T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLARLA İLİŞKİLENDİRİLEN BAZI İNFLAMASYON BİYOBELİRTEÇLERİNİN TESPİTİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

GÖZDE FATMA SARICAN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2025

Gözde Fatma SARICAN'ın hazırladığı "Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişkilendirilen Bazı İnflamasyon Biyobelirteçlerinin Tespiti İçin Elektrokimyasal Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:	İmza
Prof. Dr. Hülya YAĞAR	……
Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR	……
Prof. Dr. Fiğen BOZ	……
Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL	……
Dr. Öğr. Üyesi Sevilay İNAL KABALA	……

Tez Savunma Tarihi: 23 / 06 / 2025

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Filiz UMAROĞULLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİMDALI DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

23 / 06/ 2025

Gözde Fatma SARICAN

Doktora Tezi

Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişkilendirilen Bazı İnflamasyon Biyobelirteçlerinin Tespiti İçin Elektrokimyasal Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH'lar) dünya çapında mortalite ve morbiditenin başlıca nedenidir. Bu nedenle erken teşhisi hayati önem taşımaktadır ve erken tespit edildiğinde büyük oranda iyileşme sağlanabilmektedir. Artan bulgular inflamasyonun aterosklerotik kalp yetmezliği, miyokard infarktüsü, perikardiyal hastalıklar gibi birçok KVH'ın gelişiminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. KVH'larda inflamasyonun tespitinde en yaygın kabul gören strateji, dolaşımdaki inflamasyon biyobelirteçlerinin ölçülmesini içermektedir. Büyüme Farklılaşma Faktörü-15 (GDF-15) ve Galektin-3 (Gal-3), KVH'ların erken tanı ve takibinde klinik değeri giderek artan, inflamasyonla ilişkili yeni biyobelirteçlerindendir.

Bu tez çalışmasında GDF-15 ve Gal-3 tespiti için iki adet elektrokimyasal esaslı immünobiyosensör geliştirildi. Çalışma elektrodu olarak GDF-15 biysensörü için katı altın elektrot (KAE), Gal-3 biyosensörü için ise tek kullanımlık indiyum-kalay oksit kaplı polietilen teraftalat (ITO/PET) tabakalar kullanıldı. Biyosensörlerin tasarımında benzer ve az adımlı bir modifikasyon stratejisi izlendi. Bu amaçla her iki biyosensörde çalışma elektrotlarının yüzeyleri farklı yöntemlerle hidroksillendi; KAE yüzeyinde 6-merkaptohekzanol molekülleri ile kendiliğinden oluşan tek tabakalar (self assembled monolayers, SAM'ler), ITO/PET elektrotların yüzeyinde ise kimyasal hidroksilleme ile aktif hidroksil grupları oluşturuldu. Hidroksillenen elektrot yüzeyleri üzerinde aynı silanlama ajanı ile, trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan (TMOHES), fakat farklı sıcaklıklarda epoksi silan SAMs oluşumu sağlandı. Ardından GDF-15 ve Gal-3 biyobelirteçlerine özgü antikorları sırasıyla modifiye edilmiş KAE ve ITO/PET elektrot yüzeylerine kovalent immobilizasyon ile bağlanarak analize hazır hale getirildi.

Geliştirilen biyosensörlerin analitik performansının değerlendirilmesinde, tasarım, optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının takibinde elektrokimyasal impedans spektroskopisi, döngüsel voltametri teknikleri kullanıldı. Yüzey karakterizasyon çalşmaları taramalı elektron mikroskopu (SEM), Enerji dağılımlı X ışını spekstroskopisi (EDX) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizleri ile desteklenerek yüzey modifikasyon başarıları doğrulandı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen ideal koşullarda, GDF-15 biyosensörünün 125 pg/mL-1500 pg/mL tayin aralığında R^2=0.998, LOD=83.8 pg/mL ve LOQ= 254.2 pg/mL değerleri ile; Gal-3 biyosensörünün ise 2.5 ng/mL-40 ng/mL tayin aralığında R^2=0.996, LOD=0.73 ng/mLve LOQ=2.43 ng/mL değerleri ile yüksek doğrusallık ve düşük tespit limiti gösterdiği belirlendi. Her iki sensörün de tekrarlanabilirlik (n=10) ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı ve farklı proteinlerin girişim etkileri belirlendi. Ticari insan serumunda GDF-15 ve Gal-3 analizleri yapılarak matris bileşenlerinin etkisi ve klinikte gerçek serum örneklerine uygulanma potansiyeli değerlendirildi. Gal-3 biyosensörü için, rejenerasyon, analit tayininin farklı bir araştırmacı tarafından gerçekleştirilmesi, depolama süresi tespiti çalışmaları gerçekleştirildi GDF-15 biyosensörünün sabit frekansta impedans (SFI) ölçümü yapıldı ve döngüsel voltametriden yararlanılarak yüzey alanı hesaplandı.

Elde edilen bulgular basit ancak etkili bir yüzey modifikasyon stratejisiyle geliştirilen bu iki etiketsiz impidimetrik immünosensörün düşük örnek hacminde, yüksek tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, duyarlılık ve seçicilik avantajlarıyla, GDF-15 ve Gal-3'ün hassas ve hızlı tespiti için uygun olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle Gal-3 biyosensörü, maliyet açısından etkin tek kullanımlık ve rejenerasyon yeteneğiyle tekrar kullanıma uygun olarak öne çıkmaktadır. Sonuç olarak, geliştirilen biyosensörler, KVH araştırmalarında ve klinik uygulamalarda, inflamasyon odaklı biyobelirteç değerlendirmesi ile hastalık risk sınıflandırması ve yönetimine katkı sunabilir.

Yıl : 2025

Sayfa Sayısı : 254

Anahtar Kelimeler : Büyüme Farklılaşma Faktörü-15 (GDF-15), Galektin-3 (Gal-3), Kardiyavasküler hastalıklar (KVH'lar), elektrokimyasal biyosensör, immünosensör, impidimetrik biyosensör

Ph.D. Thesis

Development of Electrochemical Biosensors for Detection of Some Inflammatory Biomarkers related to Cardiovascular Diseases

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry of Department

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of mortality and morbidity worldwide. Early detection of CVDs is of vital importance, as timely diagnosis can significantly improve clinical outcomes. A growing body of evidence indicates that inflammation plays a significant role in the pathogenesis of many CVDs, including atherosclerosis, hearth failure, myocardial infarction, and pericardial diseases. The most widely accepted strategy for detecting inflammation in CVDs involves measuring circulating biomarkers of inflammation. Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) and Galectin-3 (Gal-3) are new inflammation-related biomarkers that are increasingly valuable in the early diagnosis and follow-up of CVDs.

In this thesis, two electrochemical immunobiosensors were developed for the detection of GDF-15 and Gal-3. A solid gold electrode (SGE) was used as the working electrode for the GDF-15 biosensor, while disposable indium-tin oxide-coated polyethylene terephthalate (ITO/PET) sheets were utilised for the Gal-3 biosensor. In the design of biosensors, a similar and step-efficient surface modification strategy was employed. For this purpose, surfaces of the working electrodes in both biosensors were hydroxylated using different methods; self-assembled monolayers (SAMs) were formed on the SGE surface with 6-mercaptohexanol molecules, while active hydroxyl groups were formed on the surface of ITO/PET electrodes by chemical hydroxylation. Epoxy silane SAMs were formed on the hydroxylated electrode surfaces using the same silanization agent, trimethoxy[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl)ethyl]silane (TMOHES), but at different temperatures. Then, antibodies specific to GDF-15 and Gal-3 biomarkers were immobilized onto the modified KAE and ITO/PET electrode surfaces, respectively.

Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry techniques were used to evaluate the analytical performance of the developed biosensors, and to monitor the design, optimization and characterization studies. The surface modifications were verified by scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Under optimised conditions, the GDF-15 biosensor exhibited a linear range of 125–1500 pg mL^{-1} ($R^2 = 0.998$) with a LOD of 83.8 pg mL^{-1} and a LOQ of 254.2 pg mL^{-1}. The Gal-3 biosensor showed a linear range of 2.5–40 ng mL^{-1} ($R^2 = 0.996$) a LOD of 0.73 ng mL^{-1} and a LOQ.of 2.43ng pg mL^{-1}, demonstrating high linearity and low detection limits. Repeatability (n=10) and reproducibility studies were conducted for both of the sensors and interference effects of various proteins were evaluated. Gal-3 and GDF-15 analyses were performed in commercial human serum to assess matrix effects and the potential applicability of the sensors to real clinical samples. For the Gal-3 biosensor regeneration, inter-user reproducibility and storage stabilityanalyses were carried out. Single-frequency impedance (SFI) measurements were performed for the GDF-15 biosensor, and the electro-active surface area of the sensor was calculated using CV.

The findings demonstrate that these two label-free impedimetric immunosensors, developed through a simple yet effective surface modification strategy, are suitable for the sensitive and rapid detection of GDF-15 and Gal-3 with the advantages such as low sample volume requirement, high repeatability, reproducibility, sensitivity, and selectivity. The Gal-3 biosensor, in particular, stands out as a cost-effective, disposable platform with reusability potential due to its regeneration capability. Consequently, the developed biosensors hold promise for contributing to inflammation-focused biomarker assessment and to the risk stratification and management of CVD in research and clinical practice.

Year : 2025

Number of Pages : 254

Keywords : Growth Differantiation Factor -15 (GDF-15), Galectin-3 (Gal-3), Cardiovascular Diseases, electrochemical biosensor, immunosensor, impidimetric biosensor

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimden bu yana hayatıma dokunan, doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a benzersiz eğitimciliği, yol göstericiliği, bilgi ve deneyimi, sabrı, hoşgörüsü ve tüm emeği için sonsuz teşekkür ederim.

Tez sürecimin her aşamasında bilgi ve tecrübesini paylaşan Dr. adayı Dilek Nur ALTAY'a desteği, katkıları ve kız kardeşliği için içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde yer alan Sayın Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR ve Prof. Dr. Fiğen BOZ'a verdikleri tüm katkı ve destek için teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a, Öğr. Gör. Dr. Alp YÜCEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN'a (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi) katkıları için, her zaman desteklerine başvurabileceğimi bildiğim Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Didem TUNCAY'a, Doç.Dr. Engin ASAV'a (Kırklareli Üniversitesi) ve Dr. Tuğba TUNCELİ'ye teşekkür ederim.

Sevgi ve desteklerinden her zaman güç aldığım ilk öğretmenlerim anne ve babama, tüm aileme ve doktora sürecimin tüm iniş çıkışlarında desteklerini hissettiğim değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Elvin DİNLER'e, Buket BARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi İrem ÇETİNKAYA'ya, Derya İRDEM'e, Emrah ÖZKESER'e ve başta Ebru E. KARACA olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma sabırları ve destekleri için sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TÜBAP 2020/77 numaralı Doktora projesi ve TÜBAP-2024/35 numaralı Analiz desteği projeleri ile desteklenmiştir.

Dedem Galip Gürkan'ın değerli hatırasına…

Gözde Fatma SARICAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xv
ŞEKİLLER DİZİNİ xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ xxii
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 4
GENEL BİLGİLER 4
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Epidemiyolojisi 4
2.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda İnflamasyonun Rolü 12
2.2.1. İnflamasyon 13
2.2.2. Kalp Hasarında İnflamasyon 20
2.2.3. Aterosklerozda İnflamasyon 24
2.2.3.1. Aterosklerozda Plak Oluşumu 26
2.3. Kardiyovasküler Hastalıklarda İnflamasyon Biyobelirteçleri 31
2.3.1. Büyüme Farklılaşma Faktörü-15 (GDF-15) Proteini 38
2.3.2. Galektin-3 Proteini 43
2.4. Biyosensörler 50
2.4.1. İmmünosensörler 52
2.4.2. Elektrokimyasal Biyosensörler 53
2.4.2.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EİS) 55

2.4.2.2. Döngüsel Voltametri (CV) 58
2.4.2.3. Sabit Frekansta Impedans (SFI) Ölçümü 60
2.4.3. Bu Tez Kapsamında Biyosensör Fabrikasyonunda Kullanılan İmmobilizasyon Stratejileri ve Elektrotlara Genel Bakış 61
2.4.3.1.Katı altın elektrotlar 62
2.4.3.2. ITO/PET Elektrotlar 63
2.4.3.3. İmmobilizasyon ve Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar 65
2.5. Kardiyovasküler Hastalıkların Erken Teşhisinde Biyosensörler 73
2.5.1. Literatürde GDF-15 Analizi İçin Geliştirilmiş Biyosensörler 74
2.5.2. Literatürde Gal-3 Analizi için Geliştirilmiş Biyosensörler 76
BÖLÜM 3 79
MATERYAL ve YÖNTEM 79
3.1. Materyal 79
3.1.1. Kardiyovasküler İnflamasyon Biyosensörlerinin Tasarımında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler 79
3.1.1.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı 81
3.1.2. Kardiyovasküler İnflamasyon Biyosensörlerinin Tasarımında Kullanılan Cihazlar 82
3.1.3. Elektrokimyasal Ölçümlerin Parametreleri 83
3.2. Yöntem 83
3.2.1. GDF-15 Biyosensörü 83
3.2.1.1. GDF-15 Biyosensörünün Hazırlanması ve Ölçüm Prensibi 83
3.2.1.1.1. Katı altın elektrotların temizlenmesi 83
3.2.1.1.2. KAE yüzeyinde SAM'lerin oluşumu 84
3.2.1.1.3. Anti-GDF15 immobilizasyonu ve GDF-15 biyosensörünün tasarım stratejisi 85

3.2.1.1.4. GDF-15 biyosensörü ile kantitatif analiz ve elektrokimyasal ölçümlerin parametreleri 86
3.2.1.2. GDF-15 Biyosensörünün Optimizasyon Adımları 89
3.2.1.2.1. 6-MHL Konsantrasyonunun Optimizasyonu 90
3.2.1.2.2. TMOHES Konsantrasyonunun Optimizasyonu 90
3.2.1.2.3. Anti-GDF15'in Konsantrasyonunun Optimizasyonu 91
3.2.1.2.4. Anti GDF-15'in İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu 91
3.2.1.2.5. GDF-15'in İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu 91
3.2.1.3. GDF-15 Biyosensörünün Analitik Karakterizasyon Çalışmaları 92
3.2.1.3.1. GDF-15 Biyosensörünün Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 92
3.2.1.3.2. GDF-15 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği 93
3.2.1.3.3. GDF-15 biyosensörünün tekrarlanabilirliği 93
3.2.1.3.4. GDF-15 biyosensörünün seçicilik çalışmaları 93
3.2.1.3.5. GDF-15 biyosensörünün sabit frekansta impedans (SFI) analizi 94
3.2.1.3.6. GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulaması 94
3.2.1.4. GDF-15 Biyosensörünün Yüzey Karakterizasyonu 95
3.2.1.4.1. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı hesaplamaları 95
3.2.1.4.2. Taramalı elektron mikroskobu SEM ve FTIR analizi 95
3.2.2. Gal-3 Biyosensörü 96
3.2.2.1. Gal-3 Biyosensörü Hazırlanması ve Ölçüm Prensibi 96
3.2.2.1.1. ITO-PET elektrot hazırlığı ve temizliği 96
3.2.2.1.2. ITO elektrot yüzeyinde aktif hidroksil gruplarının biriktirilmesi 96
3.2.2.1.3. TMOHES ile SAMs oluşumu 96
3.2.2.1.4. Anti-Gal3 immobilizasyonu ve Gal-3 biyosensörünün tasarım stratejisi 97
3.2.2.1.5. Gal-3 biyosensörü ile kantitatif analiz ve elektrokimyasal ölçümlerin parametreleri 98

3.2.2.2. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının optimizasyonu. 99
3.2.2.2.1. TMOHES konsantrasyonunun optimizasyonu 100
3.2.2.2.2. Anti Gal-3 konsantrasyonunun optimizasyonu 100
3.2.2.2.3. Anti Gal-3 inkübasyon süresinin optimizasyonu 101
3.2.2.2.4. Gal-3 inkübasyon süresinin optimizasyonu 101
3.2.2.3. Gal-3 Biyosensörünün Analitik Karakterizasyon Çalışmaları 102
3.2.2.3.1. Gal-3 biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 102
3.2.2.3.2. Gal-3 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği 102
3.2.2.3.3. Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirliği 103
3.2.2.3.4. Gal-3 biyosensörünün seçiciliği 103
3.2.2.3.5. Gal-3 biyosensörünün insan serumunda uygulaması 103
3.2.2.3.6. Gal-3 biyosensörünün depolama kararlılığı 104
3.2.2.3.7. Gal-3 biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (Rejenerasyonu) 104
3.2.2.4. Gal-3 Biyosensörünün yüzey karakterizasyonu 105
BÖLÜM 4 106
SONUÇLAR 106
4.1. GDF-15 Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensör ile Elde Edilen Bulgular 106
4.1.1. GDF-15 Biyosensörünün Üretim Sürecinde Elde Edilen Bulgular 106
4.1.2. GDF-15 Biyosensörünün Optimizasyon Adımlarına İlişkin Bulgular 112
4.1.2.1. 6-MHL Molekülünün Optimum Konsantrasyonu 112
4.1.2.2. TMOHES Molekülünün Optimum Konsantrasyonu 114
4.1.2.3. Anti GDF-15 Optimum Konsantrasyonu 116
4.1.2.4. Optimum Anti-GDF15 İnkübasyon Süresi 117
4.1.2.5. GDF-15 Optimum İnkübasyon Süresi 119
4.1.3. GDF-15 Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular 121
4.1.3.1. GDF-15 Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı 121

