MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri

<u>Yüzey</u>	<u>1 µm Alanda Yüze Ait Görüntü</u>
Yalın GC	
MWCNT/GC	

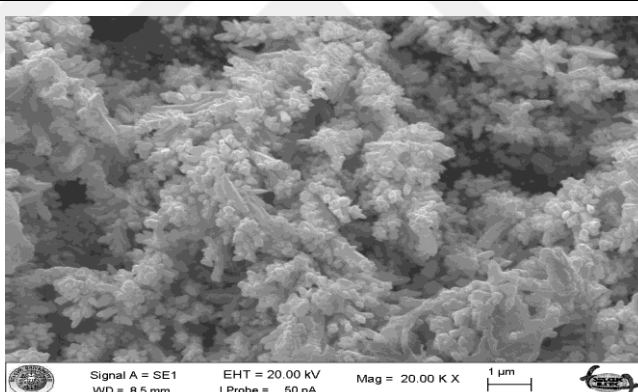
GR/GC



Au/GC



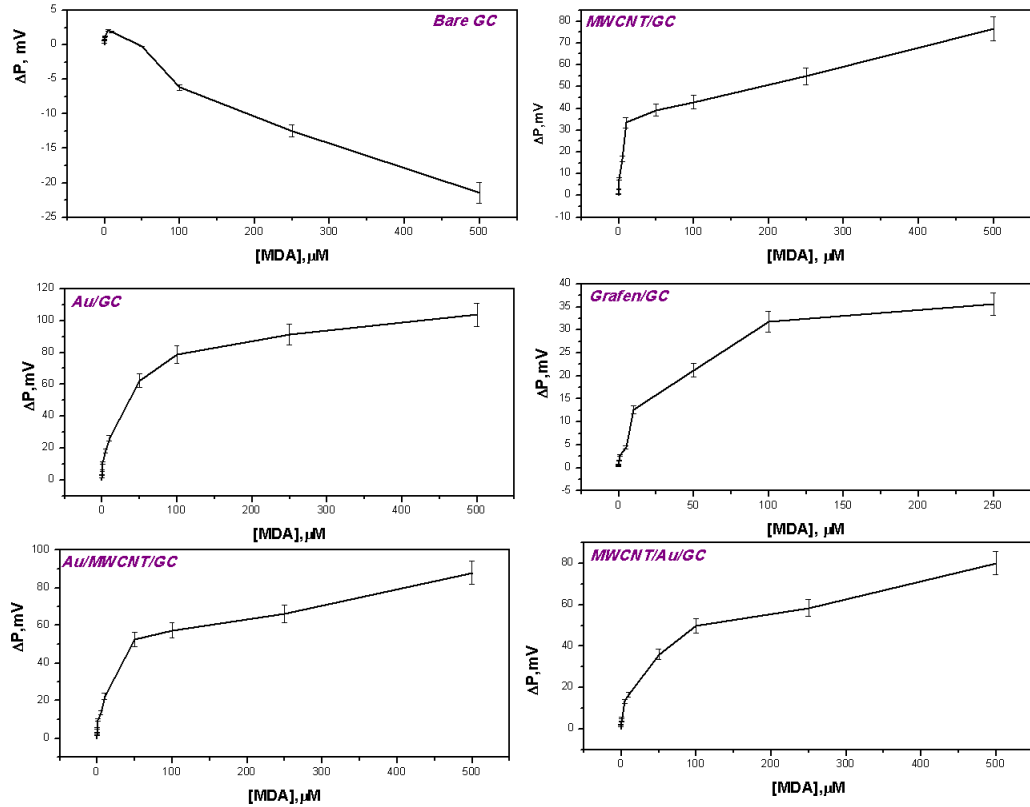
Au/MWCNT/GC



3.3.2. Optimum Çalışma Şartlarının Belirlenmesi

➤ Optimum Elektrot Yüzeyinin Belirlenmesi

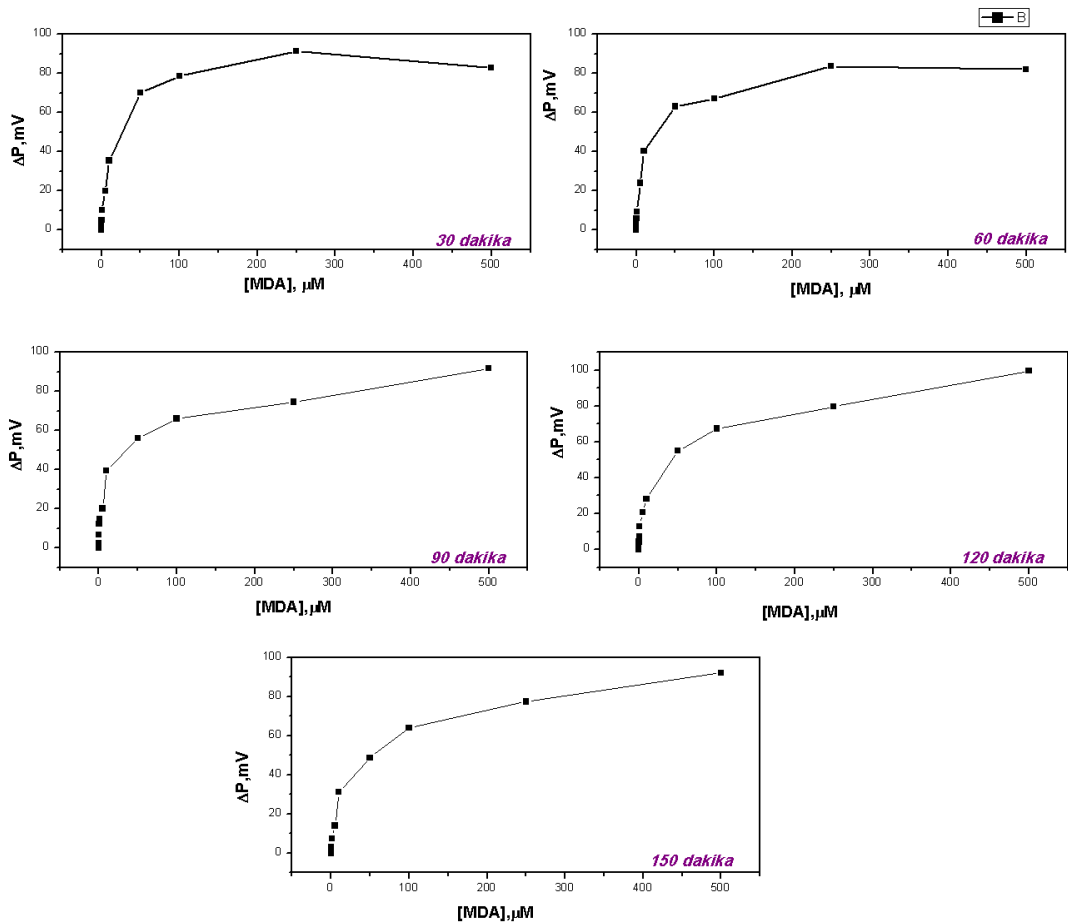
Yalın ve modifikasyon sonucu elde edilen MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC, Au/MWCNT/GC ve MWCNT/Au/GC elektrot yüzeylerinin, tampon ortamında artan MDA konsantrasyonuna karşı oluşturduğu elektrokimyasal yanıtlardan yararlanılarak, MDA tayinine yönelik biyosensör dizaynında kullanılacak olan optimum yüzey belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar 3 verinin ortalaması olarak TEP konsantrasyonuna karşı potansiyel farkı şeklinde Şekil 3.35.'te verilmiştir. Yalın, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC, Au/MWCNT/GC ve MWCNT/Au/GC elektrot yüzeylerinin potansiyel fark değerleri sırasıyla; -21,41 mV, 76,56 mV, 35,63 mV, 103,69 mV, 87,9 mV ve 80,10 mV olarak bulunmuştur. Bu nedenle MDA analizlerinde kullanılmak üzere ortamda artan MDA konsantrasyonuna karşı duyarlılığı en iyi olan Au/GC elektrot optimum yüzey seçilmiştir.



Şekil.3.35. Farklı elektrot yüzeylerinin MDA cevapları

➤ Optimum elektrot yüzeyinde elektrobiriktirme süresi optimizasyonu

Yapılan çalışmalar sonucunda; çalışma elektrodu olarak GC elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl/KCl_{doy} ve karşıt elektrot olarak Pt tel kullanılarak, 0,1 M KCl ortamında hazırlanmış 10,0 mM'lık H₂AuCl₄.3H₂O çözeltisinin bulunduğu elektrokimyasal hücre sistemine -300 mV potansiyel uygulanarak kronoamperometrik yöntemle elektrot yüzeyinde altının elektrokimyasal olarak biriktirilmesi sağlandığı yüzey MDA tayini için optimum yüzey olarak belirlenmiştir. Yüzeyde altın elektrobiriktirilmesi işleminin dakika optimizasyonunun yapılabilmesi amacıyla 1800, 3600, 5400, 7200 ve 9000 sn'lik zaman dilimlerinde elektrokimyasal hücre sistemine -300 mV potansiyel uygulanarak kronoamperometrik yöntemle elektrot yüzeyinde altının elektrokimyasal olarak biriktirilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.36.). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde en iyi cevabın elektrobiriktirme süresinin 7200 sn olduğu durumda alındığı görülmüş bu nedenle optimum yüzey olarak bu elektrot seçilmiştir.

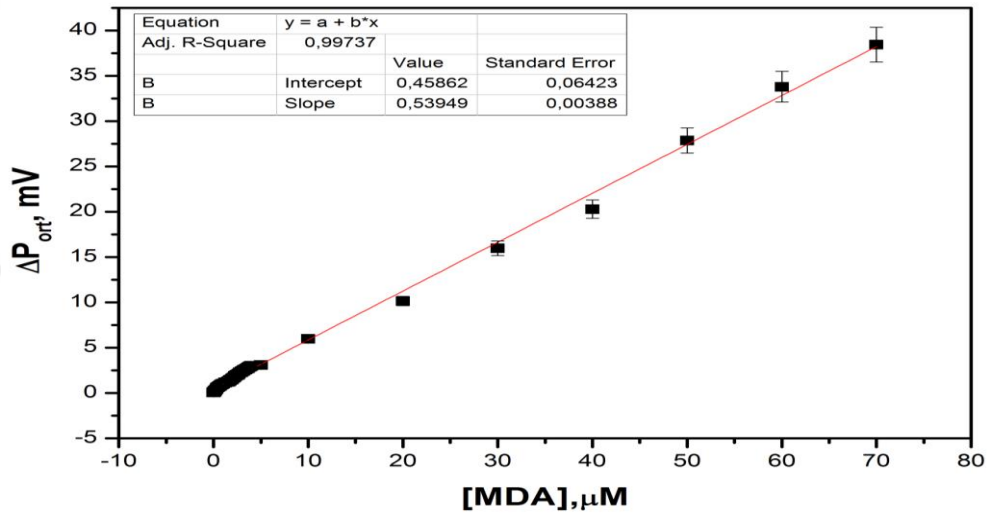


Şekil.3.36. Farklı sürelerde altın biriktirilmiş GC yüzeylerinin MDA cevapları (50 mM K₂HPO₄ pH 6,8)

3.3.3. Performans faktörleri

➤ Doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi

Optimum şartlarda hazırlanan GC elektrodun doğrusal çalışma aralığının ve duyarlılığının belirlenmesi amacıyla, optimum çalışma koşulları altında substrat derişimi değiştirilerek Δp -[MDA] grafiğı çizilerek bu grafik yardımıyla doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.37.'deki kalibrasyon eğrisinden Au/GC elektrot için doğrusal çalışma aralığı 0,01-70,0 μ M; duyarlılığı 0,54 mV/ μ M; gözlenebilme sınırı (LOD) 0,01 μ M ve tayin sınırı 0,03 μ M olarak bulunmuştur.



Şekil.3.37. Kalibrasyon grafiğı

➤ Tekrar Üretilbilirlik

Açık devre potansiyeli (OCP) tekniğı kullanılarak MDA moleküllerine en hassas cevabı veren Au/GC yüzeyin tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla Au/GC yüzeyi her defasında yeniden hazırlanarak optimum şartlarda potansiyomogramları alınmıştır. Elde edilen potansiyomogramlar incelendiğinde pik potansiyelleri farkında ciddi bir değışimin olmadığı tespit edilmiş ve varyasyon katsayısı % 0,21 olarak hesaplanmıştır. Böylece Au/GC yüzeyin MDA molekülüne yönelik kullanımında tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğu ve MDA tayininde kararlı bir tutum sergilediğı sonucuna varılmıştır.

➤ Tekrar kullanılabilirlik

Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları için optimum şartlarda Au/GC elektrot hazırlanıp aynı elektrot kullanılarak ard arda 3 ölçüm alınmıştır. Her bir işlem basamağından önce tampon çözelti yenilenmiş ve elektrotlar saf su ile iyice temizlenmiştir. Bu işlem 3 farklı Au/GC elektrot için 3'er kez tekrarlanmış ve tekrar kullanılabilirliğe ait veriler Çizelge 3.11.'de verilmiştir. Varyasyon katsayısı % 37,3 olarak bulunmuştur. Bu nedenle MDA tayini için hazırladığımız elektrot yüzeyinin tekrar üretilebilirliği olmasına rağmen tekrar kullanılabilirliğinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.11. Tekrar kullanılabilirlik verileri

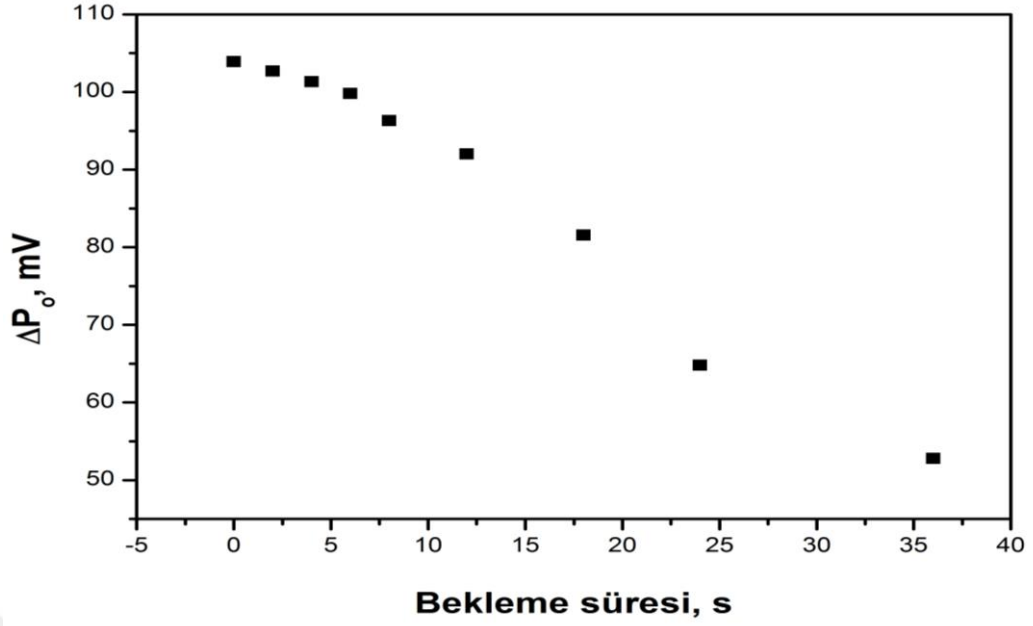
<u>Elektrot Yüzeyi</u>	<u>1. Ölçüm</u>	<u>2. Ölçüm</u>	<u>3. Ölçüm</u>	<u>2. Ölçüm Sonucu Oluşan Kayıp</u>	<u>3. Ölçüm Sonucu Oluşan Kayıp</u>
<u>1. Elektrot</u>	103,3	75,1	47,2	%27,30	%54,31
<u>2. Elektrot</u>	103,1	74,3	48,2	%27,93	%53,25
<u>3. Elektrot</u>	109,8	83,3	56,4	%24,13	%46,63