4.1.3.2. GDF-15 Biyosensörünün Tekrar Üretilebilirliği 124
4.1.3.3. GDF-15 Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği 125
4.1.3.4. GDF-15 Biyosensörünün Seçiciliği 126
4.1.3.5. GDF-15 Biyosensörünün Sabit Frekanstaki İmpedans (SFI) Analizi ... 127
4.1.3.6. GDF-15 Biyosensörünün İnsan Serumunda Uygulaması 128
4.1.3.7. GDF-15 Biyosensörünün Yüzey Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular 130
4.1.3.7. 1. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı hesaplamaları 130
4.1.3.7.2. GDF-15 biyosensörünün taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri 131
4.1.3.7.3. GDF-15 biyosensörünün enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDX) sonuçları 133
4.1.3.7.4. GDF-15 biyosensörünün fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) sonuçları 139
4.2. Gal-3 Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensör ile Elde Edilen Bulgular 141
4.2.1. Gal-3 Biyosensörünün Üretim Sürecinde Elde Edilen Bulgular 141
4.2.2. Gal-3 Biyosensörünün Optimizasyon Adımlarına İlişkin Bulgular 147
4.2.2.1. TMOHES Molekülünün Optimum Konsantrasyonu 147
4.2.2.2. Anti Gal-3 Optimum Konsantrasyonu 148
4.2.2.3. Optimum Anti-Gal3 İnkübasyon Süresi 150
4.2.2.4. Optimum Gal-3 Analit Proteininin İnkübasyon Süresi 152
4.2.3. Gal-3 Biyosensörünün Karakterizasyonun İlişkin Bulgular 153
4.2.3.1. Gal-3 Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı 154
4.2.3.2. Gal-3 Biyosensörünün Tekrar Üretilebilirliği 157
4.2.3.2.1 Farklı bir çalışmacı tarafından yapılan tekrar üretilebilirlik çalışması 158
4.2.3.3. Gal-3 Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği 160
4.2.3.4. Gal-3 Biyosensörünün Seçiciliği 161

24.2.3.5. Gal-3 Biyosensörünün İnsan Serumunda Uygulaması 162
4.2.3.6. Gal-3 Biyosensörünün Depolama Kararlılığı..... 163
4.2.3.7. Gal-3 Biyosensörünün Tekrar Kullanılabilirliği (Rejenerasyon)..... 165
4.2.3.8. Gal-3 Biyosensörünün Yüzey Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular 167
4.2.3.8.1. Gal-3 biyosensörünün taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri 167
4.2.3.8.2. Gal-3 biyosensörünün enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi (EDX) sonuçları 169
4.2.3.8.3. Gal-3 biyosensörünün fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) sonuçları 176
BÖLÜM 5..... 178
TARTIŞMA..... 178
KAYNAKLAR 194
ÖZGEÇMİŞ 231

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti-Gal3	Galektin-3 Antikoru
Anti-GDF15	Büyüme Farklılaşma Faktörü 15 Antikoru
Au	Altın
BSA	Sığır serum albümini
BNP	Beyin natriüretik peptid
CV	Döngüsel voltametri
CANTOS	Canakinumab Anti-inflamatuar Tromboz Outcomes Çalışması
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler paternler
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDX	Enerji dağılımlı X ışını spekstroskopisi
EİS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ECM	Ekstrasellüler Matriks
Gal-3	Galektin-3
GBD	Küresel hastalık yükü
GDF-15	Büyüme Farklılaşma Faktörü 15
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
hs-CRP	Yüksek duyarlıklı C-reaktif proteini
İKH	İskemik kalp hastalığı
ITO-PET	İndiyum Kalay Oksit- Polietilen Teraftalat
KVH	Kardiyovasküler Hastalık
KY	Kalp Yetmezliği
LOD	Algılama limiti-Tespit limiti
LOQ	Tayin limiti
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MI	Miyokard infarktüsü
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
NLRP3	NOD benzeri reseptör proteini 3

pg	pikogram
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler paternler
ng	nanogram
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SFI	Sabit frekansta impedans
TMOHES	Trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan
TLR	Toll benzeri reseptörler
VCAM-1	Vasküler Adhezyon Molekülü-1
6-MHL	6-merkaptohekzanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 1980-2020 yılları arası KVH'lardan kaynaklanan ölüm sayılarında küresel eğilimler 5
Şekil 2.2. 1980-2021 yılları arası hastalıklardan kaynaklanan ölüm sayılarında küresel eğilimler 6
Şekil 2.3. Kardiyovasküler hastalık çeşidine göre ölüm oranları 10
Şekil 2.4. KVH'lar için önde gelen risk faktörleri 11
Şekil 2.5. İnflamatuar yanıtların şematik gösterimi 17
Şekil 2.6. Doğal bağışıklık sisteminin kalp hasarına verdiği yanıt 21
Şekil 2.7. Aterosklerotik plak gelişimi 27
Şekil 2.8. Aterosklerotik plak oluşumu 29
Şekil 2.9. Aterosklerotik KVH'larda plak gelişimi 30
Şekil 2.10. Galektin-3 ve GDF-15 aterosklerozda etkileri 31
Şekil 2.11. KY riski biyobelirteçleri 36
Şekil 2.12. Akut koroner sendromun çeşitli patolojik aşamalarında biyobelirteçler 38
Şekil 2.13. GDF-15 proteininin kristal yapısı 39
Şekil 2.14. GDF-15'in sentezi, olgunlaşması ve salınımı 40
Şekil 2.15. Galektinlerin yapısı 44
Şekil 2.16. Gal-3'ün protein yapısı 45
Şekil 2.17. İnsan Gal-3'ün CRD'ine ait yüksek çözünürlüklü X-ışını kristal yapısı 45
Şekil 2.18. Gal-3 ve ateroskleroz ile ilişkili hücrelere etkisi 49
Şekil 2.19. Bir elektrokimyasal biyosensörün şeması 51
Şekil 2.20. Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre sisteminin şematik diyagramı 54
Şekil 2.21. İmpedansın akım-zaman ve voltaj-zaman bağımlı gösterimi 56
Şekil 2.22. Randles devresiyle Nyquist diyagramı 57
Şekil 2.23. (a) Döngüsel potansiyel taraması, (b) Elde edilen voltammogram 60
Şekil 2.24. A) Optimum frekans belirlenmesi için Bode grafiği B) Sabit frekans impedans ölçümü 61

Şekil 2.25. Altın yüzeyde SAM oluşumunun gösterimi 66
Şekil 2.26. Alkoksisilanların reaksiyon prosesi 69
Şekil 2.27. a) Trifonksiyonel silanlama ajanının yapısı b) hidroksilasyonu c) hidroksillenmiş yüzeyde silanlama ajanı bağlanma ihtimallerinin üç örneği 70
Şekil 2.28. TMOHES molekülünün kimyasal yapısı 71
Şekil 2.29. ITO substrat yüzeyinde (3-glisidoksipropil)trimetoksisilan SAM oluşumu ve antikor immobilizasyonunu 72
Şekil 3.1. GDF-15 biyosensörünün tasarım adımları 86
Şeki 3.2. GDF-15 biyosensörü ile GDF-15'in kantitatif analizi 87
Şekil 3.3. Nyquist grafiğinden Rct değerinin hesaplanması 88
Şekil 3.4. Rct değeri hesaplama tablosu 88
Şekil 3.5. Gal-3 biyosensörünün tasarım stratejisi 98
Şekil 3.6. Gal-3 biyosensörü ile Gal-3 proteininin analizi 98
Şekil 4.1a. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları 107
Şekil 4.1b. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları 107
Şekil 4.1c. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinin sütun grafiği 109
Şekil 4.2. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm eğrileri 112
Şekil 4.3. Farklı 6-MHL konsantrasyonlarının GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi 113
Şekil 4.4. Farklı TMOHES konsantrasyonlarının GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi 115
Şekil 4.5. Farklı Anti-GDF15 konsantrasyonlarının GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi 117
Şekil 4.6. Farklı Anti-GDF15 inkübasyon sürelerinin GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi 118
Şekil 4.7. GDF-15'in farklı inkübasyon sürelerinde bekletilmesinin biyosensör yanıtına etkisi 120
Şekil 4.8. GDF-15 biyosensörünün 125-1500 pg/mL tayin aralığındaki Nyquist eğrileri 122

Şekil 4.9. GDF-15 biyosensörünün 125-1500 pg/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları 122
Şekil 4.10. GDF-15 biyosensörünün kalibrasyon grafiği 123
Şekil 4.11. GDF-15 biyosensörünün seçicilik çalışmaları grafiği 126
Şekil 4.12. GDF-15 biyosensörünün BSA inkübasyonu sonrası Bode grafiği 127
Şekil 4.13. GDF-15 biyosensörünün SFI analizine ait grafik 128
Şekil 4.14. GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulamasının kalibrasyon grafiği 129
Şekil 4.15. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ve analite ait SEM görüntüleri 132
Şekil 4.16.a1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-Yalın Elektrot) 133
Şekil 4.16.a2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-Yalın Elektrot) 134
Şekil 4.16.b1 GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-6MHL) 134
Şekil 4.16.b2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL) 135
Şekil 4.16.c1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan Spektrumları (Au-6MHL-TMOHES) 135
Şekil 4.16.c2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL-TMOHES) 136
Şekil 4.16.d1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15) 136
Şekil 4.16.d2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15) 137
Şekil 4.16.e1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15-BSA) 137
Şekil 4.16.e2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15-BSA) 138
Şekil 4.17a. GDF-15 biyosensörünün 6-MHL ve TMOHES immobilizasyonu sonrası FTIR spektrumları 139

Şekil 4.17b. GDF-15 biyosensörünün 6-MHL, TMOHES ve Anti-GDF15 immobilizasyonu sonrası FTIR spektrumları 140
Şekil 4.18a. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları 142
Şekil 4.18b. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları 142
Şekil 4.18c. Gal-3 biyosensörünün yalın elektrot impedans spektrumu 143
Şekil 4.18d Gal-3 biyosensörünün yalın elektrot döngüsel voltamogramı 143
Şekil 4.18e. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinin sütun grafiği 144
Şekil 4.19. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm eğrileri 146
Şekil 4.20. Farklı TMOHES konsantrasyonlarının Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi 148
Şekil 4.21. Farklı Anti-Gal3 konsantrasyonlarının Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi 149
Şekil 4.22. Farklı Anti-Gal3 inkübasyon sürelerinin Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi 151
Şekil 4.23 Farklı Gal-3 inkübasyon sürelerinin Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi .. 152
Şekil 4.24a. Gal-3 analitinin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki Nyquist eğrileri 154
Şekil 4.24b. Gal-3 analitinin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları 155
Şekil 4.25. Gal-3 biyosensörünün 2.5-40 ng/mL tayin aralığına ait standart grafik 156
Şekil 4.26. Gal-3 biyosensörünün 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki tekrar üretilebilirliği 157
Şekil 4.27. Gal-3 biyosensörünün farklı bir çalışmacı tarafından gerçekleştirilen 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon grafiği 159
Şekil 4.28. Gal-3 biyosensörünün seçicilik çalışması 162
Şekil 4.29. Gal-3 biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ait standart grafik. 163
Şekil 4.30. Gal-3 biyosensörünün depolama kararlılığına ait grafik 165
Şekil 4.31. Gal-3 biyosensörü tekrar kullanılabilirliğine ait grafik 166

Şekil 4.32. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ve analite ait SEM görüntüleri 168
Şekil 4.33.a1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Yalın ITO-PET) 169
Şekil 4.33a2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Yalın ITO-PET) 170
Şekil 4.33b1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH) 170
Şekil 4.33b2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH) 171
Şekil 4.33c1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH-TMOHES) 171
Şekil 4.33c2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH-TMOHES) 172
Şekil 4.33d1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3) 172
Şekil 4.33.d2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3) 173
Şekil 4.33e1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA) 173
Şekil 4.33e2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA) 174
Şekil 4.33f1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA/Gal3) 174
Şekil 4.33f2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA/Gal3) 175
Şekil 4.34. Gal-3 biyosensörünün TMOHES ve Anti-GAL3 immobilizasyonu sonrası FTIR sonucu 176

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kardiyovasküler hastalık çeşitleri ve komplikasyonları 8
Çizelge 4.1. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerleri 108
Çizelge 4.2. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri 112
Çizelge 4.3. 6-MHL konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 114
Çizelge 4.4. TMOHES konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 115
Çizelge 4.5. Anti-GDF15 konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 117
Çizelge 4.6. Anti-GDF15 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 118
Çizelge 4.7. GDF-15 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 120
Çizelge 4.8. GDF-15 biyosensörünün optimum çalışma koşulları 121
Çizelge 4.9. GDF-15 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 124
Çizelge 4.10. GDF-15 Biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçları 125
Çizelge 4.11. GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulaması sonuçları 130
Çizelge 4.12. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı değerleri 131
Çizelge 4.13. Gal-3 biyosensörünün immobilasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerleri 144
Çizelge 4.14. İmmobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri 146
Çizelge 4.15. TMOHES konsantrasyonu optimizasyonu çalışmasında elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 148

Çizelge 4.16. Anti-Gal3 konsantrasyonu optimizasyonu çalışmasından elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 149
Çizelge 4.17. Anti-Gal3 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 151
Çizelge 4.18. Gal-3 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 152
Çizelge 4.19. Gal-3 biyosensörünün geliştirilmesinde belirlenen optimum çalışma koşulları 153
Çizelge 4.20. Gal-3 biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik çalışmalarının doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları 158
Çizelge 4.21. Gal-3 biyosensörünün farklı bir çalışmacı tarafından gerçekleştirilen Gal-3 ölçümlerinin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki ΔRct değerleri 159
Çizelge 4.22. Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirlik ölçümlerine ilişkin sonuçlar.... 160
Çizelge 4.23. Gal-3 biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ilişkin sonuçlar 163
Çizelge 4.24. Gal-3 biyosensörünün depolama kararlılığı verileri 164
Çizelge 4.25. Gal-3 biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik verileri 166
Çizelge 5.1. Literatürde bulunan GDF-15 biyosensörleri ile karşılaştırma 189
Çizelge 5.2. Literatürde bulunan Gal-3 biyosensörleri ile karşılaştırma 190

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH'lar), koroner arter hastalığı, inme, kalp yetmezliği, aritmiler gibi durumları kapsayan, her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olan ve tıbbi ilerlemelere rağmen küresel çapta ölüm nedenleri arasında birinci sırada olmaya devam eden bir hastalık grubudur (DSÖ, 2019). Bu nedenle KVH'ların önlenmesi, teşhis edilmesi ve yönetilmesi günümüzün en öncelikli küresel sağlık sorunlarından biri olarak görülmektedir (Krumholz vd., 2024). Kardiyovasküler durumların erken teşhisi ve etkili yönetimi, hasta sonuçlarını iyileştirmede, morbitide ve mortaliteyi azaltmada kritik bir öneme sahiptir. Bu bağlamda, tanı ve tedavi stratejilerinin etkinliğini artırmak, hastalığın seyrini daha iyi yönetebilmek ve yeni hedefler geliştirmek amacıyla daha hassas ve özgün biyobelirteçlere olan ihtiyaç giderek artmaktadır (Nambi, 2018). Ölçülebilir biyolojik göstergeler olan biyobelirteçler, KVH'ların da teşhisi, prognozu ve risk değerlendirmesinde temel araçlar haline gelmiştir (Parhi vd., 2025).

Kardiyovasküler hastalık terimi kalp ve dolaşım hastalıklarının tümünü içeren şemsiye bir terim olarak; koroner kalp hastalığı başta olmak üzere ateroskleroz, kalp yetmezliği, inme, atriyal fibrilasyon, vasküler demans gibi doğuştan (konjenital) aktarımsal olan ve sonradan gelişen (edinsel) hastalıkları kapsamaktadır (İngiliz Kalp Vakfı, 2025). Kardiyovasküler fizyopatoloji, inflamatuvar, genetik, nörohormonal ve biyokimyasal yolların karmaşık etkileşimini içermektedir (Libby vd., 2019).

Bugün dünya genelinde yaklaşık 640 milyon kişi kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarıyla yaşamaktadır. Bu artış, risk faktörleri olarak nitelendirilen olumsuz yaşam tarzı değişiklikleri, yaşlanan ve çoğalan nüfus, kalp krizi ve inme gibi kardiyovasküler olaylar sonrası tıbbi tedavilerdeki ilerlemelerle birlikte artan sağkalım oranları ile ilişkilidir ve bu trend değişmedikçe artmaya devam edecektir (İngiliz Kalp Vakfı, 2025).

KVH gelişiminde, yaşam boyunca risk faktörlerine (diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite vb.) maruz kalmanın kümülatif etkisi belirleyici bir rol oynamaktadır (Libby vd., 2019). Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde obezite gibi hastalıkların salgın kadar etkili hızda artışı, KVH artışına belirgin bir tehdit olmaya devam ederek bu hastalıkların kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır.

Küresel Hastalık Yükü İşbirliği'nin, 2019 yılında yayımladığı verilerde KVH'ların dünya genelinde 523 milyondan fazla kişiyi etkilediğini ve yıllık yaklaşık 18 milyon ölüme neden olduğunu raporlamıştır (Roth vd., 2020). Bu ölümlerin %85'inden fazlasının aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklandığı bildirilmiştir. Ateroskleroz, ölüm ve sakatlıkların baskın nedeni olan kronik bir KVH olarak öne çıkmakta olup, inflamasyon bu hastalığın başlangıcından komplikasyonlara kadar tüm süreçte oldukça etkin rol oynamaktadır (Libby vd., 2019). Bu rakamsal veriler, KVH'ların nedenlerini anlamanın ve etkili teşhis-tedavi stratejileri geliştirmenin aciliyetini ortaya koymaktadır.

Kardiyak durumların erken dönemde tespiti, zamanında müdahaleye olanak sağlayarak hasta sonuçlarını anlamlı biçimde iyileştirebilir. Ancak EKG ve görüntüleme gibi geleneksel tanı araçları, hastalığın erken evrelerinde her zaman yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmayabilir. Bu noktada, patofizyolojik süreçler hakkında bilgi sağlayan biyobelirteçler, erken tanıda, hastalık takibinde ve tedavi yanıtının öngörülmesinde önemli bir rol üstlenmektedir (Parhi vd., 2025). Artırılmış duyarlılık, hızlı tespit, patofizyolojik bilgi, yüksek özgüllük, risk sınıflandırması, noninvazivlik, gelişmiş izleme ve yapay zekâ entegrasyonu gibi avantajlar, KVH yönetiminde inflamasyon temelli kardiyak biyobelirteçlerin geleneksel yöntemlere göre ön plana çıkmasını sağlamaktadır. İnflamasyon kalp yetmezliğinin çeşitli formlarının gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar, bu nedenle kalp yetmezliği (KY)'nde inflamasyon biyobelirteçleri kapsamlı araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Braunwald, 2008). Bu nedenlerle, kardiyovasküler risk değerlendirmesinde inflamasyon temelli biyobelirteçlerin incelenmesi hem hastalığın erken evrede belirlenmesi hem de hasta yönetimi stratejilerinin kişiselleştirilmesi adına giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Parhi vd., 2025). Klinik pratiğe yerleşmiş geleneksel biyobelirteçler bulunmaktadır, örneğin natriüretik peptidler (NP), erişim kolaylığı ve maliyet etkinliği gibi sebeplerle KY'nin tanı ve yönetiminde geniş çapta benimsenmiştir. Benzer şekilde kardiyak troponinler (cTnI, cTnT) de miyokard infarktüsünde (MI) spesifik ve hassas belirteçler olarak kabul

edilir. C-reaktif protein (CRP) ise, sistemik inflamasyon belirteci olarak kardiyovasküler risk değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kayani vd., 2024).

Biyobelirteçler, yalnızca klasik göstergeler olan kolesterol ve diğer biyolojik bileşenlerin belirlenmesinin ötesine geçerek, moleküler, genetik ve proteomik düzeyde çok daha kapsamlı bir değerlendirme imkânı sunmaktadır. KVH'larla ilişkili troponinler, natriüretik peptitler ve CRP gibi yaygın kullanılan belirteçlerin yanı sıra, son yıllarda moleküler tanı tekniklerindeki ilerlemeler yeni biyobelirteçlerin keşfini de mümkün kılmıştır. Yeni nesil biyobeliteçler teşhis doğruluğunu, prognostik değerlendirmeyi ve risk sınıflandırılmasını geliştirmektedir. Bunların arasından Büyüme Farklılaşma Faktörü-15 (GDF-15), Galektin-3 (Gal-3) ve ST2 gibi protein yapılı yeni inflamasyon biyobelirteçler ve mikro-RNA'lar (miRNA), özellikle KVH'ların tanı ve prognoz süreçlerinde umut vadeden adaylar arasında yer almaktadır (Abubakar vd., 2024; Eltelbany vd., 2022; Kayani vd., 2024). Örneğin KY'de GDF-15 gibi yeni biyobelirteçler üstün duyarlılık ve özgüllük sunan umut verici sonuçlar vermektedir (Elsewify vd., 2022; Schwarz vd., 2023).

Bu ilerlemelere rağmen bu biyobelirteçlerin klinikte kullanımı, sınırlı erişim, yüksek analiz maliyetleri, çeşitli hasta popülasyonlarında daha fazla validasyon ihtiyacı gibi aşılması gereken zorlukları taşımaktadır. Bu zorlukları aşabilmek için, biyobelirteçleri düşük maliyetle, hızlı, özgül ve hassas bir şekilde tespit edebilecek ileri teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır (Parhi vd., 2025). Elektrokimyasal esaslı biyosensörler, küçük örnek hacmi, kısa analiz süresi, taşınabilirlik ve yüksek duyarlılık gibi avantajlarıyla bu ihtiyaca yanıt verme potansiyeline sahiptir.

Bu tez çalışmasında, inflamatuar kardiyak biyobelirteçlerden Gal-3 ve GDF-15'in tespitine yönelik, elektrokimyasal tabanlı biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi amaçlamıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Epidemiyolojisi

Kardiyovasküler sistem, organizmanın hayati sıvısı olan kanın kalp tarafından pompalanarak vücutta damarlar aracılığıyla tüm vücudu dolaşmasını sağlayan sistemdir. Bu sistemin üç ana bileşeni kalp, kan ve damarlardır. Dolaşım sisteminin merkezi organı ve vücuttaki en hayati organ olan kalp, kaslı yapısıyla bir pompa görevi görerek, damarlar aracılığıyla, büyük dolaşım ve küçük dolaşım ile kanın vücutta dolaşımının sürekliliğini sağlar. Kardiyovasküler sistemin işlevselliğinde yaşanan herhangi bir aksama veya patolojik bozukluk genel olarak kardiyovasküler hastalık (KVH) adı altında değerlendirilmektedir (Zipes, 2018)

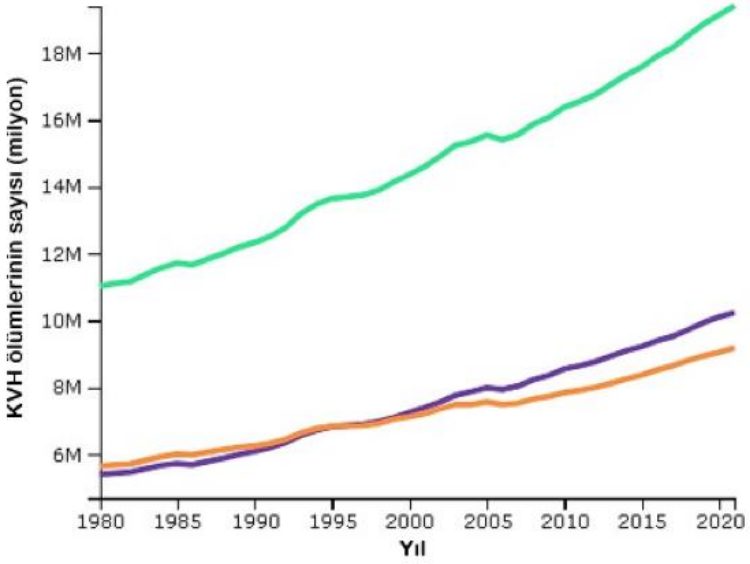
KVH, kalbi ve kan dolaşım sistemini etkileyen doğuştan ya da edinsel tüm kalp ve damar hastalıklarını kapsayan genel bir terimdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, 2019 yılında dünya çapında tahmini 17.9 milyon kişinin KVH nedeniyle yaşamını yitirdiği ve bu rakamın dünya çapındaki toplam ölümlerin %32'sine karşılık geldiği bildirilmiştir. KVH'lara bağlı ölümlerin %85'i kalp krizi (miyokard infarktüsü) ve inme (serebrovasküler olaylar) nedenlidir (DSÖ, 2021).

Dünya Kalp Federasyonu tarafından yayımlanan "Dünyanın Bir Numaralı Katiliyle Yüzleşmek" başlıklı Dünya Kalp Raporu (2023)'na göre, 2021 yılında kardiyovasküler hastalıklar yaklaşık 20.5 milyon ölümden sorumlu olmuştur, bu önceki yıllardaki gibi dünya çapındaki ölümlerin yaklaşık üçte birine karşılık gelmeye devam etmektedir. Bu sayının 2030 yılında 23 milyona, 2050 yılına kadar ise 32.3 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (Séverin vd., 2022). Ölümlerin yanı sıra, dünya çapında KVH'larla yaşayan yarım milyardan fazla (≈640 milyon) kişi bulunmaktadır. Küresel

olarak her 12 kişiden 1'ine karşılık geldiği tahmin edilen bu sayı, değişen yaşam tarzı, artan ve yaşlanan nüfus, gelişmiş ülkelerde kalp krizi ve inmeye karşı sağkalım oranlarının artması gibi faktörlere bağlı olarak yükselmekte olup, bu eğilimler devam ettikçe önümüzdeki yıllarda artacağı beklenmektedir (İngiliz Kalp Vakfı, 2025).

KVH'lar Türkiye özelinde değerlendirildiğinde, Türkiye İstatistik Kurumu (2024) verilerine göre, 2023 yılında ülkemizde dolaşım sistemi hastalıkları kaynaklı ölümler tüm ölüm nedenleri arasında %33.4 oranı ile ilk sırada yer almıştır. Bu ölümlerin %42.4'ünün iskemik kalp hastalıkları (koroner kalp hastalıkları), %24.1'inin diğer kalp hastalıkları ve %18.6'sının serebro-vasküler hastalıklar kaynaklı olduğu görülmektedir.

Washington Üniversitesi Sağlık Ölçütleri ve Değerlendirme Enstitüsü (IHME) yürütücülüğünde gerçekleştirilen Küresel Hastalık Yükü (GBD) çalışmasından 1980-2020 yılları arası verileri kullanılarak hazırlanan, KVH'lardan kaynaklanan ölüm oranlarının yıllara göre değişimi Şekil 2.1'de gösterilmektedir (Global Burden of Disease Collaborative Network., 2024).

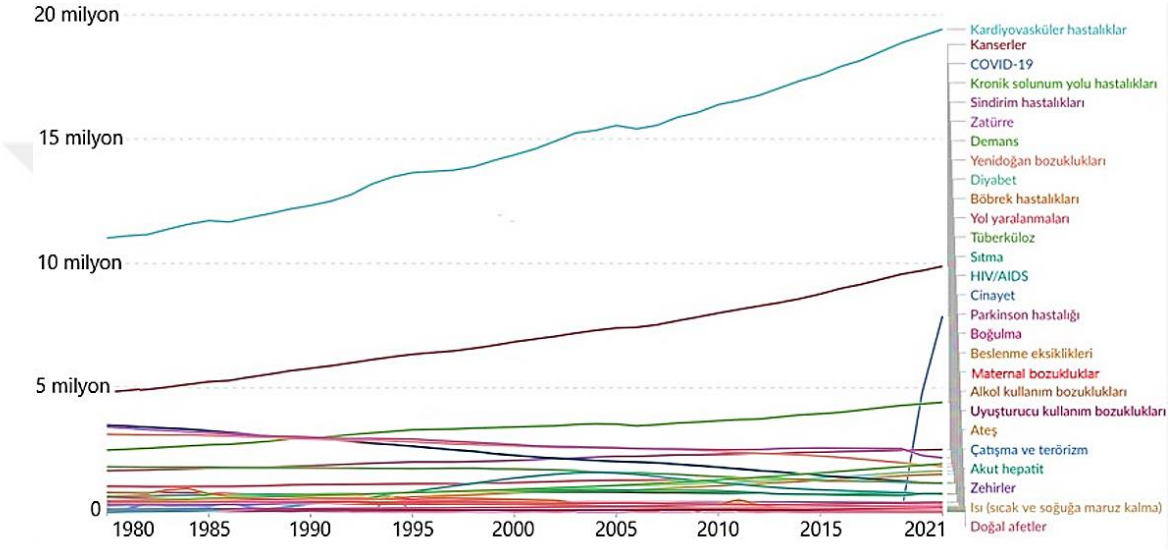


Şekil 2.1. 1980-2020 yılları arası KVH'lardan kaynaklanan ölüm sayılarında küresel eğilimler (Mor eğri: erkek, turuncu eğri: kadın, yeşil eğri: tüm ölüm sayılarını ifade etmektedir) (Global Burden of Disease Collaborative Network., 2024).

GBD verilerine göre, 1990 yılında toplam tahmini ölüm sayısı ortalama 12.1 milyon olup, kadınlar ve erkekler arasında hemen hemen eşit dağılım göstermekte iken, 2019 itibarıyla toplam ölüm sayısının erkeklerde 9.6 milyon ile kadınlarda 8.9 milyon olmak üzere belirgin bir artışla toplam 18.6 milyona ulaşmıştır (Global Burden of Disease

Collaborative Network., 2024). Veriler, erkeklerde KVH'lara bağlı ölüm oranlarında artış eğiliminin kadınlara kıyasla bir miktar daha fazla olduğunu göstermektedir. 2021 verilerine göre, erkeklerde yaşam kaybı sayısının kadınlara oranla %12 daha fazla olduğu bildirilmiştir (*Program in Cardiovascular Health Metrics*, 2024).

Şekil 2.2'de GBD çalışması verilerinden elde edilen 1980-2021 yılları arası hastalıklardan kaynaklanan ölüm sayılarındaki küresel eğilimler gösterilmektedir. Bu veriler KVH'ların küresel büyüklüğünü çarpıcı bir biçimde ortaya koymaktadır.



Şekil 2.2. 1980-2021 yılları arası hastalıklardan kaynaklanan ölüm sayılarında küresel eğilimler (Global Burden of Disease Collaborative Network., 2024; Dattani vd., 2023)

Dünya genelinde kalp krizi ve inmelerin çok büyük bir oranı erken (70 yaş altı) kalp krizi ve inmelerdir ve bunların da %80'e yakın kadarı önlenebilir niteliktedir (Dünya Kalp Raporu, 2023). Son 40 yılda, Amerika, Avrupa ve Japonya gibi gelişmiş coğrafyalarda KVH nedenli ölümlerde önemli düşüşler görülmekte iken (Banerjee & Asrress, 2018), gelişmekte olan ya da orta ve düşük gelirli ülkelerde ölüm oranları giderek artmaktadır (Roth vd., 2020). Bu durum uygun önleme stratejileri ve erken tedavi yaklaşımlarının KVH'lar üzerindeki olumlu etkisinin ve önlenebilirliğinin açık bir göstergesidir.

KVH riski ve yükü küresel düzeyde artmaya devam ederken, sağlık hizmetlerine erişim ve yaşam beklentisi açısından ciddi eşitsizlikleri de beraberinde getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (2019) verilerine göre en zengin ve en yoksul ülkeler arasında

ortalama yaşam süresi beklentisi farkı 18.1 yıldır. Bu derece ölümcül, hastalık ve ekonomik yükü büyük hastalıkların risklerinin saptanması, tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve hastalık önlemleri için gerçekleştirilen medikal çalışmalar ve bunun yanı sıra risk faktörlerinin belirlenmesi, değerlendirilmesi, stratejiler ve sosyal politikalar geliştirilmesi yönünde küresel çapta yoğun bir çaba sarf edilmektedir. Bunlardan biri olan ve 2016 yılında DSÖ ile Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) tarafından başlatılan "Global Hearts" inisiyatifi, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde KVH riskini azaltmayı hedeflemektedir. Bu program, tütün kullanımı ve tuz tüketiminin azaltılması gibi halk sağlığı temelli müdahaleleri teşvik etmekte, KVH yönetimini birincil basamak sağlık hizmetleri ile güçlendirmeyi amaçlamaktadır (Libby vd., 2019).

Son olarak, Covid-19 pandemisi nedeniyle 2020'den bu yana, özelikle karantina döneminde, dolaşım sistemi hastalıkları ve diğer birçok kronik hastalık için sunulan acil ve acil olmayan sağlık hizmetlerinde yaşanan gecikmeler gibi aksaklıklar meydana gelmiştir (OECD/Avrupa Birliği, 2022). Ayrıca Covid-19 enfeksiyonunlarının da dolaşım sistemi hastalıkları riskini arttırabileceği gösterilerek, pandeminin uzun vadede dolaşım sistemi hastalıklarına yönelik bakım talebini ve tedavi yükünü artırabileceği belirtilmiştir (Katsoularis vd., 2021).