➤ Kararlılık

Optimum şartlarda hazırlanmış olan Au/GC elektrot yüzeyinin hava ortamındaki kararlılığını test etmek amacıyla hazırlanan yüzeyler 0; 2; 4; 6; 8; 12; 18; 24; 36 saat hava ortamında bekletilerek MDA tayini yapılmış ve elde edilen potansiyomogramlar değerlendirilmiştir. Yüzeylerin hava ortamında bekletilme sürelerine karşılık ölçüm sonucu elde edilen ΔP değerleri Çizelge 3.12.'de ve Bekleme süresi- ΔP grafiği Şekil 3.38.'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Au/GC elektrot yüzeyinin MDA cevabının zamanla değişimi

Zaman (saat)	0. s	2.s	4.s	6.s	8.s	12.s	18.s	24.s	36.s
ΔP	103,9	102,7	101,3	99,8	96,31	92,01	81,55	64,8	52,8



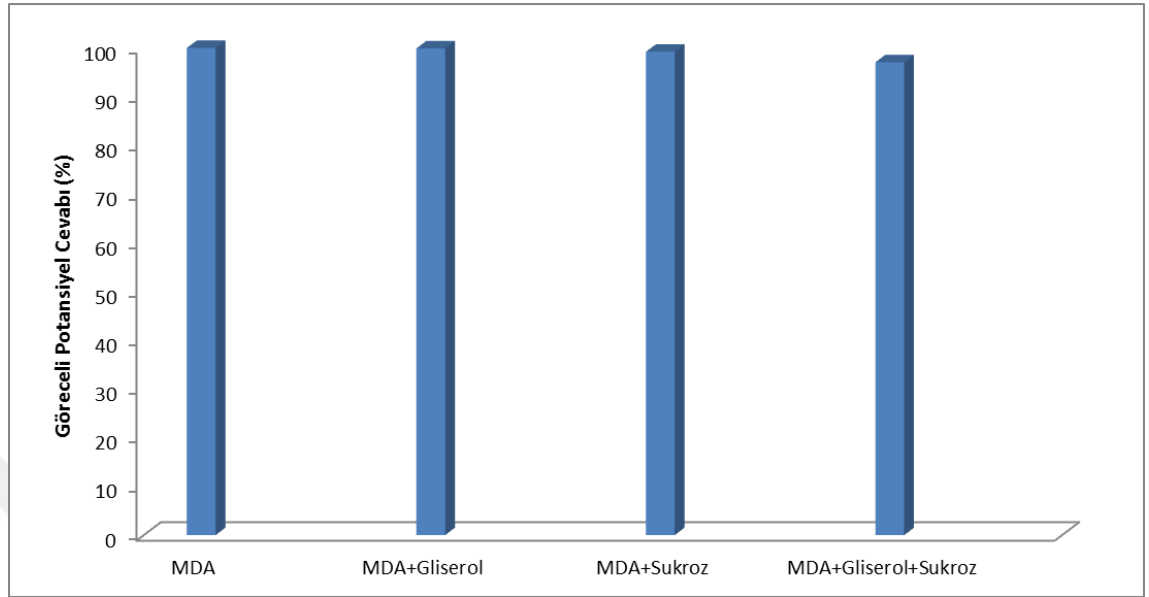
Şekil.3.38. Au/GC elektrot yüzeylerinde kararlılık

Sonuçlar değerlendirildiğinde 4 saate kadar hava ortamında bekletilen elektrotların elektrokimyasal yanıtlarında neredeyse hiçbir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra hava ortamında bekletilen elektrotların elektrokimyasal yanıtlarında; 6 saatlik bekletme sonucunda %4'lük, 8 saatlik bekletme sonucunda %7'lik, 12saatlik bekletme sonucunda %11,4'lük, 18 saatlik bekletme sonucunda %22,4'lük, 24 saatlik bekletme sonucunda %37,6'lık ve 36 saatlik bekletme sonucunda %49,2'lik bir kayıp olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla hazırlanan elektrodun hava ortamında 4 saate kadar mükemmel kararlılık gösterdiği ve bu nedenle bu süreçte MDA tayini için aynı hassasiyetle kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir.

➤ **Bozucu türlerin etkisi**

Optimum şartlarda hazırlanan Au/GC elektrodun cevabı üzerine gliserol ve sükroz gibi çeşitli biyolojik türlerin etkisini incelemek amacıyla çalışmalar yapılmış ve ilgili grafik Şekil 3.39.'da verilmiştir. Bunun için; tampon ortamında %10'luk gliserol; 250 µM sükroz ve her iki türün varlığında her biri için ayrı ayrı açık devre potansiyeli uygulanarak potansiyel farkları (ΔP) kaydedilmiştir. Au/GC elektrodun MDA cevabına gliserol, sükroz ve gliserol+sükrozun % girişim etkisi sırasıyla; 0,01; 0,78 ve 2,97 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar

incelendiğinde gliserol ve sükrözün elektrot cevabına önemli derecede bir bozucu etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 3.39. Bozucu türlerin MDA analizine etkisi

3.3.4. Gerçek Numune Analizi

Çalışmamızda, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'na gelen hemogram tüplerindeki hasta plazma örneklerinin arta kalan kısımları kullanılmış olup, hastaların LDL-kolesterol düzeyleri normal seviyeli (<130 mg/dL), orta risk seviyeli (130-159 mg/dL) ve yüksek risk seviyeli (≥ 160 mg/dL) vakalar (Tietz 1992) ayrılarak her bir grup için n sayısı 5 olarak belirlenmiştir. Oluşturulan tüm gruplar için OCP ölçümleri yapılmış ve plazma MDA düzeyleri ile LDL düzeyleri arasındaki korelasyon tespit edilmiştir.

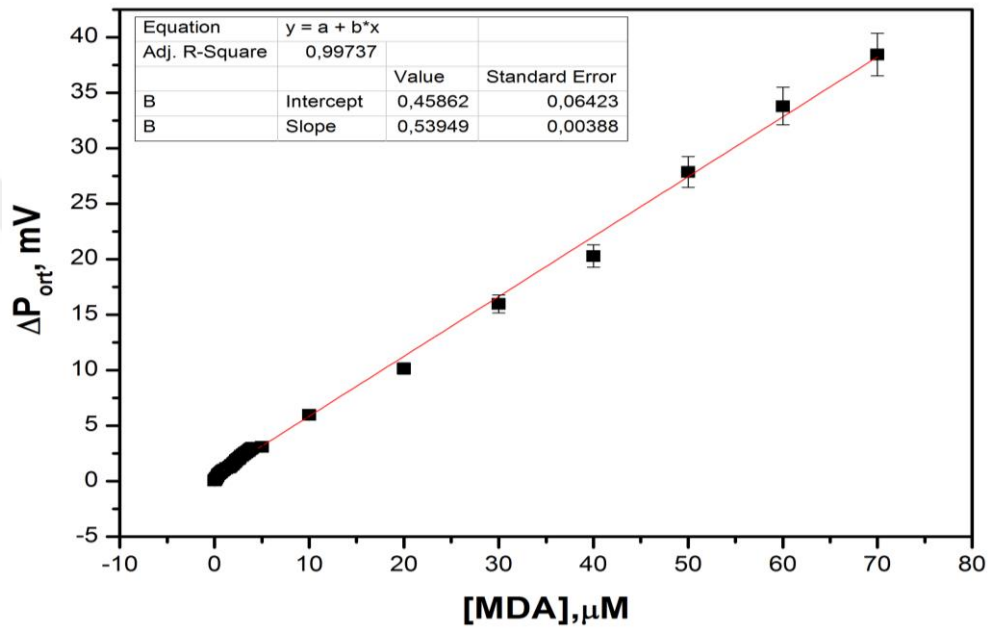
3.4. Tasarlanan Biyosensör ile MDA Analizine Ait Bulgular

3.4.1. Biyosensör yöntem bilgisi

Plazma MDA analizleri, (Yuan ve ark 2013) tarafından geliştirilen elektrokimyasal metod temel alınarak farklı özelliklere sahip nanoyapıların kullanımı ile hazırlanan yüzeylerin, elektrokimyasal karakterizasyon ve elektrokimyasal uygulama deneylerinde dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve open circuit potential (açık devre potansiyeli) tekniklerinin uygulanması ile yapılmıştır.

3.4.2. Standart grafiği

Tasarlanan biyosensör ile MDA analizine dair standart grafiği Şekil 3.40.'ta gösterildiği Şekilde olup, 70,0; 60,0; 50,0; 40,0; 30,0; 20,0; 10,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,5; 2,0; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 ve 0,039; 0,0195; 0,01 μM konsantrasyonlarındaki standartların her birinin biyosensör çalışma koşullarında oluşturduğu pik potansiyelleri farkı belirtilmiştir. Standart grafiğine ait denklem $y=0,53949x + 0,45862$ iken R^2 değeri 0.99737 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.40. Tasarlanan biyosensör ile MDA analizine ait standart grafiğ

3.4.3. Linearite alışması

Plazma MDA linearite verileri izelge 3.13.'de gösterilmektedir. 70 μM başlayıp seri dilusyonlarla 0,4 μM 'a kadar alınan olümlerin uygunluk yüzdesi hesaplanmıştır. Linearite alışması için 12 düzey iki tekrarlı çalışılmıştır (Westgard 2008). Ölçülen değerin beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılması ile % uygunluk değerleri ifade edilmiştir.

Çizelge 3.13. Plazma MDA Linearite verileri

<u>MDA (μM)</u>	<u>MDA</u> <u>1.ölçüm</u>	<u>MDA</u> <u>2. ölçüm</u>	<u>MDA 1. ve 2.</u> <u>Ölçüm</u> <u>Ortalaması</u>	<u>Dilüsyon</u>	<u>Uygunluk %</u>
70	68,69	70,88	69,79	1	99,70
60	60,16	62,44	61,30	2	102,17
50	49,84	50,33	50,08	3	100,17
30	28,36	28,46	28,41	4	94,70
20	17,56	17,87	17,71	5	88,59
10	10,14	10,16	10,15	6	101,50
5	4,79	4,86	4,83	7	96,52
2,5	2,89	2,87	2,88	8	115,26
1,25	1,38	1,34	1,36	9	108,58
0,625	0,64	0,64	0,64	10	102,13
0,5	0,47	0,47	0,47	11	93,18
0,4	0,31	0,31	0,31	12	77,48

3.4.4. Tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışması

Plazma MDA tekrarlanabilirlik çalışmalarının biyosensör sonuçlarına ait ortalama, standart sapma ve değişim katsayıları (Coefficient of Variation, CV) Çizelge 3.14'te verilmiştir. Tekrarlanabilirliğin belirlenmesi için 50,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 ve 0,5 μM konsantrasyonlardaki standartlar gün içerisinde ard arda 3 kez okutulmuştur.

Çizelge 3.14. Biyosensör ile plazma MDA tekrarlanabilirlik çalışmalarına ait ortalama, standart sapma, CV ve 2SD Aralığı

<u>MDA μM</u>	<u>Ortalama</u>	<u>Standart Sapma</u>	<u>Varyasyon Katsayısı (CV)</u>	<u>2 SD Aralığı</u>
0,5	0,002	0,001	%61,86	-0,000-0,004
0,625	0,19	0,01	%3,24	0,17-0,21
1,25	0,99	0,04	%4,08	0,90-1,07
2,5	2,71	0,02	%0,80	2,67-2,75
5	4,89	0,04	%0,87	4,81-4,98
10	10,89	0,01	%0,08	10,87-10,91
20	19,34	0,20	%1,05	18,94-19,75
50	55,71	0,32	%0,57	55,08-56,34

MDA için ortalama değerimizin % 25'ini izin verilebilir hata kabul edersek;

50 μM 'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $50 \times 0,25 = 12,5$ μM 'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $12,5 \div 4 = 3,125$ 'dir. $0,32 < 3,125$ olduğu için 50 μM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

20 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $20 \times 0.25 = 5$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $5 \div 4 = 1,25$ 'dir. $0,20 < 1,25$ olduğu için 20 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

10 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $10 \times 0.25 = 2,5$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $2,5 \div 4 = 0,625$ 'dir. $0,008 < 0,625$ olduğu için 10 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

5 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $5 \times 0.25 = 1,25$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $1,25 \div 4 = 0,3125$ 'dir. $0,043 < 0,3125$ olduğu için 5 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

2,5 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $2,5 \times 0.25 = 0,625$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $0,625 \div 4 = 0,15625$ 'dir. $0,02 < 0,15625$ olduğu için 2,5 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

1,25 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $1,25 \times 0.25 = 0,313$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $0,313 \div 4 = 0,078$ 'dir. $0,04 < 0,078$ olduğu için 1,25 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

0,625 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $0,625 \times 0.25 = 0,156$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $0,156 \div 4 = 0,039$ 'dur. $0,01 < 0,039$ olduğu için 0,625 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

0,5 µM'lık konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; $0,5 \times 0.25 = 0,125$ µM'dır. İzin verilebilir SD, Ea'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $0,125 \div 4 = 0,031$ 'dir. $0,001 < 0,031$ olduğu için 0,5 µM MDA için gün içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

3.4.5. Geri elde çalışması

Geri elde çalışmasında MDA için 1,0 M'lık stok standart kullanılmıştır. 70,0-0,01 µM aralığında 20 adet standart MDA çözeltisi hazırlanarak kalibrasyon grafiği bu aralıktaki 20 noktaya göre çizilmiştir. Geri kazanım çalışması için;

1. Elektrokimyasal hücreye plazma havuzundan 100 µL alınmıştır. 4900 µL fosfat tamponu ilave edilerek total hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. 5 mL'lik ortamda 20 µM MDA konsantrasyonu oluşturacak şekilde 1,0 M'lık stok standart elektrokimyasal hücreye ilave edilmiştir.

2. Elektrokimyasal hücreye plazma havuzundan 100 µL alınmıştır. 4900 µL fosfat tamponu ilave edilerek total hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. 5 mL'lik ortamda 15 µM MDA konsantrasyonu oluşturacak şekilde 1,0 M'lık stok standart elektrokimyasal hücreye ilave edilmiştir.

3. Elektrokimyasal hücreye plazma havuzundan 100 µL alınmıştır. 4900 µL fosfat tamponu ilave edilerek total hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. 5 mL'lik ortamda 10 µM MDA konsantrasyonu oluşturacak şekilde 1,0 M'lık stok standart elektrokimyasal hücreye ilave edilmiştir.

4. Elektrokimyasal hücreye plazma havuzundan 100 µL alınmıştır. 4900 µL fosfat tamponu ilave edilerek total hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. 5 mL'lik ortamda 5 µM MDA konsantrasyonu oluşturacak şekilde 1,0 M'lık stok standart elektrokimyasal hücreye ilave edilmiştir.