Kardiyovasküler hastalıklar kalp damar sisteminin farklı anatomik yapılarında ortaya çıkan çok faktörlü etiyolojiye sahip olan doğuştan ve edinsel geniş bir hastalık grubunu kapsamaktadır. Kardiyovasküler hastalık tipleri, ateroskleroz, kalp yetmezliği, kalp kapakçık bozuklukları ve aritmiler, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalıkları, derin ven trombozu ve pulmoner emboli ve nadir kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklar olarak kalbin ve damarların tüm hastalıklarını kapsar (DSÖ, 2021; Thiriet, 2018). Kardiyovasküler hastalık çeşitleri ve örnek komplikasyonları literatürden derlenmiş olup Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Kardiyovasküler hastalık çeşitleri ve komplikasyonları (DSÖ, 2019; Libby vd., 2019; Thiriet 2018)

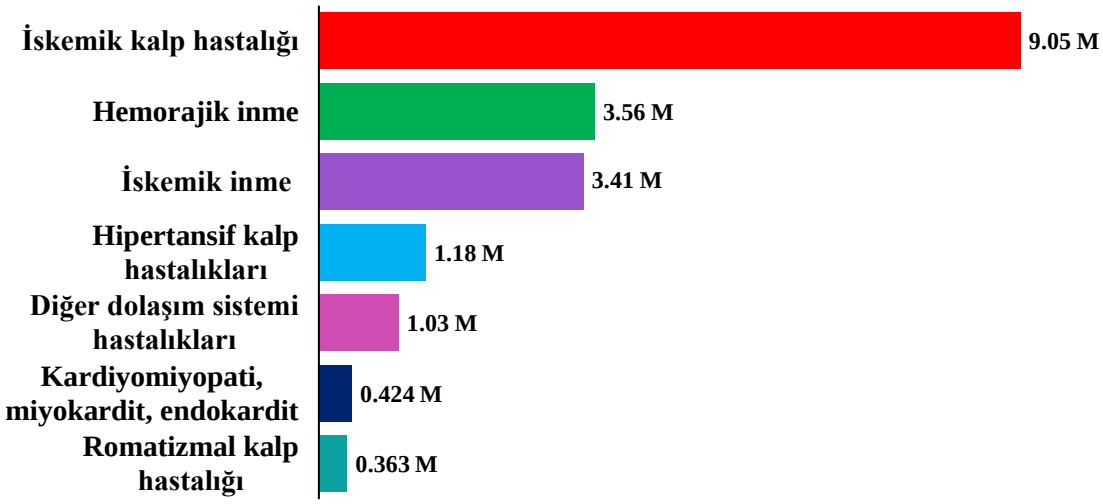
Kardiyovasküler Hastalık	**Tanım (Temel karakteristik özellikleri)**	**Spesifik Komplikasyonlar**
Aterosklerotik Hastalıklar	Arteryal damarlarda çeşitli hücreler, lipitler vb. birikimi ile daralma ve sertleşme	MI, iskemik inme
Koroner Arter Hastalığı (İskemik Kalp Hastalığı)	Kalp kasını besleyen damarlarda görülen hastalıklar	MI, anjina pektoris, emboli, inme, plak
Serebral Arter Hastalığı	Beyini besleyen damarlarda görülen hastalıklar	İnme ve geçici iskemik ataklar
Periferik Arter Hastalığı	Kol ve bacaklar ve vücudun diğer bölgelerine giden damarlarda görülen hastalıklar	Yürüme zorluğu, gangren
Kalp Yetmezliği	Kalbin vücuda yeterli kanı pompalayamaması, fonksiyonel kapasitesinin azalması	Yorgunluk, ödem, nefes darlığı
Kalp Kapak Hastalıkları	Kalp kapakçıklarının düzgün çalışmaması (daralma ya da yetersizlik)	KY, kapak darlığı
Aritmiler	Kalp atım hızının ya da ritminin düzensizliği	Çarpıntı, bayılma, ani kalp durmaları
Romatizmal Kalp Hastalıkları	Romatizmal ateş nedeniyle kalp kaslarında ve kapakçıklarında meydana gelen hasar	KY
Miyokardit, Endokardit	Miyokardit: kalp kası iltihabı Endokardit: kalp kapakçık enfeksiyonu	Ciddi ritim bozuklukları
Konjenital Kalp Hastalıkları	Doğumdan itibaren kalp yapısında meydana gelen malformasyonların neden olduğu kalbin normal gelişimini ve işleyişini etkileyen doğum kusurları	Kalpte delik, damar anomalileri
Derin Ven Trombozu ve Pulmoner Emboli	Bacaklardaki derin damarlarda kan pıhtısı oluşması	Pulmoner emboli

Kardiyovasküler hastalıklar arasında en yaygın görülen grup aterosklerotik temelli hastalıklardır. Ateroskleroz, tüm arteriyel bölgeleri etkileyebilen kronik, sistemik inflamatuar bir damar hastalığıdır (Banerjee & Asrress, 2018). Aterosklerozun alt tipleri; koroner arter hastalığı (KAH), serebral arter hastalığı ve periferik arter hastalığıdır. Koroner arterler kalbe, serebral arterler beyine, periferik arterler ise diğer tüm doku ve organlara giden arter damarları ifade etmektedir. En yaygın kardiyovasküler durum

iskemik kalp hastalığı (İKH) olarak da adlandırılan koroner arter hastalığı olup, 2021 yılında dünya genelinde yaklaşık 9 milyon kişiye ulaşan sayısı ile birinci ölüm nedeni olmayı sürdürmektedir (*Program in Cardiovascular Health Metrics*, 2024). İKH, asemptomatik seyreden koroner arter hastalığından, stabil/unstabil anjina ve miyokard infarktüsüne kadar geniş bir klinik yelpazede kendini gösterebilir. Uzun dönemli komplikasyonları arasında kronik kalp yetmezliği, aritmiler ve hatta ani kalp ölümleri yer alır (Thiriet, 2018). Miyokard infarktüsü, oksijen arz ve talebi arasındaki dengesizlik sonucu gelişen iskemiye dayanır. Miyokard iskemisi miyokard hasarına neden olur ve iskemik sürecin uzunluğuna göre miyokardiyal hücre (miyosit) ölümü olarak tanımlanan miyokard infarktüsü (kalp krizi) gerçekleşebilir. (Thygesen vd., 2018). Pratikte yaygın bir diğer KVH grubu olan kalp kapak hastalıkları, kalp kapaklarının daralması (stenoz), kapanamaması (yetersizlik) ya da her ikisinin de bir arada görüldüğü kombinasyonlarla karakterize hastalıklardır. Bu hastalıklar konjenital yapısal bozukluklardan kaynaklanabileceği gibi, enfeksiyonlar, iskemi veya farklı dejeneratif süreçler sonucunda da gelişebilir (Thiriet, 2018).

KAH'nı yaygınlık bakımından serebro-vasküler hastalıklar takip eder ve en önemli komplikasyonları iskemik ve hemorajik inmedir (Banerjee & Asrress, 2018). Serebral arterlerin tıkanması ya da yırtılma gibi hasarı sonucu gelişen bu inmeler önemli bir morbidite ve engellilik sebebidir. İnme, trombotik ya da embolik nedenlerle gelişen beyin damar yetmezliğini de içeren, nörolojik disfonksiyonla karakterize, immün sistem aktivasyonuna neden olan, mutli sistemik acil bir durumdur. Klinik olarak iskemik inme, hemorajik inme ve geçici iskemik atak (TIA, transient iscemic attack) olmak üzere üç ana alt çeşide ayrılır (Peplow vd., 2020). İskemik inme (tüm inmelerin %75-80'i), beyne giden arterin pıhtı ile doğrudan tıkanması ya da kalpten kaynaklanan bir embolinin serebral dolaşıma ulaşması ile oluşur. Hemorajik inme (yaklaşık %20), beyin içi veya çevresinde kanama (hemoraj) sonucu meydana gelebilir, ölüm oranı %50'lere çıkabilir. TIA, tipik olarak bir saatten az süren geçici nörolojik disfonksiyon sürecidir. TIA sonrası özellikle ilk 48 saat içinde yüksek olmak üzere, ilk üç aylık süreç içinde %10-20 oranında inme riski bulunmaktadır (Peplow vd., 2020).

KVH çeşidine göre ölüm oranları Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Kardiyovasküler hastalık çeşidine göre ölüm oranları (Dattani vd., 2023).

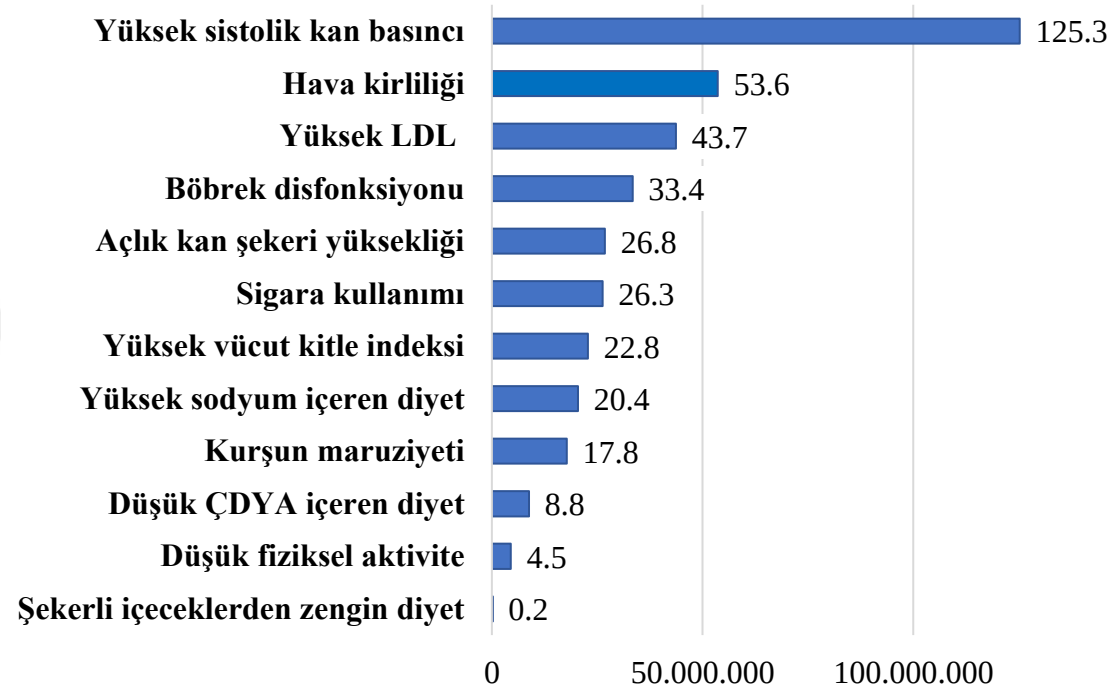
Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri tanımlanmıştır. Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında aile öyküsü, yaş ve cinsiyet gibi faktörler yer almakta olup bunlar, KVH gelişme olasılığını artıran ancak müdahale edilemeyen unsurlardır. Değiştirilebilir risk faktörleri ise metabolik, çevresel ve davranışsal risk faktörleri olmak üzere üç alt grupta değerlendirilmektedir ve bireysel ve toplumsal düzeyde önlenebilir, kontrol altına alınabilir olması bakımından halk sağlığı politikaları açısından büyük önem taşımaktadır.

Metabolik faktörler; yüksek kan basıncı (hipertansiyon), yüksek açlık plazma glukozu, yüksek vücut kütle indeksi (VKİ), yüksek LDL ve diyabet gibi faktörlerdir. Bu faktörler, aterosklerotik süreçleri hızlandırarak damar yapısını bozmakta ve KVH riskini artırmaktadır. Davranışsal risk faktörleri arasında yetersiz fiziksel aktivite, yüksek sodyum alımı, yüksek alkol ve tütün ürünleri kullanımı gibi yaşam tarzına bağlı etkenler bulunmaktadır. Bu faktörler genellikle uzun vadeli ve kümülatif etkiler göstererek KVH riskini yükseltmektedir. Çevresel faktörlerden özellikle hava kirliliği, son yıllarda artan epidemiyolojik kanıtlarla birlikte KVH açısından önemli bir risk faktörü olarak öne çıkmaktadır (Dünya Kalp Raporu, 2023).

GBD Çalışması 2021 verilerine göre, değiştirilebilir risk faktörleri arasında en fazla etkiye sahip olan yüksek kan basıncıdır (Şekil 2.4). Hem dünya geneli ölüm oranlarında hem de KVH'lar arasındaki ölüm oranlarında en yüksek risk faktörü olarak gösterilen hipertansiyonun 10 milyondan fazla ölümden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Bu faktörü sırasıyla hava kirliliği, yüksek LDL, açlık kan şekeri yüksekliği ve tütün kullanımı izlemektedir (Benjamin vd., 2019; Global Burden of Disease Collaborative Network., 2024).

KVH'ların gelişiminde önde gelen risk faktörleri Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. KVH'lar için önde gelen risk faktörleri (Global Burden of Disease Collaborative Network., 2024; Dattani vd., 2023)

KVH'ların değerlendirilmesinde kullanılan risk tanımları ve risk sınıflandırma stratejileri uygun tedavi yöntemlerinin ve yaşam tarzı değişikliklerinin belirlenerek uygulanmasında, hastalığın önlenmesi ve hastalığın küresel yükünü azaltma hedeflerinde oldukça önemlidir. İnflamasyonun, kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde merkezi bir rol oynadığı günümüzde yaygın kabul görmektedir. Bahsedilen risk faktörlerinin büyük bir bölümü inflamatuar süreçlerle ilişkilidir. Örneğin, 210 sağlıklı ikiz bireyin dahil edildiği bir çalışmada, sistemik kronik inflamasyon düzeylerinde bireyler arası farklılıkların en güçlü etkilerinin kalıtımsal değil çevresel faktörlerden kaynaklandığı gösterilmiştir. Bu bağlamda "ekspozom" kavramı, bireyin doğum öncesinden itibaren yaşamı boyunca maruz kaldığı fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlerin tamamını tanımlamakta ve inflamasyon gelişimi üzerindeki büyük etkisi açısından önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır (Furman vd., 2019). Sağlıklı diyet, egzersiz, kilo kaybı,

tütün kullanımından uzak durmayı içeren kalp sağlığı odaklı bir yaşam tarzının benimsenmesinin inflamasyon biyobelirteçlerinin serum seviyelerini düşürdüğü son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Alfaddagh vd., 2020).

KVH'ların oluşumunda ve ilerleyişinde inflamasyonun rolü ile ilişkili araştırmalar ve klinik çalışmalar son zamanlarda artarak devam etmektedir. Birçok hastalıkta olduğu gibi KVH'ların teşhis ve takibinin desteklenmesinde özellikle yüksek riskli bireylerin tespitinde inflamasyon, metabolizma regülasyonu, kan akışının kontrolü gibi süreçlere dahil olabilecek proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerden spesifik biyobelirteçler olarak faydalanılmaktadır (Thiriet, 2018). Halihazırda kullanılan klasik biyobelirteçlerin yanı sıra yeni/aday biyobelirteç çalışmaları sürmektedir. Tehsiş, hastalık seyrinin takibi ve farmakolojik olmayan müdahalelerin yanı sıra anti-inflamatuar ilaç çalışmaları, tedavi yöntemleri geliştirme çalışmaları da araştırmaların konusu olmaktadır (Alfaddagh vd., 2020).

2.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda İnflamasyonun Rolü

Son yirmi yılın en önemli tıbbi keşiflerinden biri, bağışıklık sisteminin ve inflamatuar süreçlerin sadece sınırlı sayıda birkaç hastalıkta değil, günümüzün morbidite ve mortalitesini global olarak domine eden çok sayıda fiziksel ve zihinsel sağlık sorununda da rol oynadığının anlaşılması olmuştur (Bennett vd., 2018; Furman vd., 2019; Roth vd., 2020). İnflamasyonun hemen hemen her insan hastalığıyla ilgili oluşunun anlaşılması, inflamasyona ve inflamasyon biyolojisine olan ilgiyi arttırmıştır (Medzhitov, 2021). Yaygın inflamatuar ve immün süreçler çeşitli hücre tiplerine etki ederek birçok hastalığa yol açmaktadır. Bu süreçler endotel hücreler gibi çeşitli epitel hücrelerin fonksiyonunu değiştirir ve farklı hastalıkların (ateroskleroz, böbrek yetmezliği, akciğer yetmezliği vb.) gelişimine katılır. Ayrıca düz kas hücreleri, fibroblastlar, miyofibroblastlar gibi mezenkimal hücrelere etki ederek kronik hastalıklara yol açmaktadır (Libby, 2007). Bu hastalıkların başlıcaları KVH'lar, kanser, diyabet, kronik böbrek hastalığı, karaciğer yağlanması, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklardır (Furman vd., 2019).

Artan bulgular ateroskleroz başta olmak üzere MI, aritmiler, perikardiyal hastalıklar, kalp kapakçık hastalıkları, kardiyomiyopatiler ve kalp yetmezliği gibi birçok kardiyovasküler hastalığın temelinde inflamasyon ve bağışıklık sistemi

disregülasyonunun yer aldığını ortaya koymaktadır (Bhagat vd., 2022; Boyalla vd., 2023; Hansson, 2005; Libby vd., 2009; Ross, 1999). Özellikle inflamasyon, aterosklerotik süreç ve MI dahil olmak üzere KVH'ların erken evrelerinin tetikleyicisi olarak öne çıkmaktadır (Bhagat vd., 2022). CANTOS klinik çalışması KVH'larda doğal bağışıklık hücrelerinin kritik rolünü ortaya koymaktadır (Ridker vd., 2017).

Miyokardiyal inflamasyon mikrobiyal ya da mikrobiyal olmayan etkenler (örneğin iskemik hasar) tarafından tetiklenince ortaya çıkan inflamatuar yanıtın asıl amacı hasar etkenlerini ortadan kaldırmak yani rezolüsyondur. Bu yanıt kısa vadede kalbin olumsuz koşullara adaptasyonunu sağlarken, uzun vadede homeostazı yeniden sağlamak ve kardiyovasküler fonksiyonları korumaktır (Mann, 2015). Ancak bu etkenler yok edilemez ve ortadan kaldırılamazsa rezolüsyon gerçekleşmez ve inflamasyon kronikleşir. Rezolüsyon yolaklarında meydana gelen bozulmalar oldukça stabil olan kalıcı inflamasyona ve doku hasarına yol açabilir (Serhan vd., 2007). Ya da bu anormal koşullar devam ederse (kardiyovasküler risk faktörleri) dokuda inflamasyon sürekli aktif kalarak düşük dereceli süregelen kronik inflamasyona yol açar. Uzun süreli, devam eden inflamatuar süreç doku homeostazını bozarak hastalığın ilerlemesine ve çeşitli kalp hastalıklarına yol açabilir (Mann, 2015).

Kardiyovasküler hastalıklarda inflamasyonun ve immün sistemin rolüne dair son yıllarda yapılan çalışmalar bu konudaki anlayışın gelişmesini sağlayarak, hastalık risk değerlendirmesi ve tedavi yaklaşımları için yeni olanaklar sunmuştur. Ayrıca inflamasyonun düzenlenmesinin kardiyovasküler olayları azaltabileceği öne sürülmektedir. Hatta çalışmalar, kardiyak inflamasyonun ve doku tamirinin sıkı bir şekilde regüle edilmesi ve inflamasyonun zamanında sonlanmasının kardiyak hasarı önleyebileceğini önermektedir. Ancak yine de KVH'larda inflamasyonun ve immün sistemin rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Bhagat vd., 2022; Boyalla vd., 2023; Medzhitov, 2008).

2.2.1. İnflamasyon

İnflamasyon doku hasarı veya enfeksiyon gibi uyaranlara karşı gelişen, her türlü patojeni, hücresel enkazı temizleyerek, hasara karşı onarımı başlatacak şekilde tasarlanmış bir dizi vasküler, hücresel ve moleküler olaylar bütünüdür. İnflamasyon, enfeksiyon veya yaralanma sonucu ortaya çıkan bir dizi savunma tepkisi olmanın yanı

sıra belirgin bir doku hasarı ya da enfeksiyon olmadan, doku stresi ya da işlev bozukluğuna bağlı olarak da gelişebilir (Chovatiya & Medzhitov, 2014). Mikroorganizma kaynaklı olmayan bu tür inflamasyon 'steril inflamasyon' olarak da tanımlanmaktadır (Chen & Nuñez, 2010).

İnflamasyon kaskadı vücudun makroskobik ve mikroskobik hasara karşı bütünlüğünü korumak için geliştirdiği benzersiz bir mekanizmadır (Bennett vd., 2018). İnflamasyonun temel unsurları olan konak hücre, kan damarları, immün sistem bileşenleri (ve bu hücrelerden salınan protein ve lipid mediyatörleri) inflamatuar uyarıyı ortadan kaldırmak, rezolüsyonu ve onarımı başlatmak için birlikte çalışırlar (Galvão vd., 2018). Vücudun zararlı olaylara karşı verebileceği sayısız yanıt vardır, ancak fizyoloji ve sistem biyolojisi bu çeşitliliğin arkasında basit bir mekanizma yattığına işaret eder. Bir hasar ya da değişikliğin, sebebinden (örn. tramva, enfeksiyon, bulaşıcı olmayan hastalık, otoimmün bozukluk ya da stres) bağımsız olarak gerçekleşen tipik fizyolojik tepki şu şekilde ilerlemektedir: Bölgeye kan akışında artış, etkilenen dokuda lökositlerin artışı, zararlı ajanı ortadan kaldırmak için fagositotik aktivitede bir artış ve bu mekanizmaların çözülüp düzenlenmesiyle sağlanan iyileşmedir (Bennett vd., 2018).

İnflamatuar yanıtlar plazma proteinlerinin dokuda birikmesi ile ödem ve lokalize şişlik oluşumuna yol açar. İnflamasyonun klasik dört temel belirtisi olan -*kızarıklık, şişlik, ağrı, lokal ısı*- ilk kez M.Ö. 1. yy. gibi erken bir dönemde, Roma İmparatorluğu'nda Cornelius Celsus tarafından belgelendiği kabul edilmektedir (Libby, 2012). İnflamasyonun yaralanmaya karşı faydalı bir tepki olduğu fikri iki yüzyıl sonra Roma'nın önemli hekimlerinden Galen tarafından desteklenmiştir. Bu görüş 19. yüzyıla kadar gelmiş ve inflamasyonun patolojik bir durum olduğu ve beşinci belirtisi olan -*fonksiyon kaybı*- ise patolojinin önemli isimlerinden Rudolf Virchow tarafından eklenmiştir (Ryan & Majno, 1977; Tardif vd., 2019; Tedgui, 2011). 19. yy. sonlarında Elie Mechnikov'un makrofajları keşfederek monositlerin/makrofajların ve nötrofillerin inflamasyonda ve doğal bağışıklıktaki rolünü tanımlaması, Mechnikov'u, bağışıklık hücrelerinin keşfinde ve humoral bağışıklıkta önemli katkılarda bulunan diğer bir bilim insanı olan Paul Ehrlich ile birlikte 1908 Nobel Ödülü'nü paylaşmaya götürmüştür (Cavaillon, 2011). Ancak bu kavramların, KVH'ların en yaygın nedeni olan ateroskleroza uygulanması neredeyse bir yüzyıl gecikmiştir (Libby, 2012) .

İnflamasyon, yoğunluğuna ve süresine bağlı olarak akut veya kronik olabilir (Brusini vd., 2020). Akut yanıt şiddetli ve kısa süreliyken (birkaç gün-birkaç hafta), kronik inflamasyon düşük seviyeli ilerler ancak uzun süre devam edebilen (aylar-yıllar) bir süreçtir ve akut inflamasyona göre rezolüsyonu çok daha zordur (Kumar vd., 2012). Akut inflamasyon genellikle yararlı ve gerekli bir süreç olsa da kronik olarak aktive olduğunda ve uzun süreli seyrettiğinde yıkıcı bir hale gelebilir, bu da progresif doku hasarına ve yaşam süresinin kısalmasına yol açabilir (Alfaddagh vd., 2020). Kronik inflamasyon, tetikleyici etkenlerin ortadan kaldırılamaması sonucu gelişir ve bu durumda inflamasyon süreci koruyucu bir mekanizma olmaktan çıkarak patolojik bir hale gelir. Bu nedenle, kronik hastalıkların gelişimi kontrolsüz ve işlevsiz inflamasyonla ilişkilendirilmektedir (Bennett vd., 2018). Lokal kronik inflamasyon belirli bir doku ya da organla sınırlı kalan durumları, sistemik kronik inflamasyon ise tüm vücudu etkileyen, genellikle hafif seyreden, uzun süreli ve düşük seviyeli kronik inflamasyon durumlarını ifade eder. KVH'ların risk faktörleri (sosyal, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri) akut inflamasyonun rezolüsyonunu önleyerek sistemik kronik inflamasyonu teşvik eder ve bu durum ateroskleroz, inme, kanser ve diğer birçok kronik hastalığa yol açabilir (Furman vd., 2019).

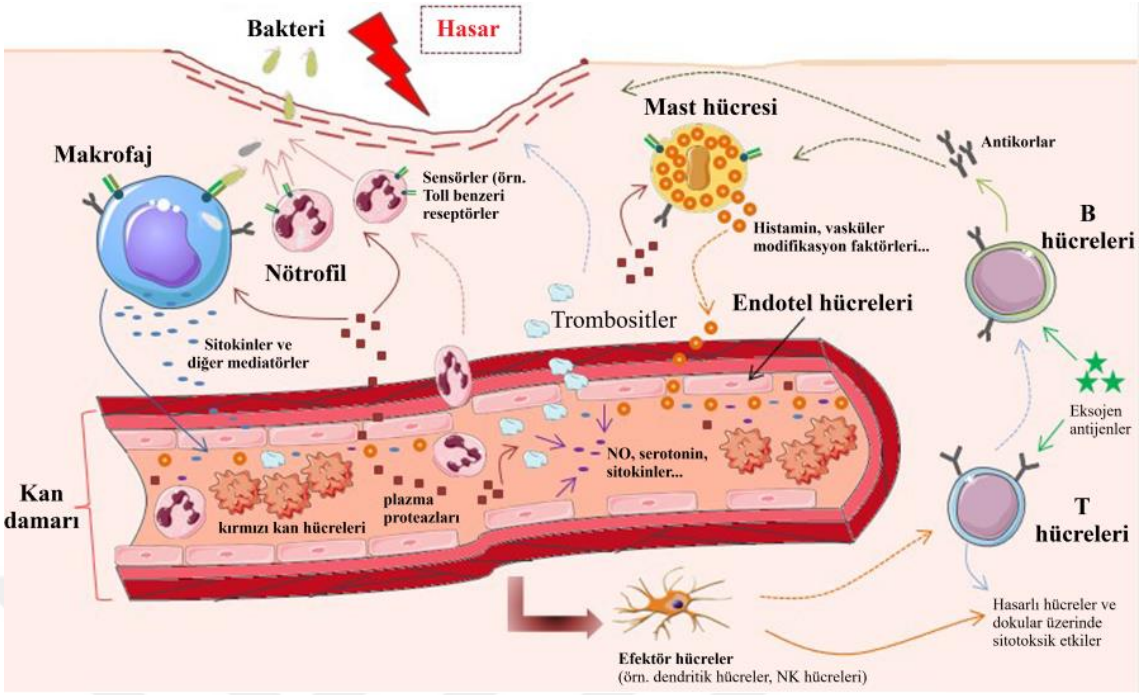
İnflamasyonun rezolüsyonu, etkilenen dokuların yeniden yapılanarak (remodelling) normal yapısal fonksiyonuna geri dönmesini ifade eder. Rezolüsyona uğramayan inflamasyon, çeşitli kronik hastalıkların gelişimine ve/veya ilerlemesine zemin hazırlayabilir (Nathan & Ding, 2010). Sistemik kronik inflamasyonun kökenlerine bakıldığında, çocukluk dönemindeki yaşam koşullarının ileriki yaşlarda metabolizma ve bağışıklık yanıtları üzerinde uzun vadeli ve belirgin etkiler yarattığı ve bu durumun yetişkinlikteki sistemik kronik inflamasyonun gelişimini desteklediği ortaya konmuştur (Fagundes vd., 2012; Furman vd., 2019; Olvera Alvarez vd., 2018; Renz vd., 2017; Singer & Lumeng, 2017).

Sistemik kronik inflamasyon ve immün sistem hücrelerinin sürekli aktivasyonu KVH'lar için önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır. Özellikle yaşlanma, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar gibi patolojik durumlar inflamasyonla ilişkili olarak KVH riskini arttırabilmektedir (Reali vd., 2021). Örneğin SARS-COV-2 enfeksiyonu pandemisi, hastalığın şiddetli seyrinin damar hasarı ve kardiyovasküler olaylarla kendini gösterdiğini ortaya koymuştur (Clerkin vd., 2020). SARS-COV-2 enfeksiyonu bireylere

bağlı olarak hiper-inflamatuar tepkilere yol açabilmiştir (Alderton & Scanlon, 2021). Sistemik inflamasyonun kardiyovasküler risk üzerindeki bu etkisi güncel çalışmalara yansımış, yüksek dereceli inflamasyonun hızlanmış damar hastalıkları için bir yolak oluşturduğu ve sistemik inflamasyonun, mevcut risk yollarını şiddetlendirerek kardiyovasküler riski hem doğrudan hem de dolaylı olarak artırdığı gösterilmiştir (QRESEARCH verisi, n=2.3 milyon) (Bennett vd., 2018).

İnflamasyon bağışıklık sisteminin vücudun sağlıklı olarak işleyişinin korunmasını destekleyecek şekilde gelişmiş bir yanıtıdır ve temel amacı homeostazın korunmasıdır (Chovatiya & Medzhitov, 2014). Memeli bağışıklık sistemi, sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere birçok faktörün salgılanması yoluyla bağışıklık yanıtını yöneten özel hücre tiplerinden oluşan kompleks bir yapıdır (Abbas vd., 2024). Bağışıklık sistemi, hasarı ya da patojenleri tespit ettiğinde çeşitli sinyal yolakları aracılığıyla karmaşık bir dizi yanıtı devreye sokar ve koordine eder (Chopra vd., 2024). Bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan uyaranlar ya da hücresel hasar uyaranları, inflamatuar hücreler için aktivatör yani indükleyici görevi görür. Bu uyaranlar inflamasyonla ilişkili NF-κB (nükleer faktör kappa-B), MAPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) ve JAK-STAT (Janus tirozin kinaz /sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) gibi kompleks sinyal yolaklarını tetikler (Hu vd., 2021; Liu vd., 2017; Kaminska, 2005). Bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin patolojik durumlarda doğrudan veya dolaylı inhibisyonunun kalp fonksiyonunu iyileştirdiği doğrulanmıştır (Sorriento & Iaccarino, 2019).

Şekil 2.5'te inflamatuar yanıtların şematik gösterimi verilmiştir. İnflamatuar yanıt genel olarak indükleyicilerin, sensör olarak davranan özelleştirilmiş hücre kısımları ve dolaşımdaki proteinler tarafından tanınmasına yönelik bir reaksiyon olarak tanımlanır. Bu tanınma sürecinin ardından hastalıklı dokuyu hedef alan inflamasyon mediyatörleri üretilir (Brusini vd., 2020).



Şekil 2.5. İnflamatuar yanıtların şematik gösterimi (Brusini vd., 2020)

İnflamasyon fazı sırasında gerçekleşen temel mikrovasküler olaylar arasında damar geçirgenliğinde değişimler, lökositlerin (nötrofiller, monositler/makrofajlar, lenfositler, doğal katil (NK) hücreleri, T ve B hücreleri) toplanması ve birikimi ve inflamatuar mediyatörlerin salınımı yer alır (Chopra vd., 2024). İnflamasyon mediyatörleri hasarın tanınmasıyla tetiklenen inflamatuar yanıtın oluşumu, sürdürülmesi ve rezolüsyonunu kontrol eden düzenleyici moleküllerdir. Bu mediyatörler immün hücrelerinden türetilen (örn. vazoaktif aminler, trombosit aktifleştirici faktör, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit, sitokinler ve kemokinler), karaciğer tarafından üretilen ve plazmada dolaşımda olan akut faz proteinleri (örn. kompleman, koagülasyon ve kallikrein-kinin sistemleri) olarak sentezlenir. İnflamasyon mediyatörleri, kan damarlarının genişlemesi, damar geçirgenliği, etkilenen dokuya lökosit göçü, ağrı gibi inflamatuar süreçlerini birlikte düzenlerler (Galvão vd., 2018). Mediyatörler ayrıca dendritik hücreler ve NK hücrelerden oluşan efektör hücrelerle ve dokularla etkileşime girerek inflamasyonun rezolüsyonunda rol oynarlar. B ve T lenfositleri dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler tarafından üretilen antijenleri tanıyabilir ve bir bağışıklık yanıtı oluşturabilir. Adaptif mekanizmalar doğrudan sitotoksik etkiler yoluyla veya doğal bağışıklık sisteminin bileşenleri (kompleman proteinleri ve fagositik hücreler) ile etkileşen antikorların salgılanması yoluyla işlev görür (Brusini vd., 2020).

Vücudun savunma mekanizmaları doğal (doğuştan gelen) ve adaptif (kazanılmış) bağışıklık sistemleri olmak üzere iki ana immün sistem aracılığıyla yürütülmektedir (Libby, 2007). Vücudun yaralanma ve enfeksiyonlara karşı ilk immünolojik savunma mekanizması olan doğal bağışıklık sisteminin bileşenleri her zaman aktif ya da aktife yakın bir durumda olduğundan bu sisteminin tepkileri adaptif bağışıklık sistemi tepkilerinden çok daha önce ve hızlı gerçekleşir. Adaptif bağışıklık ise sergilediği spesifiklik ile sürece katılır. Bu iki sistem birbirinden farklı işlev ve özelliklere sahip olsa da bir bütünlük içerisinde ve koordineli olarak inflamatuar yanıtlara aracılık etmektedir (Doan vd., 2021; Soehnlein & Libby, 2021).

Doku hasarını takiben ortaya çıkan doğal bağışıklık yanıtının zamanlaması hasarın şiddeti ve çeşidinden bağımsız olarak büyük ölçüde benzer ve tutarlıdır. Bu süreç nötrofillerin bölgeye hızlıca göçü ve ardından monositlerin bölgede toplanması ile karakterizedir (Mann, 2015). Tetiklenen akut inflamatuar yanıtta, plazma ve lökositler gibi kan bileşenleri, enfekte veya hasarlı bölgeye koordineli bir şekilde iletilir (Takeuchi & Akira, 2010). Enfeksiyonun tanınmasına ilk olarak dokularda bulanan makrofajlar ve mast hücreleri eşlik eder ve pro-inflamatuar sitokinler (TNF (tümör nekroz faktörü), interlökin1- β (IL1- β) gibi), kemokinler **(**CC-, CXC-**),** vazoaktif aminler, eikosanoidler, proteolitik kaskad ürünleri gibi inflamatuar mediyatörlerin üretilmesine yol açarlar. Bu mediyatörlerin temel etkisi, endotel hücrelerini aktive ederek geçirgenliğini artırmak ve normalde kısıtlı olan plazma proteinlerinin ve nötrofil ağırlıklı olarak lökositlerin damar dışına lokal sızıntısını sağlamaktır (Medzhitov, 2008, 2021). Bahsedilen TNF, IL1-β, IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinler, endotel geçirgenliği ayarlamanın ve kan plazma ve hücrelerinin hasarlı dokuda toplanmasını sağlamanın yanı sıra dokudaki hücre ölümünü regüle etme ve akut faz proteinlerinin üretimini indüklemede de görev alırlar (Takeuchi & Akira, 2010). Kemokinler küçük yapılı (8-12 kDa) kemotaktik sitokinler olarak, lökositlerin inflamasyon bölgesine göçünü yönetmede önemli rol oynar, bunun yanı sıra reseptörleriyle birlikte homeostatik fonksiyonları da bulunmaktadır ve terapötik etkileri araştırmaların konusudur (Noels vd., 2019). Bağışıklık hücreleri ve salınan mediyatörler apoptopik hücreleri ve mikroorganizmaları yok ederek dokunun rezolüsyon safhasına hazırlanmasına yardım eder (Barton, 2008; Shi & Pamer, 2011). Başarılı bir akut inflamatuar yanıt, enfeksiyon etkenlerinin yok edilmesi ve ardından doku makrofajları ve

bölgeye gelen makrofajlar tarafından düzenlenen ve rezolüsyon ve onarım fazı ile sonuçlanır (Medzhitov, 2008).

Etkili bir bağışıklık yanıtında pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sinyaller arasında hassas bir denge bulunur, bu denge doku onarımını ve iyileşmeyi destekler. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar apoptopik hücreleri yok eden makrofajların IL-10 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini arttırırken, TNF, IL1-β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını azalttığını ortaya koymuştur (Epelman vd., 2015). İnflamasyonun şiddetini düzenleyen anti-inflamatuar sinyaller arasında kapsamlı şekilde incelenmiş olan IL-10 (interlökin-10), TGF-β (dönüştürücü büyüme faktörü-β) ve glukokortikoidler gibi moleküller yer almaktadır (Medzhitov, 2021). Devam eden inflamasyonda pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar mediyatörler arası denge bozulur, örneğin ateroskleroz ve kanser gibi modern çağ hastalıklarında pro/anti yanıtların dengesizliği açıkça görülmektedir (Mills & Ley, 2014). Bunun yanısıra TGF-β inflamatuar yanıtın ilk fazlarında anti-inflamatuar etki gösterse de devam eden inflamasyonda inflamasyonu uzatıcı etkiler gösterebilmektedir (Serhan vd., 2007).