Numune hazırlığı ve diğer ön işlemler tamamlanarak örnekler cihaza verilmiş ve eklenen standartlara göre %R değerleri hesaplanmış ve ilgili veriler Çizelge 3.15.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. MDA için geri elde verileri

	<u>Ölçülen Değer</u> (µM)	<u>Eklenen</u> <u>Konsantrasyon</u> (µM)	<u>Geri Elde</u> <u>Değeri (µM)</u>	<u>% Recovery</u>
Plazma	0,04	---	---	---
Plazma Havuzu + 1,0 M'lık MDA	20,10	20	20,06	100,33
Plazma Havuzu + 1,0 M'lık MDA	17,23	15	17,19	114,59
Plazma Havuzu + 1,0 M'lık MDA	10,94	10	10,90	109,00
Plazma Havuzu + 1,0 M'lık MDA	5,26	5	5,22	104,42

3.4.6. Hemoliz, lipemik, ikterik ve dondur-çöz etkisinin belirlenmesi çalışması

Oluşturulan plazma havuzunun hemoliz değeri ölçülmüş ve (+) bulunmuştur. Hemolizli numune ise (+++) olarak değerlendirilmiştir. Dondurma ve çözme işleminin MDA ölçümüne etkisini belirlemek amacıyla plazma havuzu -80°C’de dondurulmuştur. Don-çöz etkisini değerlendirmek üzere numune 1. ve 3. gün dondurulup çözülerek değerler kaydedilmiştir. İkterik, hemoliz ve lipemik numuneler ile 2 defa dondurup çözme işlemi gerçekleştirilen numunelerin ölçüm sonuçları kaydedilerek Çizelge 3.16.’da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Hemoliz, ikterik, lipemik ve dondur-çöz yapılmış plazma numunelerinde ölçülen MDA değerleri

<u>Plazma Özelliği</u>	<u>ÖlçülenMDA Değerleri (μM)</u>	<u>Bazal MDA Değerleri (μM)</u>	<u>% Fark</u>
Hemoliz (+++)	3,77	2,64	42
İkterik	2,2	2,64	16,6
Lipemik	2,66	2,64	0,76
1. Don-Çöz	2,45	2,64	7,1
2. Don-Çöz	2,22	2,45	9,4

Çizelge 3.16.’da ifade edildiği üzere hemoliz ve lipemik numuneleri sırasıyla %42 ve %0,76 daha yüksek okunmuştur. Dolayısıyla numunenin lipemik olması sensör ile alınan ölçümlere hiç etki etmemektedir. İkterik numune ile dondurulup çözülen numuneler sırasıyla %16,6; %7,1 ve %9,4 daha düşük okunmuştur. Numune dondurulup çözüldüğünde MDA değeri 2,45 μM ve ikinci kez dondurulup tekrar çözüldüğünde ise 2,22 μM olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla dondurulup tekrar çözülme sayısı arttıkça MDA değerleri daha düşük çıkmaktadır.

3.4.7. Yüksek-orta-düşük LDL düzeyli hastalarda MDA değerlerinin belirlenmesi

Çalışmamızda, Selçuk üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı’na gelen arta kalan hasta plazma örnekleri kullanılmış olup, hastaların LDL-kolesterol düzeyleri normal seviyeli (<130 mg/dl) (Grup 1)

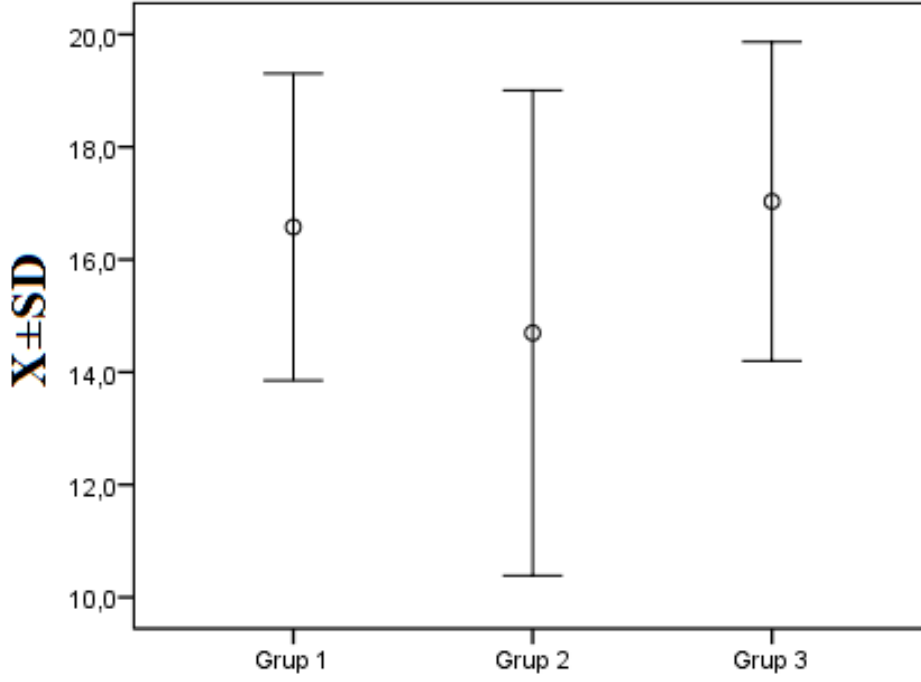
,orta riskli seviye (130-159 mg/dl) Grup 2 ve yüksek riskli seviyeli (≥ 160 mg/dl) vakalar (Tietz 1992) ayrılarak her bir grup için n sayısı 5 olarak belirlenmiştir.

Sensör ölçümlerine göre grup varyansları homojen olduğundan dolayı MDA değişkenlerinin grup ortalamaları arasında fark olup olmadığını test etmek için Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Varyans Analizi F testi sonucuna göre tasarlanan biyosensör ile alınan ölçümlere ilişkin MDA değişkeninin grup ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. ($F_{(2,12)} = 0,676$; $p = 0,527 > \alpha = 0,05$).

Elektrokimyasal biyosensör ölçümlerine ilişkin MDA değişkenlerinin gruplara göre minimum, maksimum değerleri, ortalamaları ve standart sapmaları Çizelge 3.17.'de, ilgili verilere ait grafik ise Şekil 3.41.'de verilmiştir.

Çizelge 3.17. Potansiyometrik ölçümlere ilişkin MDA değişkenlerinin gruplara göre minimum-maksimum değerleri, ortalamaları ve standart sapmaları

	<u>Minimum MDA değeri (μM)</u>	<u>Maksimum MDA değeri (μM)</u>	<u>Ort. \pm St. Sapma (μM)</u>
Grup 1 (Normal LDL düzeyine sahip vakalar)	12,48	19,71	16,58 \pm 2,73
Grup 2 (Orta risk LDL düzeyine sahip vakalar)	10,96	21,76	14,70 \pm 4,31
Grup 3 (Yüksek risk LDL düzeyine sahip vakalar)	13,25	20,35	17,03 \pm 2,83



Hasta Grupları

Şekil 3.41. Elektrokimyasal biyosensör ölçümlerine ilişkin MDA değişkenlerinin gruplara göre minimum-maksimum değerleri, ortalamaları ve standart sapmaları

3.5. Metotların Karşılaştırılmasına Ait Bulgular

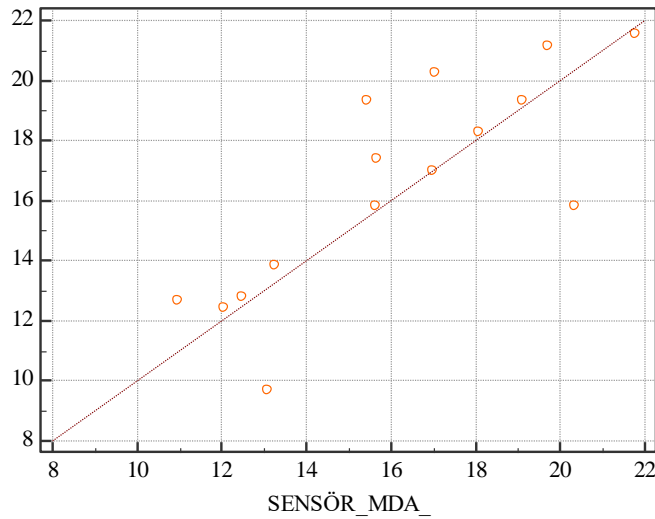
Çalışmamızın son basamağı olan, referans metod ile tasarladığımız biyosensör metoduyla aynı hastalar üzerinde gerçekleştirdiğimiz MDA düzeylerinin ölçümleri arasındaki uyum, Çizelge 3.17’de ifade edildiği üzere, Deming regresyon yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu veriler hesaplanırken, kolorimetrik yöntem ve tasarlanan biyosensör ile alınan ölçüm sonuçlarına ait hata değerlerinin normal dağılıma uygun olduğu Shapiro-Wilk testi uygulanarak belirlenmiştir ($p=0,767 > \alpha= 0,05$; $p=0,612 > \alpha= 0,05$).

Çizelge 3.17. Kolorimetrik yöntem ve tasarlanan biyosensör ile alınan ölçüm sonuçlarına ait Shapiro-Wilk testi ile yöntem karşılaştırılması verileri

Metot X	SENSÖR_MDA_		
Metot Y	KOLORİMETRİ_MDA_(Referans Metot)		
$y = -1,0758 + 1,0913 x$			
Parametre	Katsayı	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı
Sabit (Kesim)	-1,0758	3,4599	-8,4967; 6,3450
Orantısal (Eğim)	1,0913	0,2123	0,6360; 1,5466

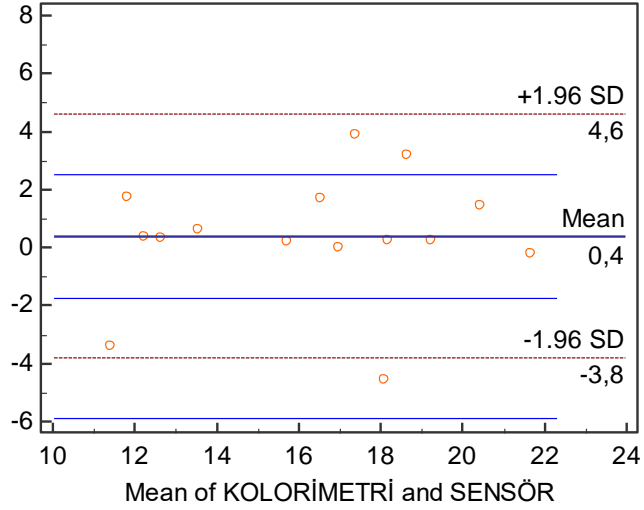
Shapiro-Wilk testi sonuçlarına göre kesim noktası -1,0758'dir ve bu değere ait %95'lik güven aralığı 0 (sıfır) değerini içermektedir. Eğim değeri ise 1,0913'dür ve bu değere ait %95'lik güven aralığı 1 (bir) -değerini içermektedir. Böylece, kolorimetrik metod ve tasarlanan biyosensör ile ölçülen MDA değerleri arasında sistematik ve orantısal yanlılık gözlenmediği sonucuna ulaşılmıştır.

Deming regresyon doğrusuna ait $y = -1,0758 + 1,0913x$ denklemi ile eşitlik doğru denklemi ($y=x$) grafiklerine bakıldığında kolorimetrik yöntem ve tasarlanan biyosensör ile ölçülen MDA değerlerinin birbirleri ile uyumlu sonuç verdiği gözlenmektedir.



Şekil 3.42. Kolorimetrik yöntem ile tasarlanan biyosensör ölçümleri arasındaki uyumun deming regresyonu

Ölçümler arasında herhangi bir sistematik veya orantısal hata bulunmadığından Deming regresyon yöntemi yerine Bland-Altman yöntemi kullanılması tercih edilmiştir. Bland-Altman yönteminin uygulanabilmesi için tasarlanan biyosensör MDA ölçümleri ile kolorimetrik yöntemle MDA ölçümleri arasındaki farka ilişkin verilerin dağılımının normal dağılıma uyması gerekmektedir. Shapiro-Wilk testi sonucunda her iki yöntemle elde edilen verilerin dağılımının normal dağılıma uyduğu varsayımının sağlandığı görülmüştür ($p=0,059 > \alpha=0,05$). Her iki ölçüm ortalaması ile farkları arasındaki pearson korelasyon katsayısı $r= -0,147$ olarak bulunmuştur ($p=0,600 > \alpha=0,05$). Her iki varsayımın sağlanması durumunda elde edilen Bland-Altman grafiği Şekil 3.43.'te verilmiştir.



Şekil 3.43. Bland-Altman grafiği

Tasarlanan biyosensör ile elde edilen MDA ölçüm değerleri, Kolorimetrik yöntemle elde edilen değerlerinden 3,8 birim büyük, 4,6 birim küçük olarak tespit edilmiş ve Çizelge 3.18.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. Yöntemlerin karşılaştırılması

Metotlar	Ortalama (\bar{d})	Standart Sapma	Uyum Sınırları	
			$\bar{d} \pm 1,96 * \text{Std. Sapma}$	
Kolorimetri- Sensör	-0,4	2,29	-3,8	4,6

4. TARTIŞMA

Lipid peroksidasyonunun; hücre zarının lipid yapısında değişiklikler oluşturması nedeni ile hücre zarı işlevinin bozulması, işlev bozukluğuna bağlı olarak oluşan serbest radikallerin etkisi ile oluşan son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonu son ürünü ve oksidatif stresin biyo belirteci olan MDA tayini önem kazanmaktadır. Birçok biyolojik dokuda analizi yapılan MDA'nın, çoğu hastalık durumunda ve hastalıkların oluşum safhasında rol aldığı bilinmektedir. MDA tayinine yönelik UV-visible (Zinellu ve ark 2011), floresans (Cooley ve Lunte 2011, Mbagu ve ark 2012), yüzey artırılmış raman spektrumu (Zhang ve ark 2010, Zhou ve ark 2015), kütle spektrometrisi (Cighetti ve ark 2015), elektron yakalama dedektörü (Stalikas ve Konidari 2001), HPLC(Lazzarino ve ark 1991, Lepage ve ark 1991, Fukunaga ve ark 1993, Cordis ve ark 1994, Grotto ve ark 2007, Ying ve ark 2008, Cheng ve ark 2009, Zhang ve ark 2010, Li ve ark 2013, El-Maghrabey ve ark 2014, Domijan ve ark 2015, Zhou ve ark 2015, Hsu ve ark 2016, Yonny ve ark 2016), GC-MS(Concheiro ve ark 2007, Zelzer ve ark 2013) gibi cihazların kullanıldığı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Diabet, kanser, kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra birçok kronik hastalık durumunda kanda yüksek değerlere sahip MDA, pek çok metot geliştirilmiş olmasına rağmen günümüzde çoğunlukla HPLC ve kolorimetrik metotlar kullanılarak ölçülmektedir. TBARS yöntemi, biyolojik sistemlerin lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan kolorimetrik analiz yöntemidir (Ohkawa ve ark 1979, Oakes ve Van Der Kraak 2003, Dawn-Linsley ve ark 2005, Tokur ve ark 2006, Lovrić ve ark 2008).