Doğal bağışıklık sisteminin ateroskleroz dahil birçok KVH'da etkili olduğu belirlenmiştir. Antonelli & Kushner (2017), inflamasyonu patojenler, hasar, metabolik stres gibi potansiyel olarak zararlı uyaranlara karşı doğal bağışıklık yanıtı olarak yeniden tanımlamışlardır (Brusini vd., 2020) ve CANTOS klinik çalışmasıyla doğal bağışıklığın kardiyovasküler hastalıklarda kilit bir rol oynadığı ortaya konmuştur (Ridker vd., 2017). Sürekli ve kronik inflamasyona bağlı olarak adaptif bağışıklık sisteminin de KVH riskini artırdığı anlaşılmıştır (Boyalla vd., 2023). Doğal ve adaptif bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonu ve bu hücrelerin enfekte ya da hasarlı dokulara girişi çeşitli KVH'larda gösterilmiştir; örneğin bu hücreler aterosklerotik plaklarda, kardiyomiyopati sonrası kalpte ve hipertansiyon nedeniyle böbreklerde bulunmuştur (Ilatovskaya vd., 2019).

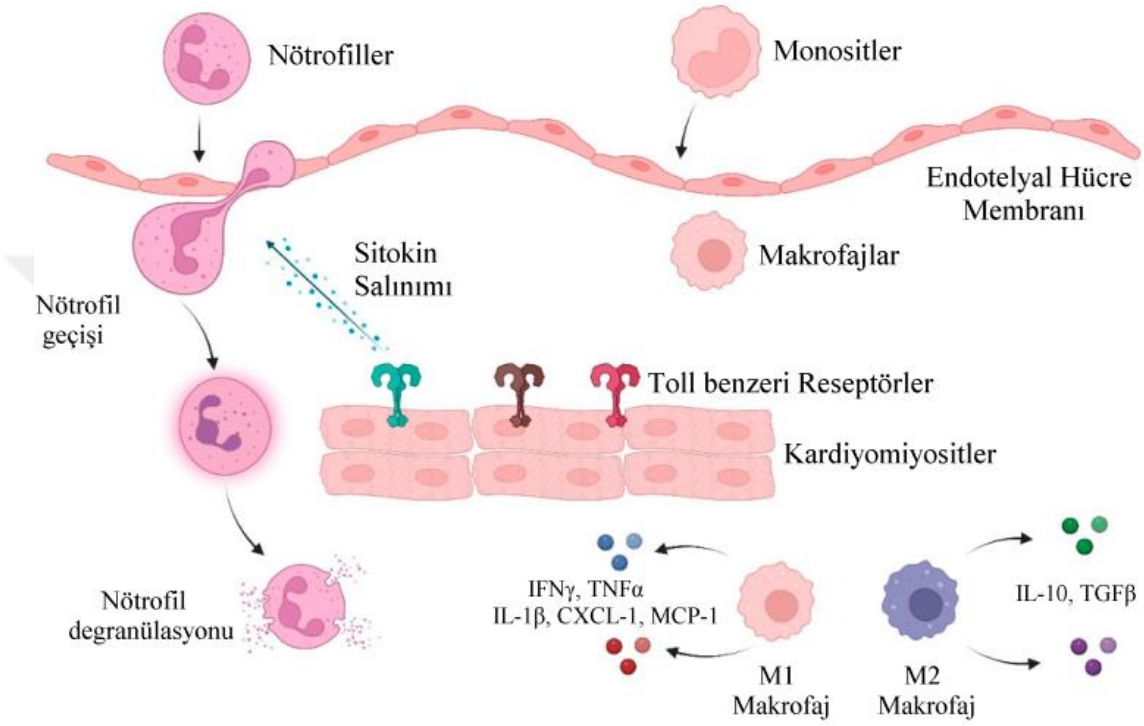
İmmün sistemin adaptif bileşenleri özelleşmiş iki hücre sınıfı, B hücreleri (humoral) ve T hücreleri (selüler) ile düzenlenir (Medzhitov & Janeway, 2000). Doğal ve adaptif bağışıklık arasındaki ilişki son yıllarda KVH araştırmalarında da ilgi görmektedir (Ilatovskaya vd., 2019). Adaptif immün yanıt doğal bağışıklık sistemi tarafından indüklenir. Doğal bağışıklık ile tanınan mikrobiyal yapılar nedeniyle salgılanan mediyatörler antijene özgü lenfositlerin salgılanmasını ve aktive olmasını sağlar ve

adaptif bağışıklık yanıtını başlatırlar (Medzhitov & Janeway, 2000). Makrofajlar, T hücresi yanıtlarını başlatan ve yönlendiren temel hücrelerdir (Duque & Descoteaux, 2014). Monositler ve monosit kaynaklı hücreler de lenf düğümlerine girerek adaptif bağışıklık yanıtını destekler (Shi & Pamer, 2011). Regulator T hücreleri ise bağışıklığı inhibe eder ve inflamasyonu bastırır. Bu hücreler anti-inflamatuar sitokin üretimini destekleyerek iyileşmeyi teşvik eder, ayrıca oto-immüniteyi önler. Bu süreçlerin düzensizleşmesi kronik inflamasyona yol açabilir (Serhan vd., 2007). Adaptif immün sistem, sürekli ve kronik inflamasyon nedeniyle KVH riski ile ilişki göstermektedir (Boyalla vd., 2023; Ilatovskaya vd., 2019). Aterosklerotik plaklarda bulunan T ve B hücrelerinin vasküler inflamasyonu tetikleyen otoimmün-aracılı bir süreç oluşturduğu ve aterosklerozun otoimmün bir yanıt içerdiği de öne sürülmektedir (Wolf & Ley, 2019).

2.2.2. Kalp Hasarında İnflamasyon

Kalp hasarı veya yaralanma durumunda doğal bağışıklık hücreleri inflamasyonun başlatılması, sonlandırılması ve doku onarımının desteklenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Bhagat vd., 2022). İskemik veya iskemik olmayan kalp hasarının ardından hücre kalıntılarının temizlenmesi ve dokunun yeniden yapılanması için güçlü ve hızlı bir inflamatuar yanıt gereklidir (Mann, 2015). Yaralanmalara hızlı yanıt veren doğal bağışıklık sistemi, patojenlerde yaygın olarak bulunan ancak memeli organizmalara yabancı olan ve patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler) olarak adlandırılan moleküler yapıları algılar (Libby, 2007). Bu moleküler yapıların yelpazesi çok geniştir ve doğal bağışıklık sistemi, adaptif bağışıklığın aksine spesifik yapı tanıma yeteneğine sahip değildir. Ayrıca mikroorganizma kaynaklı olmayan inflamasyonun, yani steril inflamasyonun sebep olduğu hasarlı dokulardan hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler) adını alan endojen moleküller salınır ve bu moleküller doğal bağışıklık sistemi tarafından tanınır (Chen& Nuñez, 2010; Takeuchi & Akira, 2010). Doğal bağışıklık sisteminin sadece kendinden olmayan molekülleri (PAMP'ler) algılayacak şekilde evrilmediği, aynı zamanda normalde hücre ölümü dışında hücre dışı sıvıda bulunmayacak olan hücre içi ve endojen molekülleri (DAMP'lar) de tanıyabildiği anlaşıldıktan sonra, steril inflamasyon olarak tanımlanan bu gözlem, doku hasarı ile pro-inflamatuar mediyatörlerin salınımı ve doku stresine karşı oluşan miyokardiyal yanıt arasında potansiyel olarak önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Mann, 2015).

Kalp hasarı durumunda steril inflamasyonun başlangıç süreci; hasarın tanınmasını, çözünür mediyatörlerin (sitokinler, kemokinler, proteazlar gibi) salınmasını ve aktivasyonunu ve immün hücrelerin (monositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi) katılımını içerir (Bhagat vd., 2022). Şekil 2.6'da kalp hasarında doğal bağışıklık sisteminin yanıtı genel hatlarıyla gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Doğal bağışıklık sisteminin kalp hasarına verdiği yanıt (Bhagat vd., 2022)

Kardiyak doğal bağışıklık yanıtı, hasar nedeniyle salınan endojen moleküller olan DAMP'ların ve/veya patojenlerden gelebilecek olan PAMP'ların belirli reseptörlerce tanınınması ile başlar (Mann, 2015). Patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) olarak adlandırılan bu reseptörlerinden bazıları Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve NOD (nucleotide-binding oligomerization-domain protein) benzeri reseptörlerdir (NLR'ler) (Medzhitov, 2008). PAMP ve DAMP'lerin PRR'ler tarafından tanınması inflamatuar yolaklarda rol oynayan genlerin transkripsiyonunu artırırarak bağışıklık yanıtını başlatır (Takeuchi & Akira, 2010). Kalp hasarı sonrasındaki bağışıklık sinyallerinde TLR'ler önemli rol oynamaktadır. Şekil 2.6'de görüldüğü gibi miyositlerin üzerinde bulunan TLR'ler DAMP'ler ile aktive olur ve doku hasarını tespit ederek, NF-κB (TLR4/ NF-κB yolağı) sinyali ile pro-inflamatuar sitokin, kemokin ve interferonların ekspresyonunu

indükleyerek salınımını içeren immün yanıtı başlatır (Suetomi vd., 2019). Salınan bu moleküller; nötrofiller, monositler, makrofajlar gibi immün hücrelerin damar lümeninden hasarlı kalp dokusunun bulunduğu bölgeye geçişini sağlar (Bhagat vd., 2022). Nötrofiller hasarlı dokuya geçen ilk moleküllerdir ve inflamatuar sürecinin bölgesel olarak şiddetlenmesindeki öncü mekanizmayı sağlarlar (Boyalla vd., 2023). Etkilenen doku bölgesine ulaşan nötrofiller, patojenle direkt temas ile ya da yerleşik hücrelerden salgılanan sitokinler vasıtasıyla aktive olur (Nauseef & Borregaard, 2014). Nötrofiller, istilacı patojenleri ortadan kaldırmak için granüllerindeki çeşitli proteazları, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) gibi toksik içerikleri serbest bırakır (Medzhitov, 2008). Bu güçlü aracı moleküller spesifik değildir ve nötrofil aktivitesi zararlıları yok ederken yan etki olarak konağın dokularına da zarar verebilir. Bu toksisite henüz tam bir bağışıklık tepkisi oluşmadan enfeksiyonun ya da hasarın etkilerinin erken fazda önlenmesine hizmet eder (Barton, 2008). Nötrofillerin başlangıç tepkisini takiben diğer immün hücreler de (monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, lenfositler, mast hücreleri) hasarlı dokuya alınır. Monositler ve makrofajlar bu inflamatuar süreci domine eden hücrelerdir. Akut inflamatuar yanıt sırasında bölgeye en çok monosit akını olur, monositler lokal inflamatuar ortamın etkisiyle pro-inflamatuar makrofajlara (M1) dönüşerek dokuya yerleşik makrofajlardan sayıca üstün olurlar (Bhagat vd., 2022) Çoğalan bu makrafajlar doku makrofajlarını da destekleyip, apoptopik nötrofilleri ve mikroorganizmaları yok ederek dokunun rezolüsyon safhasına hazırlanmasına yardım eder (Barton, 2008; Shi & Pamer, 2011). Miyokard infarktüsündeki gibi akut inflamatuar bir yanıtta monositlerin geçici dinamiği bu proseste üretilen sitokin ve kemokinler tarafından kontrol edilir, bu da hem inflamatuar ve hem de onarıcı makrofajların artışına sebep olur (Boyalla vd., 2023). M1 tip (inhibit tip) makrofajlar patojenleri hızlıca öldürebilirler ve bu yüzden konağın birincil savunmasıdırlar ve M2 tip (iyileşme tipi) makrofajlar rutin olarak doku bütünlüğünü koruma ve onarıma dahil olurlar. Makrofajlar iyileşme/büyüme destekleyici fonksiyondan (M2 makrofajlar), inhibe edici/öldürücü fonksiyona (M1 makrofajlar) geçebilecek şekilde metabolizmalarını radikal olarak değiştirebilme gibi özel bir yetenek geliştirmişlerdir (Mills & Ley, 2014). Makrofajların M1 ve M2 fenotipleri (iki ana aşırı aktivasyon fenotipi) arasındaki geçişler ‘makrofaj polarizasyonu’ olarak adlandırılır ve bu polarizasyon aynı zamanda Th1/Th2 (T helper hücreleri) paradigması/polarizasyonu (Mills vd., 2000) ile de ilişkilidir. Polarize M1

makrofajlar yüksek seviyede IL-1β, TNF, IL-6, IFNγ gibi pro-inflamatuar sitokinleri salgılar, IL-12 salgılayarak Th1 polarizasyonunu indükleyebilirler ve ROS ve NO gibi toksik efektör molekülleri etkili bir şekilde üretirler (Strizova vd., 2023). Bu makrofajlar, inflamatuar bölgeye daha fazla inflamatuar hücrenin gelişini ve aktivasyonunu sağlamak için kemokinler (örn. CXCL-1) salgıladıkları gibi hücresel kalıntıların fagositozuna da dahil olurlar (Boyalla vd., 2023). Makrofajlar ayrıca doku matrikslerini parçalayan ve inflamatuar bölgeye lökosit geçişini kolaylaştıran matriks metalloproteinazlarını (MMP'ler) da salgılar (Bhagat vd., 2022).

Sağlıklı bir inflamatuar bir yanıtta, temizlik fazını takiben, polarizasyonun M1 tip makrofajlardan M2 tip makrofajlara kaydığı varsayılmaktadır. İnflamasyonun akut fazı sona erdikten sonra Th2 sitokinleri, M2 makrofaj polarizasyonunu ve bölgeye göçünü teşvik eder (Braga vd., 2015). Anti-inflamatuar özellik gösteren ve onarıcı makrofajlar olarak da adlandırılan M2 makrofajlar TGF-β, IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinler salgılarlar, onarımın inflamatuar fazdan rejeneratif faza doğru ilerlemesini, yeni ekstrasellüler matriks (ECM) oluşumunu ve hücre büyümesini desteklerler (Boyalla vd., 2023; Strizova vd., 2023). Ayrıca M1 makrofajlarca fagosite edilen apoptopik hücreler de M2 makrofaj polarizasyonunu artırır (Braga vd., 2015). M2 makrofajlar polarize Th2 yanıtlarında, alerji, parazit temizliği, inflamasyonun baskılanması, doku yeniden şekillenmesi, bağışıklık regülasyonu, tümör gelişimi gibi süreçlerde rol oynar (Italiani & Boraschi, 2015). Doku makrofajları genellikle normal 'varsayılan' durum olarak M2 fenotipini destekler.

İnflamatuar bir bölgede, hastalığın (inflamasyonun) ilerlemesini teşvik eden M1 ve M2 hücreleri arasındaki denge, kronik inflamasyon ile iyileşme nihai sonuçlarından hangisine doğru gidileceğini belirler (Mia vd., 2014). Kronik inflamasyon durumlarında hastalığa sahip bireylerin hedef organlarında pro-inflamatuar bağışıklık aktivitesinin (M1), anti-inflamatuar aktiviteye (M2) göre lokal bir baskınlık sağladığı düşünülmektedir, bu durum inflamasyonun rezolüsyonü yerine devam etmesine yol açar (Mia vd., 2014). İnflamatuar yanıtların kronik aktivasyonu aşırı immün hücre aktivitesi yaratır ve sistemik inflamasyonu teşvik eder (Bennett vd., 2018). İnflamasyonun kontrolsüz artışı ya da fazla üretimi kronik düşük-dereceli etkiler yaratır. Gerçekten de M1 tip makrofajların birçok kronik inflamatuar ve otoimmün hastalığa katıldığı düşünülmektedir (Luo vd., 2024). M1 tip makrofajların baskınlığı, salınan pro-

inflamatuar sitokinleri ve ROS gibi toksik reaktif türleri arttıracağından, doğrudan miyofiber yıkımına neden olarak hasarı daha da şiddetlendirebilir (Boyalla vd., 2023). İnflamasyon ve doğal bağışıklık yanıtı, kalp için hücresel koruma ve doku onarımı açısından gerekli olmakla birlikte, bu yanıtın devamlılığı yıkıcı etkiler bırakabilir. Bu etkilerin en belirgin sonucu, bağışıklık hücrelerinin ve inflamasyon mediyatörlerinin periferal dolaşımdaki sürekliliği ve aşırı aktivasyonu ile birlikte kalp hücrelerine verdiği hasar ve buna bağlı olarak gelişen doku tahribatının artışıdır (Mann, 2011).

İnsan aterosklerotik lezyonlarında makrofajların hem M1 hem M2 profilleri tespit edilmiştir (Strizova vd., 2023). M2 tip makrofajlar anti-inflamatuar etki gösterse de devam eden inflamasyonda artık koruyucu olmaktan çıkarak bozulmuş bir aşırı onarım durumuna geçip önemli bir profibrotik rol alarak, TGF-β ve Galektin-3 gibi profibrotik faktörler salgılarlar (Braga vd., 2015). Fibrogenez süreci monositlerin aktive olup profibrotik makrofajlara dönüşümü ile başlar, salgılanan TGF-β miyofibroblastların artışını da tetikler (Thiriet, 2018). Fibrozis ya da yara dokusu oluşumu, kronik inflamatuar hastalıkların bir komplikasyonudur ve vücutta neredeyse her dokuyu etkileyebilir (Wynn & Ramalingam, 2012). Kalpte meydana gelen adaptif kolajen bazlı fibriyotik yara oluşumu miyokardiyal yapıyı korurken, kardiyofibroblastların devam eden aktivasyonu kardiyak fibrozise sebep olur. Miyokardiyal fibrozis neredeyse tüm kalp hastalık türleri ile ilişkili önemli bir küresel sağlık sorunudur (Travers vd., 2016). Kardiyak fibrozis dokular arası ve perivazküler bölgelerde kardiyofibroblastlarca özellikle kolajen gibi ECM bileşenlerinin kontrolsüz birikimi ile karakterize edilir (Thiriet, 2018). Bu kontrolsüz birikim, onarımı patolojik bir hale getirerek normal dokuların kalıcı olarak hasarlı dokulara dönüşümüne yol açabilir. Kapsamlı doku yeniden yapılanması ve kardiyovasküler fibrozis ciddi kardiyak fonksiyon bozukluklarına, kalp yetmezliğine ve hatta ölüme yol açabilir (Hinderer & Schenke-Layland, 2019).