1983 yılından çeşitli bitki türlerinde MDA analizleri HPLC yöntemiyle analiz edilmeye başlanmış, (Hirayama ve ark 1983) HPLC yönteminin geliştirilmek üzere 1985 yılında insan plazma MDA analizleriyle devam etmiştir. (Wade ve ark 1985). Günümüze kadar gelinen süreçte, bu analitik metotlarda, uygun bir internal standardın olmaması biyolojik örneklerde fizyolojik MDA konsantrasyonunun belirlenmesinde tutarsızlıklar oluşturmuştur. Birçok türevlendirilmiş HPLC temelli metotlar, plazma TBA-MDA kompleksinin ölçüm esasına dayandırılmıştır. Diğer taraftan referans aralıklarının standardize

edilememesi büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmıştır. Bunlara ilaveten, yüksek maliyetli donanım, ön işlemlerin uzun olması ve biyomoleküllerin denatürasyonuna sebep olabilen etiketleme işlemlerine ihtiyaç duymaları bu tayin tekniklerinin dezavantajlarını oluşturur. Bu nedendir ki, basit donanımlarla MDA tayini için etiket gerektirmeyen hızlı bir yöntemin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

2013 yılında yüksek hassasiyeti, düşük maliyeti, basit işlemleri ve minyatürizasyonunun kolaylığı nedeniyle MDA'nın kantitatif tayini için önemli bir analitik metot oluşturan elektrokimyasal biyosensörler alanında çalışmalar başlatılmıştır (Yuan ve ark 2013). Ancak MDA'nın HPLC ve biyosensör metotlarıyla kantitatif tayininin yapılmasında molekül yapısı kısıtlayıcı unsur olarak araştırmacıların karşısına çıkmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar metot validasyon basamakları uygulanmadan sonuçlandırılmıştır. Bu metotların kısıtlayıcı unsurları değerlendirildiğinde, herbir metoda özgü birden fazla hususun olduğu görülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, MDA'nın kolorimetrik ve HPLC analitik yöntemlerle analizlerinde, yöntem performansına bağlı sınırlılıklar olması nedeniyle yeni bir analiz yönteminin geliştirilmesi sağlanmıştır. Böylelikle, MDA tayinine yönelik sensör tasarımında şu ana kadar denenmemiş olan bir yöntem geliştirilmiştir. Mevcut kolorimetrik metot ve referans yöntemden modifiye ettiğimiz HPLC ile tasarladığımız elektrokimyasal sensörün verileri karşılaştırılarak yöntem performansları değerlendirilmiştir. Bulgularımız analitik doğruluk, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, interferans, linearite, geri kazanım gibi birçok açıdan yöntem performansının değerlendirilmesi ile elde edilmiştir. Bu düşüncelerden yola çıkarak, tezin bu bölümü iki başlık altında tartışılmıştır. Birinci bölümde biyosensör tasarımında farklı özellikte çeşitli nanopartiküller kullanılarak tasarlanan sensörlerin performans faktörleri değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz performans faktörleri ile dünya literatüründeki benzer çalışmalar karşılaştırılmıştır. İkinci bölümde ise analitik anlamda yüksek performans faktörüne sahip tasarladığımız sensör ile mevcut (Kolorimetrik ve HPLC) yöntemlere ait MDA analiz bulgularının karşılaştırılması yapılmıştır.

4.1. MDA Tayinine Yönelik Hazırlanan Biyosensör Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında, geniş potansiyel aralığında çalışma imkanı sunması, akımı çok iyi iletmesi, korozif ortamlara karşı dirençli olması nedeniyle camı karbon elektrot (GC) tercih edilmiştir (Ye ve ark 2012, Nardiello ve ark 2015, Arun ve Sankaran 2016). Katı yüzeylerde filmlerin oluşturulması sonucu kısıtlı elektrot yüzeylerinin çeşitliliğinin artırılabilirdiği ve bu şekilde modifiye yüzeylerin moleküler elektronikten analitik uygulamalara kadar kullanımının mümkün olduğu bilindiğinden çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılmasına olanak sağlayabilmek amacıyla camı karbon elektrot yüzeyi; organik (Kozak ve ark 2015, Gomes ve ark 2016, Sharma ve ark 2016), inorganik (Gan ve ark 2013, Uzun ve ark 2015, Cittan ve ark 2016) ve polimerik yapılarla modifiye edilmiştir. (Gupta ve Goyal 2015, Aswini ve ark 2016, Hall 2016), Son yıllarda yüzeylerin modifikasyonu amacıyla farklı nano yapılarında kullanıldığı görülmektedir (Yuan ve ark 2013, Do ve ark 2014, Hu ve Sun 2016).

Buradan yola çıkılarak bu tez çalışmasında MWCNT, GR ve Au ile GC elektrot yüzeyleri modifiye edilmiştir MWCNT ve GR ile yüzey modifikasyonu için damlatıp kurutma işlemi uygulanırken Au ile yüzey modifikasyonu elektrokimyasal olarak gerçekleştirilmiştir. Bir diğer modifiye yüzey olan Au/GC elektrot yüzeyinin hazırlanması için üçlü elektrot sisteminde $Ag/AgCl/KCl_{\text{doy}}$ referans elektroduna karşı -300 mV potansiyel uygulanarak 7200 sn boyunca kronoamperometrik yöntemle elektrot yüzeyinde altının elektrokimyasal olarak biriktirilmesi sağlanmıştır.

Şekil 3.14.-3.23.'te verilen voltamogramlar incelendiğinde ferrosen ve potasyum ferrisiyanür redoks problemlerine ait indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları için; yalnız GC elektrot yüzeyinin elektron transferine modifiye yüzeylere göre daha az izin verdiği ve modifiye yüzeylerin elektron transferini katalizlediği görülmektedir. MWCNT yüzey iletkenliğine hem indirgeme hem de yükseltgeme yönünde katalizleyici etkide bulunurken, grafen ve altın yüzeylerin indirgeme yönünde elektron transferini katalizlediği yükseltgenme yönünde hiç etkisinin olmadığı, Au/MWCNT/GC elektrodun ise elektron transferini Au/GC elektroda göre daha fazla katalizlediği bu durumun da MWCNT'ün çok iyi

elektrokatalitik özellik göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Konuk ve Oktay 2007, Sahoo ve ark 2010).Hazırlanan elektrot yüzeyleriyle yapılan prob test sonuçları incelendiğinde modifikasyonlar sonucunda karbon yüzeyde bir filmin oluşması ile yalnız GC elektrot yüzeyinden farklı yüzeyler elde edildiği düşünülmüştür. Yuan ve ark., 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada MWNT–CS'nın bare elektrot yüzeyine modifiye edildiğinde, bare elektrot yüzeyine göre amperometrik akımında belirgin bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumun MWNT'ün mükemmel elektronik iletkenliği nedeniyle, redoks probu ve elektrot yüzeyi arasında elektron transferini hızlandırmasından kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler Yuan ve arkadaşlarının verileriyle uyumludur.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde (Şekil 3.24.-3.29.) yalnız GC elektrot yüzeyi potasyum ferri/ferrosiyaniür redoks çiftinin elektron transferine karşı bir direnç gösterirken MWCNT, Grafen, H₂AuCl₄.3H₂O maddeleriyle modifiye edilen GC elektrot yüzeylerinin elektron transferini katalizlediği tespit edilmiştir. Benzer durum Şekil 3.14. ve 3.23.'te verilen ferrosen ve potasyum ferrosiyaniür redoks problemlerine ait voltamgramlarda da gözlenmiştir. Dolayısıyla dönüşümlü voltametri tekniği ile yapılan ölçümlerle elde edilen sonuçların elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniğiyle alınan ölçüm sonuçlarıyla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde; GC elektrot yüzeyinde modifikasyon sonrası bir filmin oluştuğu belirlenmiştir. Yalnız GC, MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinin elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniğiyle karakterizasyonu sonucu elde edilen Nyquist eğrilerine ait ve Çizelge 3.7.'de verilen simülasyon verilerinden R_p değerinin Eşitlik 3.1.'e uygulanması sonucu GC elektrot yüzeyinin MWCNT, Grafen, Au ve Au/MWCNT ile kaplanma yüzdeleri hesaplanmıştır. Eşitlik 3.1.'de R_p ve R_p' sırasıyla yalnız ve modifiye GC elektrot yüzeylerine ait direnç değerlerini ve Q ise kaplanmanın yüzde olarak oranını ifade etmektedir. Her bir yüzeye ait simülasyon verilerinin Eşitlik 3.1.'e uygulanması sonucu yüzeylerin yüzde kaplanma oranı MWCNT/GC, Grafen/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC için sırasıyla %98,31; %99,99; %98,92; %97,94 olarak hesaplanmıştır.

Elektrokimyasal yöntemlerde ölçümlerin doğruluğu ve duyarlılığını negatif yönde etkilemesi nedeniyle kapasitif akımın düşük olması istenir. Au/MWCNT/GC ve Au/GC elektrotlara ait dönüşümlü voltamogramlar incelendiğinde; Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyindeki elektriksel iletkenlik yüksek olmasına rağmen Au/GC elektrotla alınan ölçümdeki kapasitif akım değerinin minimuma yakın olması sebebiyle çalışmalarda optimum yüzey olarak Au/GC elektrot tercih edilmiştir.

Çizelge 3.8.'deki temas açısı değerleri incelendiğinde, Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC, Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinin su damlasıyla yaptığı temas açılarının sırasıyla $71,85^{\circ} \pm 0,04$; $75,95^{\circ} \pm 0,53$; $78,90^{\circ} \pm 0,08$; $72,30^{\circ} \pm 0,33$; $74,15^{\circ} \pm 0,86$ olduğu görülmektedir. Bu durum modifiye GC elektrot yüzeylerinin yalın GC elektrot yüzeyinden farklı bir karakterde olduğunu ve yalın yüzeyin modifikasyon sonucunda hidrofilik özelliğini bir miktar kaybettiğini göstermektedir. Modifiye yüzeyler içerisinde en hidrofilik olan yüzeyin Au/GC, en hidrofobik yüzeyin ise GR/GC olduğu tespit edilmiştir. MWCNT/GC elektrot yüzeyinin yüzeye Au elektrobiriktirme işlemi uygulanmasından sonra hidrofobik özelliğini bir miktar kaybettiği görülmüştür. MWCNT ve GR yapısal olarak C=C bağları içerdiğinden elektrot yüzeylerinin bu yapılarla modifikasyonu sonucunda yüzeyin su ile yaptığı temas açısı, yalın yüzeyin yaptığı temas açısından nispeten daha yüksek bulunmuştur. Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyinin su ile yapmış olduğu temas açısının MWCNT/GC elektrodun su temas açısından nispeten daha düşük olması, Au ve MWCNT varlığının elektrot yüzeyinde yapmış olduğu çoklu defektlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Standart sapmanın Au/MWCNT/GC elektrotta diğer elektrotlara göre nispeten yükselmesi de bu yüzeyin homojenliğini yüzeyde oluşan sıyrılma dolayısıyla kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Yang ve ark 2013).

Yalın GC, MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC, Au/MWCNT/GC modifiye elektrot yüzeylerinin yüzey pürüzlülüğü değerleri Ra (Area Roughness) ve yüzeyler üzerindeki çukur ve tepeciklere göre hesaplanan ortalama bir değer olan RMS (Root Mean Square) değerleri Çizelge 3.9.'da yüzeye ait görüntüler ise Şekil 3.30.-3.34.'te verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde Yalın GC

elektrot yüzeyine göre MWCNT/GC, GR/GC, Au/GC ve Au/MWCNT/GC elektrot yüzeylerinde Ra ve RMS değerlerinde artış olması, yüzey pürüzlülüğünde bir artış olduğunu ve yalın elektrot yüzeylerinin modifiye olduğunu göstermektedir.

Yalın ve modifiye elektrot yüzeylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek Ra ve RMS değerine sahip yüzeylerin MWCNT ve GR ile modifiye edilen yüzeyler olduğu bununda moleküllerin boyutu ve yapısal dağılımıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Au/MWCNT/GC elektrot yüzeyinde ise MWCNT/GC elektroda göre nispeten daha düşük Ra ve RMS değerlerinin gözlemlenmesi ise yüzeyin altın kaplanması sırasında yüzeyden bir miktar sıyrılma olduğunu ve yüzeyin homojenliğini kısmen kaybettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda temas açısındaki standart sapma artışıyla da uyumludur.

4.2. Kolorimetri, HPLC ve Tasarlanan Biyosensör Yöntemlerine Ait Biyoanalitik Performans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Günümüzde halen tercih edilmekte olan kolorimetrik yöntemin esas numunelerin asidik şartlarda ısıtılmasıyla meydana gelen MDA-TBA kompleksinin 400-700 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmasına dayanmaktadır (Hong ve ark 2000, Tukoçkan ve ark 2006). Kolorimetrik yöntem basit ve uygulanabilir olmasına rağmen TBA'nın diğer karbonil içerikli bileşikler olan sialik asit, prostaglandin, deoksiriboz ile interferans oluşturması nedeniyle seçici değildir (Hong ve ark 2000). Buna ilaveten, plazma yağ asitleri, TBA ile 95°C'de ısıtıldığında oksitlenebilmektedir. Dolayısıyla sonuçlar beklenenden çok daha yüksek çıkmaktadır (Hong ve ark 2000). (Tukoçkan ve ark 2006)'nın yapmış oldukları çalışmalarında bu sonuçları destekler niteliktedir. (Tukoçkan ve ark 2006)'nın çalışmasında MDA seviyeleri karaciğer, böbrek, beyin ve plazmada hem TBARS yöntemiyle doğrudan hem de 2,4 dinitrofenilhidrazin ile türevlendirilmiş HPLC yöntemiyle tayin edilerek elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistik analizleri sonucunda TBARS yöntemiyle alınan sonuçların, HPLC yöntemine kıyasla önemli derecede yüksek olduğunu gözlemlenmiştir. Doku ve plazma örneklerinde TBARS yöntemiyle MDA miktarının diğer yöntemle (direkt ve türevlendirme işleminden sonra uygulanan HPLC kıyasla daha yüksek ölçülmesini, lipit olmayan, MDA'ya benzer bu

maddelerin interferansı ve TBA reaktif maddelerin oluşumu ile açıklamışlardır. Diğer taraftan TBA metoduyla alınan ölçümlerde gün içerisinde ve günler arasında alınan sonuçlarda tutarsızlık olduğunu rapor ederek TBA testinin lipid peroksidasyon olayının değerlendirilmesinde nonspesifik olduğu bildirmişlerdir (Tukožkan ve ark 2006).

MDA lipid peroksidasyonu için biyolojik işarettir ve hassas ve seçici analitik yöntem çalışmalarında patolojik araştırmalar için oldukça önemlidir. Mendes ve arkadaşlarının 2009 yılında birden fazla modifiye edilmiş TBARS metodu üzerine yaptıkları araştırmalarında, geri elde değerini %71 olarak bulmaları metodun yetersizliğinin bir diğer bulgusu olarak karşımıza çıkmaktadır (Mendes ve ark 2009). Çalışmamızda kullanılan kolorimetrik test kitinde recovery değeri %R belirtilmemiş olduğundan kolorimetri deneyine ait verilerle HPLC ve biyosensör recovery değerlerini karşılaştırmamız mümkün olamamıştır. HPLC metoduna ait geri elde verilerimize baktığımızda %R değerleri 94,0-101,5 aralığında bulunmuştur. (Çizelge 3.6.) (Li ve ark 2013) yapmış oldukları çalışmada; türevlendirici reaktif olarak rodamin B hidrazid (RBH) kullanarak biyolojik sıvılarda MDA'nın tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmeyi ve valide etmeyi amaçlamışlardır. 50°C'de 40 dakika süreyle asit ortamında ön işlem ve türevlendirme işlemlerinden sonra; RBH türevlendirilmiş MDA C18 kolonunda 25°C'de ayrılmış, 560 nm eksitasyon ve 580 nm emisyon dalga boylarında floresan dedektörle tayin edilmiştir. Sonuçlar 0.8-1500 nM aralıkta 0.25 nM tayin limiti ile doğrusallık göstermiştir. Plazma ve idrardan MDA'nın geri kazanımı 1.45-3.26% bağıl standart sapma ile 91.50 ile 99.20 % dir. HPLC çalışma verilerimizde 0,20 nM % geri elde değerimiz %94 bulunmuştur. Sonuçlarımız (Li ve ark 2013)'nın yapmış oldukları çalışma verileriyle uyumludur.

Diğer taraftan, çalışmamızda HPLC metodu için referansmetot olarak kullandığımız (Hong ve ark 2000)'nın 5 µM MDA için geri kazanım değerini %84 olarak bulmuşlardır. Aynı konsantrasyon için çalışmamızdaki geri kazanım değerimiz ise %99,84 olarak bulunmuştur. Çalışma verilerimize ait geri kazanım değerleri, (Hong ve ark 2000)'nın çalışmalarına göre analitik performans değerlendirme kriterlerine göre üstündür. Çalışmamızda kullandığımız HPLC

metodunun temeli her ne kadar Hong ve ark.,'nın metoduna dayansada yöntem üzerinde yaptığımız modifikasyonların sonucunda, analitik performans bakımından kabul edilebilirliği daha üstündür. Çalışmalar arasındaki farklılıklar, kullanılan mobil faz ile ortam şartlarına dayanmaktadır (Hong ve ark 2000).