2.2.3. Aterosklerozda İnflamasyon

En yaygın KVH'lar aterosklerotik olup, ateroskleroz artık bulaşıcı hastalık salgınını geride bırakan ve dünya çapında ölüm ve engelliliğin en önde gelen nedeni olan KVH'ların çoğunluğunda birincil patolojik süreç olarak önemli bir yer tutmaktadır (Banerjee & Asrress, 2018; Dünya Sağlık Örgütü, 2021; Roth vd., 2020). Aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar (ASKVH) olarak da adlandırılan bu KVH'lar koroner,

periferal ve serebrovasküler arterlerde görülebilir ve kalp krizi ve inme ile sonuçlanabilir (Madaudo vd., 2024). Koroner arter hastalığı, MI, inme, kardiyak iskemisi, stabil angina yani göğüste ağrı, kardiyak aritmiler, kalp yetmezliği sıklıkla ateroskleroz nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Bhagat vd., 2022; Libby vd., 2019).

Ateroskleroz arteriosklerozun en yaygın çeşididir. Arterioskleroz damar sertleşmesi ya da damarın kalınlaşarak esnekliğini kaybetmesidir. Ateroskleroz ise arteriosklerozun yağlı plak oluşumu ile karakterize edilen bir çeşidi olup, büyük ve orta büyüklükteki arterlerin intimasında lipoprotein birikimi ile oluşan inflamatuar ve onarıcı yanıtların bir sonucu olarak ortaya çıkan, lipid açısından zengin, bağ dokusu ve immün hücreler içeren plakların birikimi ile karakterize edilen, sistemik, kompleks, kronik inflamatuar bir hastalıktır (Libby vd., 2019; Ross, 1999). Ateroskleroz, önceden lipid birikimi ile karakterize edilse de günümüzde geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörlerinin aracılık ettiği kronik vasküler bir inflamasyon olarak tanımlanmaktadır (Soehnlein & Libby, 2021).

Ateroskleroz oluşumu ile ilgili 19. yy'dan bu yana "Trombojenik Hipotez, Lipid Hipotezi, Monoklonal Hipotez" gibi hipotezler ortaya atılmış ancak bu hipotezler geçerliliğini günümüzde yitirmiştir (Öztürk, 2014). Aterosklerozda inflamasyonun rolü 19.yy'da tanınmaya başlamıştır ve Rudolph Virchow inflamasyonun aterosklerozda nedensel bir rol oynadığını öne sürmüştür ve aterosklerotik plaklarda inflamasyonun doğasını tanımıştır (Mauricio vd., 2020). Aterosklerozun kronik inflamatuar bir hastalık olduğu hipotezi (inflamasyon hipotezi) 1999'da daha önceki hipotezlerde katkıları olan Russel Ross tarafından ortaya atılmıştır (Ross, 1999). Ayrıca yakın zamanda lipid metabolizması ve immün yanıt dolayısıyla, inflamasyon arasındaki ilişkiye dayanarak, ateroskleroz oluşumu için bir immün-metabolik hipotez de ortaya atılmıştır (Mauricio vd., 2020).

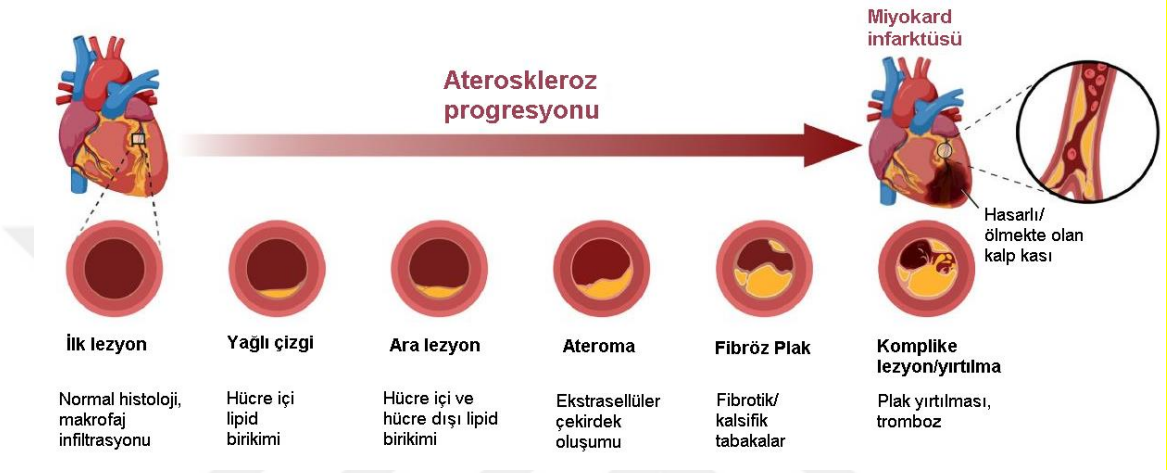
Medzhitov (2021), inflamatuar sinyalleri ve hücreleri içeren biyolojik çeşitlilik ele alındığında, inflamasyonun yalnızca enfeksiyona ya da doku hasarına verilen bir yanıt olarak değerlendirildiği geleneksel görüşün yetersiz ve eksik bir bakış sunduğunu, çünkü inflamasyonun açık bir şekilde bu tetikleyiciler olmaksızın da gelişebildiğini belirtmektedir. Bu durum, KVH, obezite, yaşlanma, kanser, hatta uyku bozukluklarıyla ilişkili inflamasyonda kendini göstermektedir (Medzhitov, 2021). Aterosklerotik

kardiyovasküler hastalıklara bakış, yalnızca pasif bir kolesterol birikiminden çıkıp, kronik inflamasyon tarafından yönlendirilen bir dizi biyokimyasal ve histolojik mekanizmayı devreye sokan, plak oluşumuna yol açan ve plak yırtılması olaylarını tetikleyen bir süreç olarak anlaşılmasına evrilmiştir (Alfaddagh vd., 2020). Günümüzde "inflamasyon hipotezi" güncelliğini korumaktadır ve ateroskleroz geleneksel (hiperlipidemi, hipertansiyon vb.) ve geleneksel olmayan (inflamasyon, oksidatif stres) risk faktörlerinin aracılık ettiği doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerinin aktivasyonuyla karakterize edilen kronik bir damar inflamasyonu olarak tanımlanmaktadır (Soehnlein & Libby, 2021). İnflamasyon ve bağışıklık sisteminin aterosklerozun tüm aşamalarında ve komplikasyonlarında belirleyici rol oynadığı çok sayıda deneysel ve klinik çalışma ile gösterilmiştir (Hansson, 2005; Soehnlein & Libby, 2021; Wolf & Ley, 2019). Son yıllarda genom düzeyinde hastalık ilişkilendirme çalışmaları, ileri *in vivo* görüntüleme teknikleri ve transgenik fare modelleri ve klinik müdahaleler immün yanıtların ateroskleroz üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır (Wolf & Ley, 2019). Son yıllarda, özellikle CANTOS (Ridker vd., 2017), LODOCO2 (Nidorf vd., 2020), COLCOT (Tardif vd., 2019) gibi önemli klinik çalışmalar, bu kapsamlı genetik bulguları, insan biyobelirteç araştırmalarını ve deneysel çalışmaları klinik uygulamalara dönüştürmüştür (Kong vd., 2022). Bu başarılı klinik çalışmalar, inflamasyon yanıtının düzenlenmesiyle kardiyovasküler olay riskinin ve görülme sıklığının anlamlı derecede düşürülebildiğine dair kanıt sunmaları nedeniyle önemlidir. CANTOS klinik çalışmasının bir başka önemi ise, miyokard infarktüsü geçmişi olan hastalarda, doğal bağışıklıkta önemli bir rolü olan pro-inflamatuar sitokinlerden IL1-β'yı hedef alan, Canakinumab monoklonal antikor tedavisi ile inflamasyon biyobelirteci olan hs-CRP seviyesini LDL kolestrol seviyesinden bağımsız olarak kanda önemli ölçüde düşürmüş olmasıdır (Ridker vd., 2017).

2.2.3.1. Aterosklerozda Plak Oluşumu

KVH'ların patofizyolojisinde pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar yanıtlar arasındaki dengesizlik, kronik inflamasyona ve damar duvarında aterosklerotik plakların (aterom/ateroma) oluşumuna neden olmaktadır (Engelen vd., 2022) Plağın büyümesi stenoza yani damar lümeninin daralmasına, bu daralma da çevresindeki dokuda iskemiye neden olur (Hansson & Hermansson, 2011). Plak yırtılırsa yüzeyindeki trombozu tetikler.

İskemik inme ve MI vakalarının çoğu genellikle plak yırtılması ve plak üzerinde damarı tıkayıcı bir trombüs yani pıhtı kitlesi oluşması nedeniyle meydana gelir (Hansson, 2005). Ateroskleroz erken yaşlarda başlayabilir ve on yıllarca asemptomatik olarak ileri aşamalara ulaşana kadar belirti göstermeden ilerleyebilir (Banerjee & Asrress, 2018). Bunun yanı sıra plak iyileşebilir ya da stabil bir şekilde damar duvarında yıllarca kalabilir. Aterosklerozda plak gelişimi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Aterosklerotik plak gelişimi (Cesaro vd., 2024)

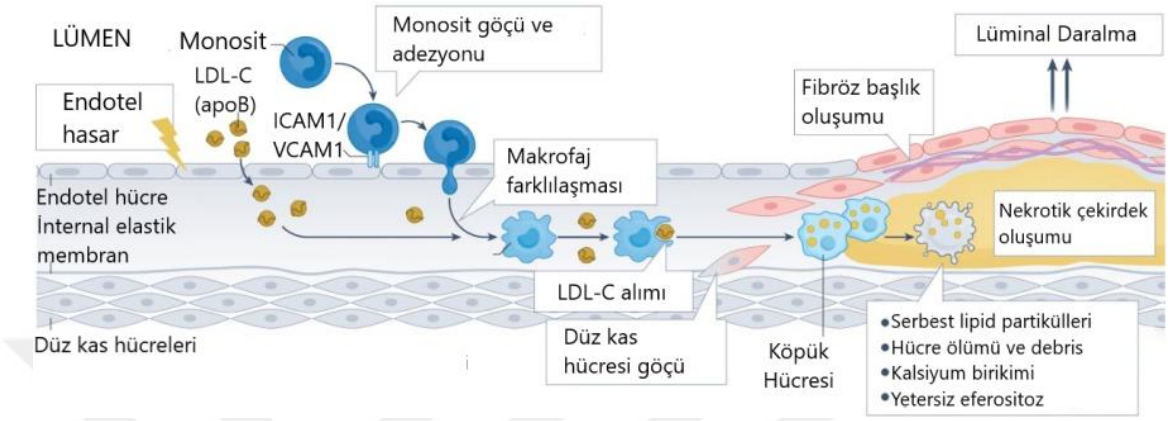
Plak oluşumu kompleks, çok faktörlü ve çok adımlı bir proses olarak lipit birikimi, inflamatuar değişiklikler, hücre göçü ve arter duvarı hasarı arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanır (Sarraju & Nissen, 2024). Plak oluşum sürecinde çeşitli hücreler, lipidler ve doku artıkları damar duvarının intima tabakasında birikir (Kong vd., 2022). İntima tabakasının lümene bakan kısmındaki endotel tabakayı oluşturan hücrelerdeki hasar gibi değişiklikler ateroskleroza zemin hazırlar (Oikonomou vd., 2018). Sağlıklı bir süreçte lökositler için geçirgen olmayan endotel tabaka, atorejenik bir durumda (örn. sağlıksız beslenme, sigara, tansiyon, diyabet vb çeşitli risk faktörlerinin etkisiyle) ise, düşük dereceli inflamasyon ile pro-inflamatuar sitokinlerin salınımı endotel hücrelerin fonksiyonunu etkiler ve geçirgen hale gelir (Soehnlein & Libby, 2021). Monositler ve T hücreleri gibi doğal ve adaptif bağışıklık hücreleri arter duvarından infiltre olur (Libby, 2012, Linton vd., 2019; Zhou vd., 2014).

Aterosklerozda inflamasyon belirtileri, arter duvarında lipit birikimiyle paralel bir şekilde ortaya çıkar (Libby, 2012). Obezite ve aşırı viseral adipoz doku, inflamasyonu ciddi şekilde tetikler (Furman vd., 2019). Kanda yüksek konsantrasyonda LDL ile taşınan

kolestrolün (LDL-C) bulunması aterosklerozun bilinen en önemli risk faktörlerindendir (Cesaro vd., 2024). Dolaşımdaki ApoB içeren bu lipoproteinler, inflamasyon durumunda intimada birikmeye başlayarak plak gelişimini başlatır. ApoB100 proteini intimada burada ECM bileşenlerinden proteoglikanlara iyonik etkileşim yoluyla bağlanır. İnflamatuar ortamda reaktif türlerin ve oksidatif enzimlerin bolca bulunması nedeniyle intimada tutulmuş olan bu lipoproteinler oksidatif modifikasyona uğrar. Bu modifiye lipidler endotel hücreleri, makrofajları, düz kas hücrelerini (SMC) ve T hücrelerini aktive eder (Hansson & Hermansson, 2011; Libby vd., 2009). Endotel hücrelerin yoğun aktivasyonuyla, yüzeylerinde çeşitli lökositlerin bağlanmasını sağlayan spesifik adhezyon molekülleri (ICAM-VCAM) salgılanır. Bunlardan özellikle Vasküler Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1), erken aterosklerotik lezyonlarda görülen lökosit tipleri olan ve en çok kronik inflamasyonda görülen monositleri ve T-lenfositleri bağlar. Monositler intimada makrofajlara dönüşür. İntimadan salgılanan kemokinler de monositlerin intimaya geçişini (göçünü) yönetir (Hansson, 2005; Hansson & Hermansson, 2011; Libby, 2012; Libby vd., 2009). Ayrıca okside-LDL monositleri doğrudan çekebilir ve endotel hücrelerden monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1) gibi moleküllerin ekspresyonunu uyarır (Glass & Witztum, 2001).

Monositlerden dönüşen makrofajlar çoğalır ve aktive olur. Aktive olmuş makrofajlar yüzeyindeki scavenger (çöpçü) reseptörleri ile okside-lipoproteinleri tanıyıp yutarak köpük hücreleri olarak bilinen lipid yüklü inflamatuar makrofajlara dönüşür (Netea vd., 2017). Bu köpük hücreleri plak başlangıcında görülen yağlı çizgilerin kaynağıdır. Gelişen plakta devam eden monosit/makrofaj göçü ve aktivasyonu scavenger reseptörlerce tutulan okside-lipoproteinler nedeniyle uyarılır. Aktive makrofajlar daha fazla kemokin salgılayarak daha çok monositin bölgeye çekilmesini sağlar (Glass & Witztum, 2001). Nispeten basit yağlı çizgilerden daha kompleks lezyonlara geçiş şu şekilde olur: Aktive olmuş endotel hücreler ve makrofajlar tarafından çeşitli kemokinler ve büyüme faktörleri salgılanır. Salgılanan bu inflamatuar uyaranlar çevrelerindeki düz kas hücreleri (veya öncü hücreleri) üzerinde etkili olarak, çoğalmalarını (proliferasyon) ve intima tabakasında birikimlerini ve ECM bileşenleri sentezini teşvik eder. Bu da fibröz plak olarak adlandırılan fibromasküler bir yapıya yol açar (Gimbrone & García-Cardeña, 2016). T hücreleri de SMC göçü, çoğalması ve ECM bileşenleri artışında önemli rol oynar (Lusis, 2000). Çoğalan ve aktive olan düz kas hücreleri de modifiye lipitleri toplayarak,

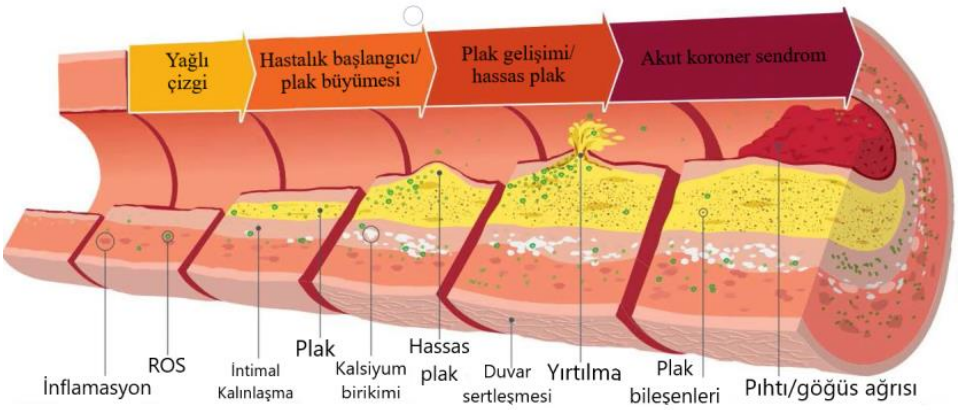
lipid yüklü makrofajlarla birlikte lipid yüklü köpük hücreleri haline gelirler ve plağın nekrotik çekirdeğini oluştururlar (Engelen vd., 2022). Köpük hücrelerinin ölümü geride büyüyen bir hücre dışı lipid kütlesi ve diğer hücre artıklarını bırakır (Lusis, 2000). Ateroskleroik plak oluşumu Şekil 2.8'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Aterosklerotik plak oluşumu (Sarraju & Nissen, 2024)