Diğer taraftan biyosensör metoduna ait geri elde verileri değerlendirildiğinde HPLC metodu için 5,0 µM konsantrasyonda %R değeri 101,5; 4,0 µM konsantrasyonda %R değeri 94,0; 1,25 µM konsantrasyonda %R değeri 94,56 ve 0,625 µM konsantrasyonda %R değeri 99,84 dolayısıyla %R değerleri %94,0-101,5 aralığında bulunurken, biyosensör için 20,0 µM konsantrasyonda %R değeri 100,3; 15 µM konsantrasyonda %R değeri 114,6; 10 µM konsantrasyonda %R değeri 109,0; 5,0 µM konsantrasyonda %R değeri 104,4; dolayısıyla %R değerleri %100,3-%114,6 aralığında tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu verilerden yola çıkarak biyosensör ve HPLC verilerimize ait geri elde değerleri bakımından metodun üstün olduğunu söyleyebiliriz.

HPLC metodu ile İnsan kan örneklerinde florensan dedektör kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada 0,1-1,04 µM lineer aralık tespit edilmiş iken (Wong ve ark 1987, Tatum ve ark 1990, Carbonneau ve ark 1991, Richard ve ark 1992, Chirico ve ark 1993, Li ve Chow 1994, Templar ve ark 1999), benzer metot uygulanan bir diğer çalışmada (Breusing ve ark 2010) bu değer 10-1200 µM olarak bulunmuştur. Sunulan çalışmada ise 0,039-20,0 µM olarak tespit edilmiştir. Yüzde uygunluk değerleri hesaplandığında ise 20 µM için %102,5; 10 µM için %98,1; 0,312 µM için %108,8 olarak tespit edilmiştir. (Çizelge 3.4.) Bir yöntemin linearitesi dilüsyon işlemi yapılmaksızın beklenen değerlerin % 95-99'unu ölçebilmelidir. CLIA 88'e göre yöntemin linearitesi rapor edilebilir aralık olarak da tanımlanmaktadır (Tietz 1992, Jung ve ark 2006, Burtis ve ark 2012). Bu nedenledir ki HPLC yöntemimizdeki lineer aralığı rapor edilebilir aralık olarak tanımlanabilir.

Hazırlanan Au/GC elektrodun doğrusal çalışma aralığının ve duyarlılığının belirlenmesi amacıyla, optimum çalışma koşulları altında substrat derişimi değiştirilerek Δp -[MDA] grafiği çizilerek bu grafik yardımıyla doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.37.'deki kalibrasyon eğrisinden Au/GC elektrot için doğrusal çalışma aralığı 0,01-70,0 µM; duyarlılığı 0,54mV/µM; gözlenebilme

sınırı (LOD) 0,01 μM ve tayin sınırı 0,03 μM olarak bulunmuştur. Yüzde uygunluk değerlerinin ise % 93,2 ve % 99,70 olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 3.11). (Yuan ve ark 2013) 0,1-90 μM aralığındaki MDA'nın logaritmik konsantrasyonlarına bağımlı bir lineerlik olduğu bulunmuştur. Regresyon eşitliği; $\Delta I \text{ (mA)} \approx 22.95 + 18.79 \log C \text{ (mmol/L)}$ ve regresyon katsayısı 0,9998 olarak bulunmuştur.

Au/GC elektrot yüzeyinin performans faktörlerini incelemek amacıyla tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen potansiyogramlar incelendiğinde pik potansiyellerinde ciddi bir değişimin olmadığı tespit edilmiş ve varyasyon katsayısı % 0,21 olarak hesaplanmıştır. Böylece Au/GC yüzeyin MDA molekülüne yönelik kullanımında tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğu ve MDA tayininde kararlı bir tutum sergilediği sonucuna varılmıştır. Buna rağmen tekrar kullanılabilirlik çalışmasında Au/GC elektrot ile alınan ölçümler sonucu varyasyon katsayısı % 37,3 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla bu elektrodun tekrar üretilebilirliği söz konusu iken, tekrar kullanılabilirliği yönündeki veriler elektrodun tek kullanımlık olduğunu göstermektedir.

Kolorimetrik MDA analizinde ise; kullanılan ticari test kitinde lineer aralık 0-50 μM olarak belirtilmiş ancak, yapılan analizler sonucunda % uygunluk 1,25 μM için % 56,04 ve 50 μM için % 103,44 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, bu verilerden bazılarının, CLIA88 kriterine göre kabul edilebilir aralıktan olmadığı görülmektedir. Diğer taraftan, günümüze kadar gelen TBARS metodu ve HPLC metodu ile yapılan çalışmalar ile çalışmamızın lineerite verileri karşılaştırıldığında biyosensördeki yüzde uygunluk değerlerinin CLIA88'e göre kabul edilebilir ve diğer metodlara göre üstün olduğu söylenebilir.

MDA analizine yönelik geliştirilen elektrokimyasal biyosensörler alanında ilk ve tek çalışma, Yuan ve ekibi tarafından 2013 yılında yapılmıştır. (Yuan ve ark 2013)'nin yapmış oldukları çalışmalarında MDA'nın kolay tespiti için ilk kez karbon nanotüpleri kullanarak elektrokimyasal biyosensörler tasarlamışlardır. Geliştirdikleri bu sensörün yüksek hassasiyet, kabul edilebilir seçicilik, düşük tayin sınırı, 0,1 $\mu\text{mol/L}$ den 90 $\mu\text{mol/L}$ 'ye doğrusal cevap aralığı gösterdiğini ve MDA'nın kabul edilebilir bir seçicilik ile CFH (Human complement factor H) bağlayabildiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda tekrarlanabilirlik değerleri olarak kolorimetrik ticari test kiti prosedüründeki değerler dikkate alınmış ve diğer çalışma metodları ile kıyaslanmalarında bu değerler kullanılmıştır. Kit içeriğinde, kolorimetrik MDA analizi için gün-içi CV değeri 10 insan plazması bazında % 5,5 ve günler-arası değeri 8 insan plazması bazında %5,9 olarak bildirilmiştir. HPLC metoduna ve biyosensör metoduna ait gün içi tekrarlanabilirlik çalışma verilerimizi (Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.12.) karşılaştırdığımızda ise, biyosensör CV değerinin birçok konsantrasyon değerinde benzer sonuçlar gösterdiğini bu bakımdan da sensörün üstünlük gösterdiğini ifade edebiliriz.

MDA, LPO'nun kararlı ürünü olduğundan dolayı sıklıkla LPO'nun biyolojik işareti olarak kullanılır. (Domijan ve ark 2015), çeşitli biyolojik numunelerde (insan plazması, balık karaciğer dokusu ve kültür hücreleri) MDA düzeyini belirlemek için 2-tiyobarbitürik asit tayinine dayalı floresans temelli HPLC yöntemini kullanmışlardır. Yöntem plazma havuz örnekleri kullanılarak valide edilmiştir. Yöntemin test edilen doğrusal konsantrasyon aralığı (0.15-3.0 $\mu\text{mol/L}$); gün içi değişkenliği (CV) %4.7 ile 7.6% arasında, günler arası değişkenliği CVs 2.6 ve 6.4 % arasında ve geri kazanımda 91.2 ile 107.6% arasındadır. İnsan plazmasındaki MDA düzeyini (sağlıklı erkek, sigara içmeyenler 46.3 \pm 4.7 yaş, N=38) 2.2 \pm 1.4 $\mu\text{mol/L}$; sazan balığının karaciğer hücresindeki MDA düzeyini 0.02 \pm 0.004 nmol/g doku, kültür hücrelerinde (insan laringeal karsinom hücreleri N=10) MDA düzeyini 0.18 \pm 0.02 nmol/ mg protein olarak bulmuşlardır. Kültür hücreleri gibi düşük MDA düzeylerinin beklendiği çeşitli biyolojik örneklerde, LPO düzeyinin izlenmesinde HPLC-FL yönteminin hızlı, doğru ve güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir. Hızlı analitik süreç ve çalışma süresinin kısa olmasından dolayı HPLC-FL yönteminin klinik laboratuvarında MDA'nın rutin tayininde kullanılabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir (Domijan ve ark 2015).

HPLC çalışma verilerimiz ile (Domijan ve ark 2015)'nin verileri karşılaştırıldığında %CV değerlerinin farklı olduğu bunun yanısıra (Templar ve ark 1999)'ın 10 örnek üzerinde gün içi CV değerini %3,2-4,2 aralığında tespit ettikleri çalışma sonuçlarından daha yüksek %CV değerlerine sahip olduğumuz görülmektedir. Verilerimize göre 20,0 μM konsantrasyonuna ait %CV değeri 4,41

olup kesinlik kabul edilebilir. Diğer konsantrasyonlarda ise %CV değeri kabul edilemez düzeydedir. Diğer taraftan Breusing ve arkadaşları %CV değerini 1-30 olarak bildirmişlerdir. Çalışma verilerimizle Breusing ve arkadaşlarının verileri uyumludur.

Biyosensör çalışma verilerimizi incelediğimizde 50,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,5 μ M konsantrasyonunda gün içi kesinlik değerleri tüm konsantrasyonlar için kabul edilebilir düzeydedir. (Yuan ve ark 2013)'nın gün içi kesinlik çalışmaları yapmadıkları için bu veriler çalışmamızda kullandığımız diğer ölçüm teknikleriyle karşılaştırılmıştır. Biyosensör verileri, metot performansı değerlendirmesinde önemli bir basamak olan gün içi kesinlik parametreleri bakımından çalışmamızdaki diğer metotlara göre üstünlüğünün bir göstergesidir.

Lipemik, ikterik, don-çöz etkileri gibi numune kaynaklı faktörlerin biyosensör metodu ile alınan ölçüm sonuçlarına etkisi TBARS metodu ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Hemolizli numunenin MDA düzeylerine olan etkisi biyosensörde daha yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla biyosensörlerle MDA ölçüm analizlerinde hemolizli numune kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Biyosensör kullanılarak tayin yapılan tek bir literatür olması ve yayında gün içi kesinlik çalışmasının yapılmamış olması sebebiyle uygulanan metodların kendi içerisinde değerlendirilmesi yapılmıştır.

Metodların girişim etkisi değerlendirildiğinde; TBARS yöntemi ile MDA analizinde 250 mM sükrozun interferansa neden olduğu belirtilmiş olup, söz konusu interfere madde biyosensörde denenmiştir. Au/GC elektrodun MDA cevabına gliserol, sükroz ve gliserol+sükroz'un % girişim etkisi sırasıyla; 0.01; 0,78 ve 2,97 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde gliserol ve sükrozun elektrot cevabına önemli derecede bir bozucu etki göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla MDA analizi için biyosensörün bu alanda da üstünlüğü söz konusudur.

MDA tayini için rapor edilen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, önerilen elektrokimyasal biyosensör basitlik, yüksek hassasiyet, kısa türevlendirme süresi ve düşük interferans göstermiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu sensör tasarımı ile rutin laboratuarlarda yapılan ve uzun süreç gerektiren biyokimyasal analiz yöntemlerinin yerine çok daha hızlı ve güvenilir olan biyosensörlerin kullanımının da alternatif olarak sunulabilecek olması bakımından bilime katkı sağlayacak, kullanılacak nanomateryallerin bu amaçla ilk kez uygulanacak olması ile de biyokimya literatüründe önemli ve öncül yer edinecektir.

5.1. Sonuçlar

Lipid peroksidasyonunun; hücre zarının lipid yapısında değişikliklere neden olarak hücre zarı işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin etkisi ile, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak lipid peroksidasyonu son ürünü ve oksidatif stresin biyo belirteci olan MDA tayini bu noktada önem kazanmaktadır. Birçok biyolojik dokuda analizi yapılan MDA'nın, birçok hastalık durumunda ve hastalıkların oluşum safhasında rol aldığı düşünülmektedir. MDA ölçüm analizlerine yönelik pekçok metod geliştirilmiş olmasına rağmen günümüzde çoğunlukla HPLC ve kolorimetrik metodlar kullanılmakla birlikte, bu analitik metotlarda, uygun bir internal standardın, tayin edilme sınırları, güven aralığı, gün içi ve günler arası değişimleri, spesifitesi, sensitivitesi, linearitesi gibi analitik performans kriterlerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olmaması nedeniyle

biyolojik örneklerde fizyolojik MDA konsantrasyonunun belirlenmesinde tutarsızlıklar oluşturduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir.

Tüm bu sorunlar göz önüne alındığında son yıllarda gündemde olan ve uygulamalarıyla olanaklar platformu olarak nitelendirilen nanoteknoloji kullanılmıştır. Nanometre ölçeğinde fizik kurallarının farklı işlemlerinden, maddelerin bu ölçekte farklı özellikler taşımalarından, nano ölçekteki malzemelerin, makro ölçekli malzemelerin özelliklerinden ve de moleküler haldeki özelliklerinden yararlanılarak, sağlık alanlarından yeni enerji sistemlerine kadar geniş bir yelpazede kullanılan nanoteknoloji temelli MDA analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu biyosensörün kullanılabilirliği tespit edilerek, mobil faza farklı şekillerdeki altın nanopartiküllerin eklenmesiyle yenilikçi bir yaklaşımla çalışmamız tamamlanmıştır.

Klasik biyokimyasal yöntemlere göre çok daha seçici, hassas, küçük miktarlardaki numunelere dahi kolaylıkla uygulanabilen, son yıllarda klasik analiz yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen ve de daha basit işlemlerle çok daha hızlı sonuca ulaştıran altın nanopartikül tabanlı elektrokimyasal biyosensör tasarımını gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, sunulan çalışmamızda temel amaçlardan bir diğeri olan, sonuca en az işleme, en kısa zamanda ve istenen hassasiyette ulaşması hedefine de ulaşılmıştır. HPLC metodu ile yaptığımız çalışma da hasta plazmasından 250 µL kullanılarak 12. dakikada ölçüm alınırken, biyosensörde 100 µL hasta plazma örneği kullanılarak ölçüm süremiz 1 dakika olarak bulundu. Bununla birlikte, metodların analitik performans basamaklarını karşılaştırdığımızda, CLIA ve Westgard kriterlerine göre linearite, doğruluk, gün içi tekrarlanabilirlik, geri elde ve interferans deneyleri sonuçları başarılı bulundu. Gerek modifiye edilmiş olan HPLC metodu ve gerekse tasarladığımız biyosensör metodunun verileri, TBARS metoduna göre üstündür. Biyosensör metodunun kolay uygulanabilir olması, yüksek konsantrasyonlarda da linearite göstermesi, geri elde değerlerinin kabul edilebilir düzeyde olması bakımından HPLC metoduna göre üstün olduğu ve ayrıca avantaj sağladığı düşünülmektedir.

Sunulan çalışmamız; hızlı, çok düşük konsantrasyonlarda ölçüme olanak veren, uygulamasının kolaylığı, interferans yapmayan, tekrarlanabilirlik ve geri elde değerleri kabul edilebilir düzeyde olan ve diğer mevcut çalışma verileri ile

kıyaslandığında analitik performansı üstün olan sistemin geliştirilmiş olması bakımından temel çalışmadır.

Bu tasarlanan sensörün, rutin laboratuvarlarda uygulanan metotların yerine alternatif olarak sunulabilecek olması bakımından bilime katkı sağlayacağı, kullanılacak nanomateryallerin bu amaçla ilk kez uygulanacak olması ile de biyokimya literatüründe önemli ve öncül yer edineceği düşünülmektedir.

5.2. Öneriler

MDA tayinine yönelik yapılan çalışmalara genel bir perspektiften bakıldığında kullanılan analiz yöntemlerinin hazırlanması ve optimize edilmesi için analiz süresinin çok ciddi bir zaman kaybı oluşturduğu göze çarpmaktadır. Söz konusu anlamda geliştirdiğimiz biyosensörün diğer metotlara kıyasla üstün olarak tespit edilen özelliklerinden yola çıkarak, ilerleyen çalışmalarda, numune sayısının artırıldığı ve günlerarası tekrarlanabilirlik çalışmalarının da yer alacağı araştırmaların yapılması önerilmektedir. Bunun yanısıra, tasarlanmış olan biyosensörün protip çalışmalarının yakın zamanda planlanmasının yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acosta G, Spisso A, Fernandez LP, Martinez LD, Pacheco PH, Gil RA, 2015. Determination of thimerosal in pharmaceutical industry effluents and river waters by HPLC coupled to atomic fluorescence spectrometry through post-column UV-assisted vapor generation. *J Pharm Biomed Anal*, 106, 79-84.
- Adamo M, Sun G, Qiu D, Valente J, Lan W, Song H, Bolgar M, Katiyar A, Krishnamurthy G, 2017. Drug-to-antibody determination for an antibody-drug-conjugate utilizing cathepsin B digestion coupled with reversed-phase high-pressure liquid chromatography analysis. *Journal of chromatography. A*, 1481, 44-52.
- Ahmed Z, Subhan F, Ahmed S, Abdur Rasheed Q, Ahmed S, Shahid M, Farooq S, 2016. Development of fixed dose combination tablets of aripiprazole plus divalproex sodium and their simultaneous determination using HPLC-UV. *Drug development and industrial pharmacy*, 42, 9, 1393-405.
- Aires A, Carvalho R, Saavedra MJ, 2016. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. *Waste management (New York, N.Y.)*, 48, 457-64.
- Akamine Y, Sugawara-Kikuchi Y, Uno T, Shimizu T, Miura M, 2017. Quantification of the steady-state plasma concentrations of clozapine and N-desmethylclozapine in Japanese patients with schizophrenia using a novel HPLC method and the effects of CYPs and ABC transporters polymorphisms. *Annals of clinical biochemistry*, 0004563216686377.
- Akkuş İ, 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya, p. 68.
- Akyüz E, 2011. Ürik asit tayini için yeni bir biyosensör geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Albayrak M, 2014. Atipik Antipsikotik Bir İlaç Olan Olanzapin'in Farmasötik Preparatlarda ve Biyolojik Ortamlarda Biyoanalitik Yöntem Validasyonu, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Anderson M, 2017. Comparison and Application of Florescent and Non-florescent Methods of Low-Concentration Amino Acid Separation Using HPLC.
- Annesley TM, 2003. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem*, 49, 7, 1041-4.
- Arun V, Sankaran KR, 2016. Nafion coated TiO₂ and CuO doped TiO₂ modified glassy carbon and platinum electrodes: Preparation, characterization and application of enhancement of electrochemical sensitivity for azines. V. Arun, K.R. Sankaran. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 769, 35-41.
- Aruoma O, Halliwell B, Laughton M, Quinlan G, Gutteridge J, 1989. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron (III) complex. *Biochemical Journal*, 258, 2, 617-20.
- Aswini K, Mohan AV, Biju V, 2016. Molecularly imprinted poly (4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid) modified glassy carbon electrode as an electrochemical theophylline sensor. *Materials Science and Engineering: C*, 65, 116-25.
- Aydın Y, 2012. İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler, Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
- Bal Ö, 2012. Biyolojik Sıvılardaki Glukozun Tayini İçin Polipirol Filme Glukoz Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Barnett RN, 1968. Medical significance of laboratory results. *American journal of clinical pathology*, 50, 6, 671-6.
- Baş SZ, 2011. Ksantin tayini için amperometrik enzim elektrotlarının geliştirilmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Batmaz E, 2009. Pulmoner embolide oksidatif stres ürünleri, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Edirne.
- Battilotti M, Colapicchioni C, Giannini I, Porcelli F, Campanella L, Cordatore M, Mazzei F, Tomassetti M, 1989. Characterization of biosensors based on membranes containing a conducting polymer. *Analytica Chimica Acta*, 221, 157-61.
- Behniwal PK, She J, 2017. Development of HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of metabolites of organophosphate pesticides, synthetic pyrethroids, herbicides and DEET in human urine. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-15.
- Bilber O, 2010. Bazı Gıdalarda Suda ve Yağda Çözünen Vitaminlerin Eşzamanlı Tayin Metodunun Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Konya.
- Breusing N, Grune T, Andricic L, Atalay M, Bartosz G, Biasi F, Borovic S, Bravo L, Casals I, Casillas R, Dinischiotu A, Drzewinska J, Faber H, Fauzi NM, Gajewska A, Gambini J, Gradinaru D, Kokkola T, Lojek A, Luczaj W, Margina D, Mascia C, Mateos R, Meinitzer A, Mitjavila MT, Mrakovcic L, Munteanu MC, Podborska M, Poli G, Sicinska P, Skrzydlewska E, Vina J, Wiswedel I, Zarkovic N, Zelzer S, Spickett CM, 2010. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free radical research*, 44, 10, 1203-15.
- Buerk D, Taraves C, 1993. Biosensors: Theory and Application. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 18, 3, 427.
- Burnaz Arslan N, 2013. On-line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Bazı Doğal Ürünlere Uygulanması Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon.
- Burnaz NA, Küçük M, Akar Z, 2017. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods. *Journal of Chromatography B*, 1052, 66-72.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, 2012. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book, Elsevier Health Sciences, p.
- Çalışır T, 2015. Migren etyolojisinde oksidan-antioksidan dengenin rolünün araştırılması, Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Diyarbakır.
- Carbonneau M, Peuchant E, Sess D, Canioni P, Clerc M, 1991. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clinical chemistry*, 37, 8, 1423-9.
- Castro-Gómez P, Montero O, Fontecha J, 2017. In-Depth Lipidomic Analysis of Molecular Species of Triacylglycerides, Diacylglycerides, Glycerophospholipids, and Sphingolipids of Buttermilk by GC-MS/FID, HPLC-ELSD, and UPLC-QToF-MS. *International journal of molecular sciences*, 18, 3, 605.
- Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR, 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 852, 1-2, 22-34.
- Chao J, Leung Y, Wang M, Chang RC, 2012. Nutraceuticals and their preventive or potential therapeutic value in Parkinson's disease. *Nutrition reviews*, 70, 7, 373-86.
- Chaubey A, Malhotra B, 2002. Mediated biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17, 6, 441-56.
- Chen F-c, Wang L-h, Guo J, Shi X-y, Fang B-x, 2017. Simultaneous Determination of Dexamethasone, Ondansetron, Granisetron, Tropisetron, and Azasetron in Infusion Samples by HPLC with DAD Detection. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2017.
- Chen JL, Huang YJ, Pan CH, Hu CW, Chao MR, 2011. Determination of urinary malondialdehyde by isotope dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction: a cautionary note on derivatization optimization. *Free radical biology & medicine*, 51, 9, 1823-9.

- Cheng G-W, Wu H-L, Huang Y-L, 2008. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. *Analytica chimica acta*, 616, 2, 230-4.
- Cheng GW, Wu HL, Huang YL, 2009. Automated on-line microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in whole blood. *Talanta*, 79, 4, 1071-5.
- Chirico S, Smith C, Marchant C, Mitchinson MJ, Halliwell B, 1993. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free radical research communications*, 19, 1, 51-7.
- Cighetti G, Bamonti F, Aman CS, Gregori D, De Giuseppe R, Novembrino C, de Liso F, Maiavacca R, Paroni R, 2015. Oxidative status in different settings and with different methodological approaches compared by Receiver Operating Characteristic curve analysis. *Clinical biochemistry*, 48, 1, 73-8.
- Cittan M, Koçak S, Çelik A, Dost K, 2016. Determination of oleuropein using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode by adsorptive stripping square wave voltammetry. *Talanta*, 159, 148-54.
- Concheiro M, Simões SMdSS, Quintela Ó, de Castro A, Dias MJR, Cruz A, López-Rivadulla M, 2007. Fast LC-MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. *Forensic science international*, 171, 1, 44-51.
- Cooley JC, Lunte CE, 2011. Detection of malondialdehyde in vivo using microdialysis sampling with CE-fluorescence. *Electrophoresis*, 32, 21, 2994-9.
- Cordis GA, Bagchi D, Maulik N, Das DK, 1994. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart. *Journal of Chromatography A*, 661, 1-2, 181-91.
- Çubuk O, 2007. Bütünyle Katı-Hal Mikro Enzim Sensorler Ve Uygulamaları, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- da Costa MP, da Silva Frasao B, da Costa Lima BRC, Rodrigues BL, Junior CAC, 2016. Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. *Talanta*, 152, 162-70.
- Dawn-Linsley M, Ekinci FJ, Ortiz D, Rogers E, Shea TB, 2005. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *Journal of neuroscience methods*, 141, 2, 219-22.
- Deitrich CL, Cuello-Nuñez S, Kmiolek D, Torma FA, del Castillo Busto ME, Fisicaro P, Goenaga-Infante H, 2016. Accurate quantification of selenoprotein P (SEPP1) in plasma using isotopically enriched seleno-peptides and species-specific isotope dilution with HPLC coupled to ICP-MS/MS. *Analytical chemistry*, 88, 12, 6357-65.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N, 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 15, 4, 316-28.
- Dewani A, Dabhade S, Bakal R, Gadewar C, Chandewar A, Patra S, 2015. Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation. *Arabian journal of chemistry*, 8, 4, 591-8.
- Do PT, Do PQ, Nguyen HB, Le TH, Nguyen LH, Pham HV, Nguyen TL, Tran QH, 2014. A highly sensitive electrode modified with graphene, gold nanoparticles, and molecularly imprinted over-oxidized polypyrrole for electrochemical determination of dopamine. *Journal of Molecular Liquids*, 198, 307-12.
- Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T, 2015. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL-application to various biological samples. *Biomedical Chromatography*, 29, 1, 41-6.

- Dursun F, 2009. Mediyatör Bağlı Matrikslerin Tyrosinase Tabanlı Fenol Biyosensörüne Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Egi Y, 2009. Çapraz bağlı baskılanmış glukoz oksidazın hazırlanması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü İzmir.
- El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Ohyama K, Kuroda N, 2014. Analytical method for lipoperoxidation relevant reactive aldehydes in human sera by high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Analytical biochemistry*, 464, 36-42.
- Ellison SLR, Rosslein M, Williams A, 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. USA, Eurachem/Citac, p.
- Emre B, 2007. Kolesterol Biyosensörü Tasarımında Bazı Polimerik Materyallerin Enzim İmmobilizasyon Ortamı Olarak Kullanımı, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Erden M, 1992. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 12, 201-7.
- Eren E, 2008. Potansiyometrik Esaslı Bazı İmmünoensörlerin Hazırlanması ve Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*, 11, 1, 81-128.
- Evtugyn G, Budnikov H, Nikolskaya E, 1998. Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination. *Talanta*, 46, 4, 465-84.
- Fatma D, 2009. A, E Ve K Vitaminlerinin Farmasötik Preparatlarda, İnsan Plazmasında Ve Tavşan Plazmasında Farklı Analitik Yöntemlerle Miktar Analizi, Doktora Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Fernandes R, Koudelka T, Tholey A, Dreves A, 2017. A novel tertiary prep-HPLC method for the isolation of single amino acids for AMS-radiocarbon measurement. *Journal of Chromatography B*, 1058, 85-92.
- Ferreres F, Magalhães S, Gil-Izquierdo A, Valentão P, Cabrita A, Fonseca A, Andrade P, 2017. HPLC-DAD-ESI/MSn profiling of phenolic compounds from *Lathyrus cicera* L. seeds. *Food chemistry*, 214, 678-85.
- Filip M, Vlassa M, Coman V, Halmagyi A, 2016. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC–RI optimized method. *Food chemistry*, 199, 653-9.
- Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricos C, 1997. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Annals of clinical biochemistry*, 34 (Pt 1), 8-12.
- Fukunaga K, Suzuki T, Takama K, 1993. Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 621, 1, 77-81.
- Gan T, Hu C, Sun Z, Hu S, 2013. Facile synthesis of water-soluble fullerene–graphene oxide composites for electrodeposition of phosphotungstic acid-based electrocatalysts. *Electrochimica Acta*, 111, 738-45.
- Gerard M, Chaubey A, Malhotra B, 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17, 5, 345-59.
- Gezici O, 2010. Akış Enjeksiyon-Kromatografik Yöntemlerle İmmobilize Hüyük Asidin Sabit Faz Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Konya.
- Ghassemi M, Chamkouri N, Mahboubi M, 2017. SIMULTANEOUS DETERMINATION TRACE LEVELS OF VITAMIN B1 AND VITAMIN B9 IN HUMAN SAMPLES BY ULTRASOUND-ASSISTED DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION COUPLED WITH HPLC-UV. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8, 1, 79.

- Gomathi P, Kim MK, Park JJ, Ragupathy D, Rajendran A, Lee SC, Kim JC, Lee SH, Do Ghim H, 2011. Multiwalled carbon nanotubes grafted chitosan nanobiocomposite: A prosperous functional nanomaterials for glucose biosensor application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155, 2, 897-902.
- Gomes FE, de Souza NE, Galinaro CA, Arriveti LO, de Assis JB, Tremiliosi-Filho G, 2016. Electrochemical degradation of butyl paraben on platinum and glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 769, 124-30.
- Gönenç A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B, 2001. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 26, 2, 141-4.
- Gooding JJ, 2006. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 559, 2, 137-51.
- Gözükara EM, 2010. *Biyokimya, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi*, p. 908.
- Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E, 2008. *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. Sensors (Basel, Switzerland)*, 8, 3, 1400-58.
- Grotto D, Santa Maria L, Boeira S, Valentini J, Charão M, Moro A, Nascimento P, Pombum V, Garcia S, 2007. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43, 2, 619-24.
- Guiochon G, Felinger A, Shirazi DG, Katti AM, 2006. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Boston, MA, Academic Press, p. 990.
- Gülbayzar S, 2006. *Yenidoğan Bebeklerde Kord Kanında (Oksidatif Stres Göstergesi Olarak) Malondialdehit, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı, İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.*
- Gün F, 2014. *İdrar ve Serum Kortizol Ve Kortizon Seviyelerinin Ölçümünde Immunoassay ve Sıvı Kromatografi-Sıralı Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) Metotlarının Karşılaştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Konya.*
- Gündüz T, 2007. *İnstrümental Analiz, Ankara, Gazi Kitabevi*, p. 1357.
- Gupta P, Goyal RN, 2015. Sensitive determination of domperidone in biological fluids using a conductive polymer modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 151, 1-7.
- Gutteridge JM, Halliwell B, 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biochemical sciences*, 15, 4, 129-35.
- Hacettepe Üniversitesi EF, (2005). *Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri.*
- Hall A, (2016). *Molecularly imprinted polymers, Google Patents.*
- Hallaj R, Haghghi N, 2017. Photoelectrochemical amperometric sensing of cyanide using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Microchimica Acta*, 1-10.
- Halliwell B, Gutteridge JM, 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85.
- Hasançebi Ö, 2008. *Biyosensör Hazırlamada Enzim Kaynağı Olarak Değerlendirilmek Üzere Bazı Bitkisel Dokuların İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne*
- He B, 2017. Differential pulse voltammetric assay for the carcinoembryonic antigen using a glassy carbon electrode modified with layered molybdenum selenide, graphene, and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 184, 1, 229-35.
- Heller JJ, Crowley JR, Hazen SL, Salvay DM, Wagner P, Pennathur S, Heinecke JW, 2000. p-Hydroxyphenylacetaldehyde, an aldehyde generated by myeloperoxidase, modifies phospholipid amino groups of low density lipoprotein in human atherosclerotic intima. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14, 9957-62.

- Hirayama T, Yamada N, Nohara M, Fukui S, 1983. High performance liquid chromatographic determination of malondialdehyde in vegetable oils. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 66, 2, 304-8.
- Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML, 2000. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem*, 33, 8, 619-25.
- Hsu B, Lin S, Inbaraj BS, Chen B, 2017. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz.(djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 132, 109-16.
- Hsu K-C, Hsu P-F, Chen Y-C, Lin H-C, Hung C-C, Chen P-C, Huang Y-L, 2016. Oxidative stress during bacterial growth characterized through microdialysis sampling coupled with HPLC/fluorescence detection of malondialdehyde. *Journal of Chromatography B*, 1019, 112-6.
- Hu H, Sun Y, 2016. Effect of nanostructures on heat transfer coefficient of an evaporating meniscus. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 101, 878-85.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G, 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 24, 9265-9.
- Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YHC, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JSM, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ, Penninger JM, 2008. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*, 133, 2, 235-49.
- Jan-E S, Santaladchaiyakit Y, Burakham R, 2016. Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Micro-Extraction Followed by HPLC for Determination of Preservatives in Water, Beverages and Personal Care Products. *Journal of chromatographic science*, 55, 1, 90-8.
- Janero DR, 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 6, 515-40.
- Jin D, Jin S, Yu Y, Lee C, Chen J, 2017. Classification of Cannabis Cultivars Marketed in Canada for Medical Purposes by Quantification of Cannabinoids and Terpenes Using HPLC-DAD and GC-MS. *J Anal Bioanal Tech*, 8, 349, 2.
- Jung K, Burtis CA, Ashwood E, R., Bruns DE, 2006. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6, p.
- Kaçmaz M, 2013. Total Tiroidektomi ve Total Tiroidektomi Esnasında Hipoparatiroidi Gelişmiş Olan Hastalarda Adenozin Deaminaz, Karbonik Anhidraz, Katalaz, Malondialdehit ve Nitrik Oksit Düzeyleri ile Oksidatif Stresin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van.
- Kalimuthu P, John SA, 2009. Electropolymerized film of functionalized thiadiazole on glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Bioelectrochemistry*, 77, 1, 13-8.
- Karimi-Maleh H, Shojaei AF, Tabatabaeian K, Karimi F, Shakeri S, Moradi R, 2016. Simultaneous determination of 6-mercaptopruine, 6-thioguanine and dasatinib as three important anticancer drugs using nanostructure voltammetric sensor employing Pt/MWCNTs and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluoro phosphate. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 879-84.
- Karimi A, Hayat A, Andreescu S, 2017. Biomolecular detection at ssDNA-conjugated nanoparticles by nano-impact electrochemistry. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 501-7.

- Kastner P, Pilarova P, Nejedly T, Machacek M, Klimes J, 2017. Stability Indicating Method for Determination of Sodium Picosulfate in Pharmaceutical Preparation–Comparison of HPLC, UHPLC and HTLC. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13, 3, 250-5.
- Kılıç T, 2011. Antikanser İlaç Olan Mitomycin-C'nin Dna'ya Etki Mekanizmasının Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensörler İle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kırkalı GYS, 2002. Oksidatif stresin ölçülmesi ve standardizasyonu Tıbbi laboratuvarlarda standartizasyon ve kalite yönetimi. *Türk Biyokimya Dergisi* 6.
- Knittelfelder OL, Kohlwein SD, 2017. Quantitative Analysis of Yeast Phospholipids and Sterols by High-Performance Liquid Chromatography–Evaporative Light-Scattering Detection. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, 5, pdb. prot085472.
- Koca HB, 2007. Koroner arter hastalarında lipid ve protein oksidasyonu ile selenyum içeren antioksidanların düzeyi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Köksal E, Tohma H, Kılıç Ö, Alan Y, Aras A, Gülçin İ, Bursal E, 2017. Assessment of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Nepeta trachonitica*: Analysis of Its Phenolic Compounds Using HPLC-MS/MS. *Scientia Pharmaceutica*, 85, 2, 24.
- Konuk M, Oktay S, 2007. Biyolojik Sistemlerde Uygulamalara Yeni Bir Yaklaşım: Nanoteknoloji ve Nanomateryaller.
- Köse K, Doğan, P., 1992. Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*, 340 - 50.
- Kozak D, Panigrahi M, Grabda M, Shibata E, Nakamura T, 2015. Ferrocene redox in trihexyl (tetradecyl) phosphonium bis-2, 4, 4-(trimethylpentyl) phosphinate (Cyphos IL-104)/ethanol at glassy carbon and platinum working electrodes. *Electrochimica Acta*, 163, 41-7.
- Labutin A, Temerdashev A, 2015. Nontarget screening of the markers of synthetic cannabinoids in urine using HPLC–MS/MS. *Journal of analytical chemistry*, 70, 14, 1620-8.
- Lazzarino G, Di Pierro D, Tavazzi B, Cerroni L, Giardina B, 1991. Simultaneous separation of malondialdehyde, ascorbic acid, and adenine nucleotide derivatives from biological samples by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 197, 1, 191-6.
- Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC, 1991. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 197, 2, 277-83.
- Li P, Ding G, Deng Y, Punyapitak D, Li D, Cao Y, 2013. Determination of malondialdehyde in biological fluids by high-performance liquid chromatography using rhodamine B hydrazide as the derivatization reagent. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 224-31.
- Li X-Y, Chow CK, 1994. An improved method for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Lipids*, 29, 1, 73-5.
- Liu N, Nie D, Tan Y, Zhao Z, Liao Y, Wang H, Sun C, Wu A, 2017. An ultrasensitive amperometric immunosensor for zearalenones based on oriented antibody immobilization on a glassy carbon electrode modified with MWCNTs and AuPt nanoparticles. *Microchimica Acta*, 184, 1, 147-53.
- Llano T, Quijorna N, Andrés A, Coz A, 2017. Sugar, Acid And Furfural Quantification in a Sulphite Pulp Mill: Feedstock, Product And Hydrolysate Analysis by HPLC/RID. *Biotechnology Reports*.
- Lovrić J, Mesić M, Macan M, Koprivanac M, Kelava M, Bradamante V, 2008. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum biologorum*, 110, 1, 63-8.
- Madrakian T, Alizadeh S, Bahram M, Afkhami A, 2017. A novel electrochemical sensor based on magneto LDH/Fe₃O₄ nanoparticles@ glassy carbon electrode for voltammetric determination of tramadol in real samples. *Ionics*, 23, 4, 1005-15.

- Mbagu MK, Kebulu DN, Winstead A, Pramanik SK, Banerjee HN, Iwunze MO, Wachira JM, Greco GE, Haynes GK, Sehmer A, 2012. Fac-tricarbonyl (pentylcarbonato)(α -diimine) rhenium complexes: One-pot synthesis, characterization, fluorescence studies, and cytotoxic activity against human MDA-MB-231 breast, CCI-227 colon and BxPC-3 pancreatic carcinoma cell lines. *Inorganic Chemistry Communications*, 21, 35-8.
- Mendes R, Cardoso C, Pestana C, 2009. Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry*, 112, 4, 1038-45.
- Merkoçi A, Fàbregas E, Alegret S, 1999. Consolidated biocomposite membrane technology for production of potentiometric biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 60, 2, 97-105.
- Moslen MT, 1994. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Eds: Springer, p. 17-27.
- Muhammet S, 2008. Kolesterol tayini için biyosensör hazırlanması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nardiello D, Palermo C, Natale A, Quinto M, Centonze D, 2015. Pulsed amperometric detection at glassy carbon electrodes: A new waveform for sensitive and reproducible determination of electroactive compounds. *Anal Chim Acta*, 894, 1-6.
- Nikalje A, 2015. Nanotechnology and its applications in medicine. *Med chem*, 5, 2, 081-9.
- Niu LM, Luo HQ, Li NB, Song L, 2007. Electrochemical detection of copper(II) at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of penicillamine. *Journal of Analytical Chemistry*, 62, 5, 470-4.
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ, 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 4, 447-63.
- Öğüş E, Yılmaz FM, Yılmaz H, Duranay M, Yücel D, 2004. Hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında serum malondialdehit düzeyleri ve oksidasyona yatkınlık. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 24, 4, 316-22.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95, 2, 351-8.
- Okon SL, Ronkainen NJ, 2017. Enzyme-Based Electrochemical Glutamate Biosensors. In: *Electrochemical Sensors Technology*. Eds: InTech, p.
- Öksüz M, 2014. İnorganik Arsenik Bileşiklerinin HPLC/UV Yöntemi İle Tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Özdemir Ç, 2010. Farklı Nanomalzemeler İle Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması Ve Uygulama Potansiyellerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Öztekin Y, 2008. Camsı Karbon Elektrot Yüzeyine Çeşitli Fenantrolin Türevlerinin Modifikasyonu, Yüzey Karakterizasyonu, Elektrokimyasal ve Spektroskopik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya
- Oztekin Y, Ramanaviciene A, Ramanavicius A, 2011b. Electrochemical Glutathione Sensor Based on Electrochemically Deposited Poly-m-aminophenol. *Electroanalysis*, 23, 3, 701-9.
- Oztekin Y, Ramanaviciene A, Ryskevicius N, Yazicigil Z, Üstündağ Z, Solak AO, Ramanavicius A, 2011d. 1, 10-Phenanthroline modified glassy carbon electrode for voltammetric determination of cadmium (II) ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 157, 1, 146-53.
- Oztekin Y, Ramanaviciene A, Yazicigil Z, Solak AO, Ramanavicius A, 2011a. Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 5, 2541-6.

- Oztekin Y, Tok M, Bilici E, Mikoliunaite L, Yazicigil Z, Ramanaviciene A, Ramanavicius A, 2012. Copper nanoparticle modified carbon electrode for determination of dopamine. *Electrochimica Acta*, 76, 201-7.
- Oztekin Y, Tok M, Nalvuran H, Kiyak S, Gover T, Yazicigil Z, Ramanaviciene A, Ramanavicius A, 2010c. Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper (II). *Electrochimica Acta*, 56, 1, 387-95.
- Oztekin Y, Yazicigil Z, Ata N, Karadayi N, 2010a. The Comparison of Two Different Electro-Membrane Processes Performance for Industrial Applications. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 38, 5-6, 478-84.
- Oztekin Y, Yazicigil Z, Duran T, Dumrul H, Guler E, Kocyigit O, 2010b. Development of new electrochemical surfaces for the detection of metals in waste water. *Clean–Soil, Air, Water*, 38, 10, 921-6.
- Oztekin Y, Yazicigil Z, Ramanaviciene A, Ramanavicius A, 2011c. Polyphenol-modified glassy carbon electrodes for copper detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152, 1, 37-48.
- Parent M, Boudier A, Maincent P, Gibot S, Ait-Oufella H, Boufenzer A, Jolly L, Derive M, Kouach M, Goossens JF, 2017. LR12-peptide quantitation in whole blood by RP-HPLC and intrinsic fluorescence detection: Validation and pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 31, 5.
- Presnova G, Presnov D, Krupenin V, Grigorenko V, Trifonov A, Andreeva I, Ignatenko O, Egorov A, Rubtsova M, 2017. Biosensor based on a silicon nanowire field-effect transistor functionalized by gold nanoparticles for the highly sensitive determination of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 88, 283-9.
- Redruello B, Ladero V, Del Rio B, Fernández M, Martín M, Alvarez MA, 2017. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food chemistry*, 217, 117-24.
- Regl C, Wohlschlager T, Holzmann J, Huber CG, 2017. A Generic HPLC Method for Absolute Quantification of Oxidation in Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins Using UV and MS Detection. *Analytical Chemistry*.
- Rejczak T, Tuzimski T, 2017. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. *Food chemistry*, 217, 225-33.
- Repine JE, Bast A, Lankhorst I, 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156, 2 Pt 1, 341-57.
- Richard M, Guiraud P, Meo J, Favier A, 1992. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde—thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 577, 1, 9-18.
- Sahoo NG, Rana S, Cho JW, Li L, Chan SH, 2010. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Progress in polymer science*, 35, 7, 837-67.
- Săndulescu R, Tertîş M, Cristea C, Bodoki E, 2015. New Materials for the Construction of Electrochemical Biosensors. In: *Biosensors-Micro and Nanoscale Applications*. Eds: InTech, p.
- Santos R, Hallett J, Oliveira MC, Sousa MM, Sarraguça J, Simmonds M, Nesbitt M, 2015. HPLC-DAD-MS analysis of colorant and resinous components of lac-dye: A comparison between *Kerria* and *Paratachardina* genera. *Dyes and Pigments*, 118, 129-36.
- Sargaço B, Serra C, Vasco E, 2017. Validation of an HPLC-DAD/UV method for the quantification of cyclamate in tabletop sweeteners: risk of exceeding the acceptable daily intake. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-8.
- Sarıca ZS, Liman BC, 2016. Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Biyokimyasal Parametrelere Etkileri. *Journal of Faculty of*

Veterinary Medicine, Erciyes University/Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 13, 2.

- Scheel GL, Tarley CRT, 2017. Feasibility of supramolecular solvent-based microextraction for simultaneous preconcentration of herbicides from natural waters with posterior determination by HPLC-DAD. *Microchemical Journal*, 133, 650-7.
- Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA, 2006. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem*, 39, 9, 947-54.
- Sharma VV, Guadagnini L, Giorgetti M, Tonelli D, 2016. Electrocatalytic determination of thiols using hybrid copper cobalt hexacyanoferrate modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 16-24.
- Shivaramakrishnan B, Gurumurthy B, Balasubramanian A, 2017. Potential biomedical applications of metallic nanobiomaterials: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8, 3, 985.
- Silverstein RL, Febbraio M, 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science signaling*, 2, 72, re3.
- Skendzel LP, Barnett RN, Platt R, 1985. Medically useful criteria for analytic performance of laboratory tests. *American journal of clinical pathology*, 83, 2, 200-5.
- Skoog D, Leary J, 1992. *Principles of Instrumental Analysis*, Fort Worth Fort Worth Saunders College p. 700.
- Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ, 2007. *Principles of Instrumental Analysis*, Belmont, CA, Thomson Brooks/Cole, p. 1039.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, 1998. *Principles of Instrumental Analysis* Orlando, Fla., Harcourt Brace College Publishers, p.
- Skoog DA, Holler, F. J., Crouch, S. R., 2013. *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Ankara, Bilim Yayınevi p. 1038.
- Stalikas CD, Konidari CN, 2001. Analysis of malondialdehyde in biological matrices by capillary gas chromatography with electron-capture detection and mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 290, 1, 108-15.
- Sturaro A, De Marchi M, Masi A, Cassandro M, 2016. Quantification of whey proteins by reversed phase-HPLC and effectiveness of mid-infrared spectroscopy for their rapid prediction in sweet whey. *Journal of dairy science*, 99, 1, 68-76.
- Tamer L, Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U. , 2000. Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1, 52-8.
- Tatum VL, Changchit C, Chow CK, 1990. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids*, 25, 4, 226-9.
- Telefoncu A, 1999. Biyoreseptör immobilizasyonu. *Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*, 42-61.
- Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ, 1999. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 14, 4, 946-51.
- Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS, 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 1, 121-31.
- Tietz WH, 1992. *Clinical Guide To Laboratory Tests*. Saunders company. Philadelphia, 71.
- Tilmaciu C-M, Morris MC, 2015. Carbon nanotube biosensors. *Frontiers in chemistry*, 3.
- Tohma H, Gülçin İ, Bursal E, Gören AC, Alwasel SH, Köksal E, 2017. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 2, 556-66.

- Tokur B, Korkmaz K, Ayas D, 2006. Comparison of two thiobarbituric acid (TBA) method for monitoring lipid oxidation in fish. *EU Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 23, 3-4, 331-4.
- Toprakkıran-Mert N, 2010. İçeceklerde kafein tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Toy A, 2012. Meme Kanserli Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası Total Antioksidan Kapasite, Eser Elementler ve Lipit Peroksidasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne
- Tukožkan N, Erdamar H, Seven I, 2006. Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. *Firat Tıp Dergisi*, 11, 2, 88-92.
- Uchiyama M, Mihara M, 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86, 1, 271-8.
- Uzun D, Gündüzalp AB, Hasdemir E, 2015. Selective determination of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid by N, N'-bis (indole-3-carboxaldimine)-1, 2-diaminocyclohexane thin film modified glassy carbon electrode by differential pulse voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 747, 68-76.
- Varache M, Escudé M, Laffont C, Rustique E, Couffin A-C, 2017. Development and validation of an HPLC-fluorescence method for the quantification of IR780-oleyl dye in lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*.
- Vural T, 2009. Karbon Nanotüp Esaslı Biyosensörlerin Geliştirilmesi Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Wade C, Jackson P, Van Rij A, 1985. Quantitation of malondialdehyde (MDA) in plasma, by ion-pairing reverse phase high performance liquid chromatography. *Biochemical medicine*, 33, 3, 291-6.
- Wang M, Yang F, Liu L, Cheng C, Yang Y, 2017. Ionic Liquid-Based Surfactant Extraction Coupled with Magnetic Dispersive μ -Solid Phase Extraction for the Determination of Phthalate Esters in Packaging Milk Samples by HPLC. *Food Analytical Methods*, 10, 6, 1745-54.
- Wang S, Guo Q, Wang L, Lin L, Shi H, Cao H, Cao B, 2015. Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography. *Food chemistry*, 172, 669-74.
- Westgard JO, 2008. Basic Method Validation, Training in Analytical Quality Management for Healthcare Laboratories, 3rd Edition., Westgard Quality Corporation (TQC), p. 320
- Wiberg K, 2004. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions, Institutionen för analytisk kemi.
- Wong S, Knight J, Hopfer S, Zaharia O, Leach CN, Sunderman F, 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry*, 33, 2, 214-20.
- Wörmer L, Lipp JS, Hinrichs K-U, 2017. Comprehensive analysis of microbial lipids in environmental samples through HPLC-MS protocols. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Petroleum, Hydrocarbon and Lipid Analysis*, 289-317.
- Wu RP, Hayashi T, Cottam HB, Jin G, Yao S, Wu CC, Rosenbach MD, Corr M, Schwab RB, Carson DA, 2010. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 16, 7479-84.
- Xu S, Feng X, Gao T, Liu G, Mao Y, Lin J, Yu X, Luo X, 2017. Aptamer induced multicoloured Au NCs-MoS₂ "switch on" fluorescence resonance energy transfer biosensor for dual color simultaneous detection of multiple tumor markers by single wavelength excitation. *Analytica Chimica Acta*.

- Yang G, Li L, Rana RK, Zhu J-J, 2013. Assembled gold nanoparticles on nitrogen-doped graphene for ultrasensitive electrochemical detection of matrix metalloproteinase-2. *Carbon*, 61, 357-66.
- Yaqub G, Iqbal K, Sadiq Z, Hamid A, 2017. Rapid Determination of Residual Pesticides and Polyaromatic Hydrocarbons in Different Environmental Samples by HPLC. *Pak. J. Agri. Sci*, 54, 2, 355-61.
- Yasukawa K, Shimosawa T, Okubo S, Yatomi Y, 2017. A simple, rapid and validated high-performance liquid chromatography method suitable for clinical measurements of human mercaptalbumin and non-mercaptalbumin. *Annals of clinical biochemistry*, 0004563217693257.
- Ye X, Gu Y, Wang C, 2012. Fabrication of the Cu₂O/polyvinyl pyrrolidone-graphene modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for sensitive detection of herbicide paraquat. *Sensors And Actuators B-Chemical*, 173, 530-9.
- Yeni F, 2009. *Pseudomonas fluorescens* Hücrelerini Temel Alan I. ve II. Nesil Biyosensörlerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yılmaz D, 2011. Glutamatın Potansiyometrik Tayini İçin Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Yılmaz Ö, 2012. Ferrosen Türevini Temel Alan Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Hazırlanması ve Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ying X-x, Li H-b, Chu Z-y, Zhai Y-j, Leng A-j, Liu X, Xin C, Zhang W-j, Kang T-g, 2008. HPLC determination of malondialdehyde in ECV304 cell culture medium for measuring the antioxidant effect of vitexin-4''-O-glucoside. *Archives of pharmacal research*, 31, 7, 878-85.
- Yonny ME, García EM, López A, Arroquy JI, Nazareno MA, 2016. Measurement of malondialdehyde as oxidative stress biomarker in goat plasma by HPLC-DAD. *Microchemical Journal*, 129, 281-5.
- Yuan L, Lan Y, Han M, Bao J, Tu W, Dai Z, 2013. Label-free and facile electrochemical biosensing using carbon nanotubes for malondialdehyde detection. *Analyst*, 138, 11, 3131-4.
- Zarei K, Khodadadi A, 2017. Very sensitive electrochemical determination of diuron on glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide-gold nanoparticle-Nafion composite film. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 171-7.
- Zelzer S, Oberreither R, Bernecker C, Stelzer I, Truschnig-Wilders M, Fauler G, 2013. Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry-comparison with high-performance liquid chromatography methodology. *Free radical research*, 47, 8, 651-6.
- Zhang D, Haputhanthri R, Ansar SM, Vangala K, De Silva HI, Sygula A, Saebo S, Pittman CU, Jr., 2010. Ultrasensitive detection of malondialdehyde with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398, 7-8, 3193-201.
- Zhang S, Wright G, Yang Y, 2000. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 5, 273-82.
- Zhao J, 2015. Simultaneous determination of plasma creatinine, uric acid, kynurenine and tryptophan by high-performance liquid chromatography: method validation and in application to the assessment of renal function. *Biomedical Chromatography*, 29, 3, 410-5.
- Zhou Y, Ding R, Joshi P, Zhang P, 2015. Quantitative surface-enhanced Raman measurements with embedded internal reference. *Analytica chimica acta*, 874, 49-53.

- Zhou Y, Wang M, Yin H, Ai S, 2017. Amperometric determination of the activity of protein kinase a using a glassy carbon electrode modified with IgG functionalized gold nanoparticles conjugated to horseradish peroxidase. *Microchimica Acta*, 1-8.
- Zinellu A, Sotgia S, Deiana L, Carru C, 2011. Field-amplified online sample stacking capillary electrophoresis UV detection for plasma malondialdehyde measurement. *Electrophoresis*, 32, 14, 1893-7.



7.EKLER

EK-1 Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2015/10

Toplantı Tarihi : 26.05.2015

Karar Sayısı 2015/179 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Esmâ MENEVŞE'nin, "Malondialdehit Tayinine Yönelik Biyosensör Tasarlanması ve Mevcut Analiz Yöntemleri ile Karşılaştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 13.05.2015 tarihli dilekçesi ve ekleri görüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Esmâ MENEVŞE'nin, "Malondialdehit Tayinine Yönelik Biyosensör Tasarlanması ve Mevcut Analiz Yöntemleri ile Karşılaştırılması" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekreteryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi

ASLI GİBİDİR
26/05/2015

Mahmut KESİK
Sekreteryas

8.ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mutahire TOK
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya-1988
Telefon : +90 536 9940905
Faks : +90 332 2412499
e-mail : mutahiretok@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Meram Konya Lisesi, Meram, Konya	2004
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Selçuklu, Konya	2010
Yüksek Lisans	: Vilnius Üniversitesi Nanoteknoloji Fakültesi, Kimya Bölümü (Erasmus Öğrenci Hareketliliği) Litvanya.	2012 (February-July)
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Selçuklu, Konya	2014
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Selçuklu, Konya	2017

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

I- SCI-Expanded Sınıfında Yer Alan Yayınlar

A1.Oztekin, Y., Tok, M., Nalvuran, H., Kiyak, S., Gover, T., Yazicigil, Z., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., “Electrochemical Modification of Glassy Carbon Electrode by Poly-4-nitroaniline and its Application for Determination of Copper (II)”, *Electrochimica Acta*, 56, 387-395, 2010.

A2. Oztekin, Y., Tok, M., Bilici, E., Mikoliunaite L., Yazicigil, Z., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., “Copper nanoparticle modified carbon electrode for determination of dopamine”, *Electrochimica Acta*, 76, 201-207, 2012.

A3. Bilici, E., Yazicigil, Z., Tok, M., Oztekin, Y., “Electrochemical determination of copper (II) using modified glassy carbon electrodes”, *Desalination and Water Treatment*, 50, 198-205, 2012.

A4. Menevse, E., Tok, M., Sivrikaya, A., Abusoglu, S., Unlu, A., “Relationship of Neutrophil Lymphocyte Ratio in Patients With Acute Myocardial Infarction, *Turkish Journal of Biochemistry*, 40, 300, Special Issue 1, 2015.

A5. Tok, M., Menevse, E., Arikoglu, H., Unlu, A., Erkoç Kaya, D. “Association between TSH status and genotypes of E23K polymorphism in KCNJ11 with gestational diabetic individuals” *FEBS J*, 283: P-03.01.1-006. doi:10.1111/febs.13808.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

I. Poster Olarak Sunulan Bildiriler

B1. Oztekin, Y., Yazicigil, Z., Gover, T., Kiyak, S., Tok, M., “Preparation of New Surfaces with the Oxidation of Amine Group in the Structure of 4-nitroaniline”, 3rd International Conference, Cost Action 637 Metals and Related Substances in Drinking Water, 58, Ioannina, Greece, 21-23 October 2009.

B2. Bilici, E., Tok, M., Oztekin, Y., Koc, Z. E., Yazicigil, Z., “A new surface prepared for the design of electrochemical sensor and its characterization”, 5th International Conference, The Vital Nature Sign, P-44, Kaunas, Lithuania, 19-21 May 2011.

B3. Mikoliunaite, L., Bilici, E., Tok, M., Oztekin, Y., Yazicigil, Z., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., “The new amino-derivative based biosensor for glucose detection”, The 13th International Conference-School Advanced Materials and Technologies, P-98, 134, Palanga, Lithuania, 27-31 August 2011.

B4. Tok, M., Bilici, E., Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Ramanavicius, A., “The preparation of modified electrode surfaces for biomedical applications”, 9thInternational Electrochemistry Meeting in Turkey, PP-48, 136, Çeşme-İzmir, Turkey, 25-29 September 2011.

B5. Oztekin, Y., Bilici, E., **Tok, M.,** Yazicigil, Z., “Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on 3-nitrophenol-modified electrode”, 9thInternational Electrochemistry Meeting in Turkey, PP-39, 309, Çeşme-İzmir, Turkey, 25-29 September 2011.

B6. Oztekin, Y., Ramanavicius, A., Bilici, E., **Tok, M.,** Yazicigil, Z., “Nanostructured electrodes for selective determination of ascorbic acid”, Pittcon Conference&Expo 2012, 550-6P, Orlando, USA, 11-15 March 2012.

B7. Cavus, E., Ramanavicius, A., Bilici, E., Menekse, H., **Tok, M.,** Yazicigil, Z., “The electrochemical behavior of 4-nitro-1-naphthyleamine on glassy carbon electrode surface”, Pittcon Conference&Expo 2012, 2410-3P, Orlando, USA, 11-15 March 2012.

B8. Voronovic, J., Tok, M., Bilici, E., Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Ramanavicius, A., “Evaluation of Nanostructures in the Design of Biosensors”, 14thInternational Conference - School Advances Materials and Technologies, P-69, Palanga, Lithuania, 27-31 August 2012.

B9. Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., Bilici, E., **Tok, M.,** Yazicigil, Z., “Electrochemical Sensing Platform Based on Nanostructures” Pittcon Conference&Expo 2013, 2800-1P, Philadelphia, USA, March 17-21, 2013.

B10. Bilici, E., Tok, M., Kızılkaya, S., Değirmenci, D., İncebay, H., Yazicigil, Z., “Nitroaniline-Modified Electrode Surface Used for Bioanalytical Application” 1thInternational Chemistry and Chemical Engineering Conference, Baku, Azerbaijan, 17-21 April 2013.

B11. Bilici, E., Tok, M., Aydın, M., Oztekin, Y., Yazicigil, Z., “An Enzymatic Glucose Sensor Based On Multi-Walled Carbon Nanotubes Decorated With 1-Aminoindan” 6thBlack Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, Maçka-Trabzon, Turkey, 10-14 September 2014.

B12.Oztekin, Y., Bilici, E., **Tok, M.**, Yazicigil, Z., “Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on 1-10 Phenantroline 5,6 Dione Modified Glassy Carbon Electrode” Pittcon Conference&Expo 2014, 510-20, Chicago, USA, March 2-6, 2014.

B13.Sivrikaya, A., Menevse, E., Dik, B., Bas, A.L., **Tok, M.**, “The effect of Nerium Oleander on Oxidative DNA damage in type 2 diabetic rats” poster code: T134, European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Paris 2015.

B14. **Tok, M.**, Menevse, E., Arikoglu, H., Unlu, A., Erkoç Kaya, D., Association between TSH status and genotypes of E23K polymorphism in KCNJ11 with gestational diabetic individuals, FEBS, P-03.01.1-006, Kusadası, September 2016.

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

I.Poster Olarak Sunulan Bildiriler

C1. Bilici, E., **Tok, M.**, Oztekin, Y., Koc, Z. E., Yazicigil, Z., “Amin Türevleriyle Katı Elektrot Yüzeylerinin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Uygulama Alanlarının Araştırılması”, 25. Uluslar arası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, A. Ü., 58, AP-043, Erzurum, 2011.

C2. Oztekin, Y., **Tok, M.**, Bilici, E., Yazicigil, Z., “Glukoz Biyosensörün Tasarımında Kullanılacak 3-Nitrofenol-Modifiye Camı Karbon Elektrodun Hazırlanması ve Karakterizasyonu”, 25. Uluslar arası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, A. Ü., 110, AP-095, Erzurum, 2011.

C3. Bilici, E., Yazıcıgil, Z., **Tok, M.**, “1-Aminoindan ile Modifiye Edilmiş Enzim Elektrot Yüzeylerinin hazırlanması”, 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, M. K. Ü., 364, Poster 322, Hatay, 2012.

C4. Sivrikaya, A., Menevse, E., Abusoglu, S., **Tok, M.**, Unlu, A., “ Mean Platelet Volume Values in Patients with Acute Myocardial Infarction: A Retrospective Observational Study ” Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği (KBUD) Uluslararası Katılımlı Kongre & Lab Expo 2015, PS-059, Elazığ, 01-05 Eylül 2015.

C5. Menevse, E., **Tok, M.**, Sivrikaya, A., Abusoglu, S., Unlu, A., “Relationship of Neutrophil Lymphocyte Ratio in Patients With Acute Myocardial Infarction, 27th National Biochemistry Congress, P-184, Antalya, 3-6 November 2015.

C6. **Tok, M.**, Menevse, E., Sivrikaya, A., Dağlı, M., Sevinç, R., “Retrospektif Gözlemsel Çalışma: Nötrofil, Lenfosit Sayısı ve Nötrofil/Lenfosit Oranının Non-Hodgkin Lenfoma ile İlişkisi” Gebze Teknik Üniversitesi 2. İnovatif Kimya Bilim Öğrenci Kongresi, Gebze, 7 Nisan 2017.