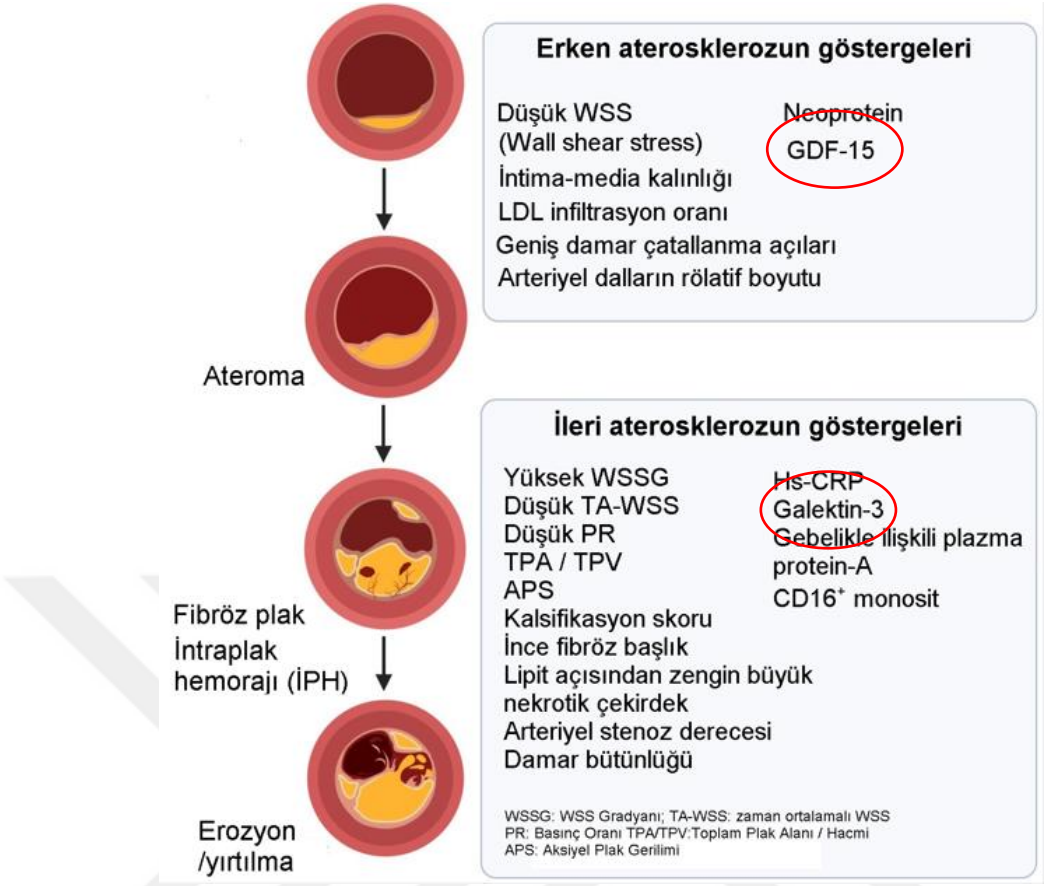
Plak büyüdükçe arter lümenin daralmasına ve kan akışının kısıtlanmasına neden olur. Plak büyümesi; düz kas hücrelerinin plak bölgesine göçü ve birikimi, ECM bileşenlerinin çoğalması, hücre içi ve dışı lipid birikimi, ölü hücre ve hücre artıklarının temizlenmesi sürecinin (eferositoz) yetersiz kalması, plağın belirli bölgelerinde kalsiyum birikimini ve inflamatuar mediyatörlerin artışını içerir. Plak gelişiminin bu bileşenleri inflamatuar sürecin kronikleşmesine katkıda bulunur ve plak yapısında değişikliklere neden olur (Sarraju & Nissen, 2024). Plağın ilerleyen aşamalarında yeniden yapılanma devam ettikçe okside-lipoproteinleri, kolesterol kristallerini, hücre artıklarını içeren lipidlerce zengin nekrotik çekirdeğin üzerini kaplayan fibröz başlık oluşur. Farklı derecelerde ECM yeniden şekillenmeleri ve kalsiyum birikimi de bu süreçte gerçekleşir (Gimbrone & García-Cardeña, 2016). Nekrotik çekirdek, arter lümeninden fibröz başlık ile ayrılır. Ancak, fibröz başlığın incelmesi ve nekrotik çekirdeğin büyümesi lüminal daralmaya yol açarak ve plağın yapısal bütünlüğünü ve stabilitesini bozarak plağın yırtılması (plak rüptürü) riskini artırır. Bu tür yırtılmaya eğilimli plaklar 'zayıf/hassas plaklar' (vulnerable plaques) olarak adlandırılır. Plak yırtılması tromboza neden olarak damar lümenini tıkayabilir, bu durum akut koroner sendromlar ve trombotik olaylar açısından yüksek risk taşımaktadır (Sarraju & Nissen, 2024). MI ve iskemik inme gibi ateroskleroz ile ilişkili trombotik olaylarda klinik vakaların önemli bir kısmı hassas

aterosklerotik lezyonların yırtılması nedeniyle oluşmaktadır (Hansson, 2005). Aterosklerotik KVH'larda plak gelişimi Şekil 2.9'da gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Aterosklerotik KVH'larda plak gelişimi (Melaku & Dabi (2021)'den uyarlandı)

Aterosklerozun gelişiminde doğal bağışıklık sistemine ait hücrelerin ve inflamatuar mediyatörlerin yani inflamatuar biyobelirteçlerin rolü kritik öneme sahiptir. Bu tez kapsamında çalışılan inflamatuar biyobelirteçler olan Gal-3 ve GDF-15 proteinlerinin aterosklerozdaki etkileri Şekil 2.10'da görülmektedir. Bu sitokinler hem inflamasyonun düzenlenmesinde hem de aterosklerotik plak oluşumunun şekillenmesinde çok yönlü etkiler göstermektedir. Örneğin GDF-15'in plak oluşumunu destekleyici işlevlerinin yanı sıra aşırı lökosit göçünü inhibe edici bir özelliğe sahip olduğu da önerilmektedir. GDF-15, özellikle yaşlanma ile ilişkili kronik sistemik inflamasyon (inflammaging) sürecinde asemptomatik aterosklerozun erken göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Gal-3'ün ise monosit göçünü arttırıcı bir rolü bulunmaktadır, Gal-3 monosit/makrofaj göçünü arttırarak vasküler inflamasyonu tetiklemektedir. Makrofajlardan salgılandığı için plak büyümesini tetikler ve plağın instabilizasyonunu arttırır (He vd., 2023; Sano vd., 2000; Wang vd., 2017).



Şekil 2.10. Galektin-3 ve GDF-15 aterosklerozda etkileri (He vd., 2023)

2.3. Kardiyovasküler Hastalıklarda İnflamasyon Biyobelirteçleri

Dünya çapında ciddi bir hastalık ve sağlık hizmeti yüküne neden olan KVH'lar erken dönemde teşhis edilirse, değiştirilebilir risk faktörleri ele alınarak ve uygun tedaviler aracılığıyla büyük ölçüde önlenebilir hale gelmektedir. KVH'ların erken önlenmesi, yüksek riskli bireylerin hastalığın belirgin evrelerinden çok önce belirlenebilmesine bağlıdır. Bu, doğru risk sınıflandırmasının önemini vurgulamaktadır. Ayrıca asemptomatik seyir gösteren hastaların oranının yüksek olması KVH'ların erken teşhisini daha da önemli hale getirmektedir. KVH'ların tanımlanması ve yönetiminde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen hala önde gelen ölüm nedenidir ve bu hastalıkların görülme sıklığı ve yaygınlığı giderek artmaktadır. Bu nedenlerle KVH'ların erken teşhisi, morbidite ve mortaliteyi minimize etmek için, hastalığı önleme ve tedavide çok önemlidir. Daha etkili tanı yöntemlerine, tedavide yeni hedeflere ve yeni biyolojik yolakların ve biyobelirteçlerin keşfine sürekli bir ihtiyaç vardır. Kardiyovasküler

olayların tahmininde artan sayıda yeni biyobelirteçler tanımlanmaktadır. Biyobelirteçler, patolojik durumlar için prognostik bilgi sağlama, teşhis ve hastalık seyrini takip etmede kritik bir araçtır (Nambi, 2018; Omran vd., 2022; Wang vd., 2017).

Biyobelirteçler nicel olarak ölçülebilen ve tekrarlanabilir özellikteki biyolojik göstergeleri kapsayan geniş bir kategoriyi ifade eder. Moleküler, histolojik, radyografik veya fizyolojik özellikleri içerebilir (Atkinson vd., 2001). İdeal bir biyobelirteç, tanımlanması beklenen sonuç için yüksek duyarlılık ve yüksek spesifiklik göstermeli, kolay ölçülebilir ve tutarlı bir şekilde tekrarlanabilir olmalı ve hastalık seyrini doğru bir biçimde yansıtabilmelidir (Vasan, 2006). Bu bağlamda biyobelirteçler hastalık seyrinin ya da tedavi etkinliğinin gerçek zamanlı takibine olanak sağlar (Parhi vd. 2025).

Kardiyak biyobelirteçler, KVH'ların erken tanı ve risk sınıflandırmasında klasik yöntemlere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Yüksek duyarlıkları sayesinde görüntüleme yöntemleri ya da elektrokardiyogram (EKG) ile saptanamayacak kadar erken doku hasarlarını (miyokard dokudaki) saptayarak erken müdahaleyi mümkün kılar. Örneğin yüksek duyarlıklı troponin testleri miyokard hasarını erken evrede tespit ederek akut MI tanısını birkaç saat içerisinde sağlar. Troponinler ayrıca kardiyak özgü profilleri ile kardiyak olmayan durumların yol açtığı yanlış pozitif sonuçların elenmesini sağlar. Kardiyak biyobelirteçler hastalığın altında yatan, iskemi, inflamasyon ya da yeniden şekillenme gibi patofizyolojik süreçler hakkında bilgi sağlayarak tanı kesinliğini artırır. NT-proBNP (N-terminal pro-beyin natriüretik peptid) gibi belirtçeler ise KY hastalarında olası kötü sonuçlar açısından yapılan risk sınıflandırmasında kullanılmaktadır. Kardiyak biyobelirteçlerin kan örnekleri gibi minimal invaziv yöntemlerle elde edilebilmesi, taramayı yüksek riskli popülasyonlarda erişilebilir kılmaktadır. Ayrıca günümüzde yapay zekâ tabanlı algoritmalarla entegre sistemler sayesinde biyobelirteç sonuçlarıyla klinik veriler birleştirilerek tanı doğruluğunun artırılması sağlanabilmektedir (Parhi vd. 2025).

Teknolojideki gelişmeler ve genomik, proteomik ve metabolomik gibi alanların gelişimi, KVH'ların yönetiminde yeni perspektifler kazandırarak önemli fırsatlar sunmaktadır (Nambi, 2018). Bu gelişmelerin klinik uygulamalara aktarılması KVH'ların nüfussal yükünü azaltmak için kritiktir. Bu bağlamda kardiyovasküler tıbbın gelişimi ile, biyobelirteç odaklı yaklaşımlar doğrultusunda, kardiyak biyobelirteçlerin stratejik kullanımı ve erken tespiti, hastalık yönetiminde erken ve doğru müdahalelere, risk

sınıflandırmasının iyileştirilmesine, doğru tedavi hedefleri yaklaşımına ve maliyet etkin hasta bakımı sağlanmasına katkıda bulunması beklenmektedir (Wang vd., 2017; Zipes, 2018).

KVH'larda etkili önleyici stratejiler uygulanmasında temel bir unsur kardiyovasküler risk sınıflandırmasıdır, günümüzde bu stratejiler yaşam tarzı değişikliklerine ve geleneksel risk faktörlerinin en iyi şekilde kontrol edilmesine odaklıdır. Ancak bazı hastalar risk faktörleri optimal şekilde kontrol edilmesine rağmen, sistemik ve vasküler inflamasyon nedeniyle gelecekteki kardiyovasküler olay bakımından yüksek risk altında bulunabilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda risk sınıflandırmasını daha hassas hale getirmek amacıyla inflamatuar yükün rutin olarak değerlendirilmesi giderek daha fazla kabul görmektedir. Bu kavram rezidüel inflamatuar risk olarak adlandırılmaktadır (Antonopoulos vd., 2022; Arnett vd., 2019). Rezidüel inflamatuar riskin tanımlanması, çeşitli görüntüleme teknikleri ve vasküler inflamasyonu tespit etmek aracılığıyla gerçekleştirilir. Vasküler inflamasyonun tespitinde en yaygın kabul gören strateji dolaşımdaki inflamasyon biyobelirteçlerinin ölçülmesini içermektedir (Antonopoulos vd., 2022). Biyobelirteçlerin ileri kardiyak görüntüleme yöntemleri (örn. kardiyak nükleer manyetik rezonans görüntüleme ve bilgisayarlı tomografi) ile entegrasyonu, özellikle miyokardit ya da kardiyomiyopati gibi karmaşık olgularda tanısal kesinliği artırabilir (Parhi vd., 2025).

İnflamatuar biyobelirteçler KY'nin geniş yelpazedeki sendromlarında hastalık şiddeti ve prognozu ile güçlü bir ilişki göstermektedir (Hartupee & Mann, 2013). Dolayısıyla inflamatuar biyobelirteçler çeşitli KVH tahmininde potansiyel biyobelirteçler olarak kabul edilir (Braunwald, 2008). Akut inflamatuar yanıt ile karakterize akut koroner sendromlarda yüksek pro-inflamatuar belirteç seviyeleri ve düşük anti-inflamatuar sitokin konsantrasyonu rapor edilmiştir (Gori vd., 2009). Son çeyrek asırda aterosklerozun düşük-seviyeli, steril, kronik inflamatuar bir hastalık olarak tanınması KVH'ların varlığının ve ilerlemesinin izlenmesinde kullanılan inflamasyon biyobelirteçleri üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmasında özellikle tetikleyici olmuştur. Bu hipotez, CANTOS, JUPITER gibi geniş kapsamlı klinik çalışmaların sonucunda daha da kalıcı hale gelmiştir.

Sistemik inflamasyonda önemli bir yeri olan yüksek duyarlıklı-CRP (hsCRP) ve plazmada proinflamatuar sitokinler, geleneksel risk faktörlerinin ötesinde

kardiyovasküler risk tahmini ile ilişkilendirilmiştir ve inflamasyon risk konseptini desteklemektedir (Antonopoulos vd., 2022; Hansson, 2005; Ridker vd., 2000; Soehnlein & Libby, 2021). İnflamasyon biyobelirteçlerini gelecekteki kardiyovasküler risk ile ilişkilendiren ilk önemli çalışmalar 1990'ların ortalarında gerçekleştirilmiştir ve o zamandan günümüze inflamasyonun biyolojik süreçlerinin klinik uygulamalara çevrildiği bir döneme girilerek, inflamatuar biyobelirteçlerinin tanımlanmasıyla risk tahmini, tedavi takibi ve tedavi yönetimi gibi amaçlarla kullanımı, klinik uygulamalar bakımından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Libby vd., 2009; Ridker, 2016; Soehnlein & Libby, 2021).

İnflamasyonun kalp yetmezliğinin birçok formunun gelişmesi ve ilerlemesindeki önemli rolü nedeniyle, inflamatuar biyobelirteçler yoğun araştırmaların konusu haline gelmiştir (Braunwald, 2008). En iyi bilinen geleneksel inflamasyon biyobelirteçlerden biri CRP, güçlü bir sistemik inflamasyon biyobelirteci olup, çoğu durumda seviyesindeki azalmalar klinik fayda ile ilişkilendirilmiştir. Klinik uygulamada kardiyovasküler riski değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanımaktadır (Parhi vd., 2025). hsCRP olarak adlandırılan yüksek hassasiyetli ve düşük maliyetli bir testinin geliştirilmesiyle birlikte CRP'nin biyobelirteç olarak kullanımı artmıştır (Ridker, 2001). hs-CRP, KVH'larla ilişkili düşük-seviyeli inflamasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir biyobelirteçtir. Gelecekteki kardiyovasküler risklerin (örn kalp krizi, inme) bağımsız bir belirleyicisi olarak ve tekrarlayan kardiyovasküler olayların prognozunda kapsamlı bir şekilde tanımlanmış olup, birincil önleme stratejilerinde risk değerlendirme modellerine dahil edilmiştir. Artan seviyeleri MI ve inme riskinin artışıyla ilişkili bulunmuştur (Parhi vd., 2025; Ridker vd., 2000; Zhao vd., 2024). CRP seviyesinin, stabil olmayan anjina ya da akut MI öyküsü olup koroner arter hastalığı tekrarlama riski olan hastalarda prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (FDA-NIH Biyomarker Çalışma Grubu, 2016).

Geleneksel biyobelirteçler arasında bulunan, temel pro-inflamatuar sitokinlerden TNF-α ve CRP salınımının ana uyaranı olan IL-6, endotel disfonksiyonu, plak instabilizasyonu ve olumsuz kardiyovasküler sonuçlarla ilişkili olarak gelecek kardiyovasküler durumların tahmininde kanıtlanmış biyobelirteçlerdir (Abubakar vd., 2024; Mann, 2015; Ueland vd., 2015). TNF-α ve IL-6 seviyeleri KY'nde artmaktadır ve bu biyobelirteçler artan ölüm riski ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca KY tedavisi ile TNF-

α ve IL-6 seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Murray & Freeman, 2003; Vasan vd., 2003).

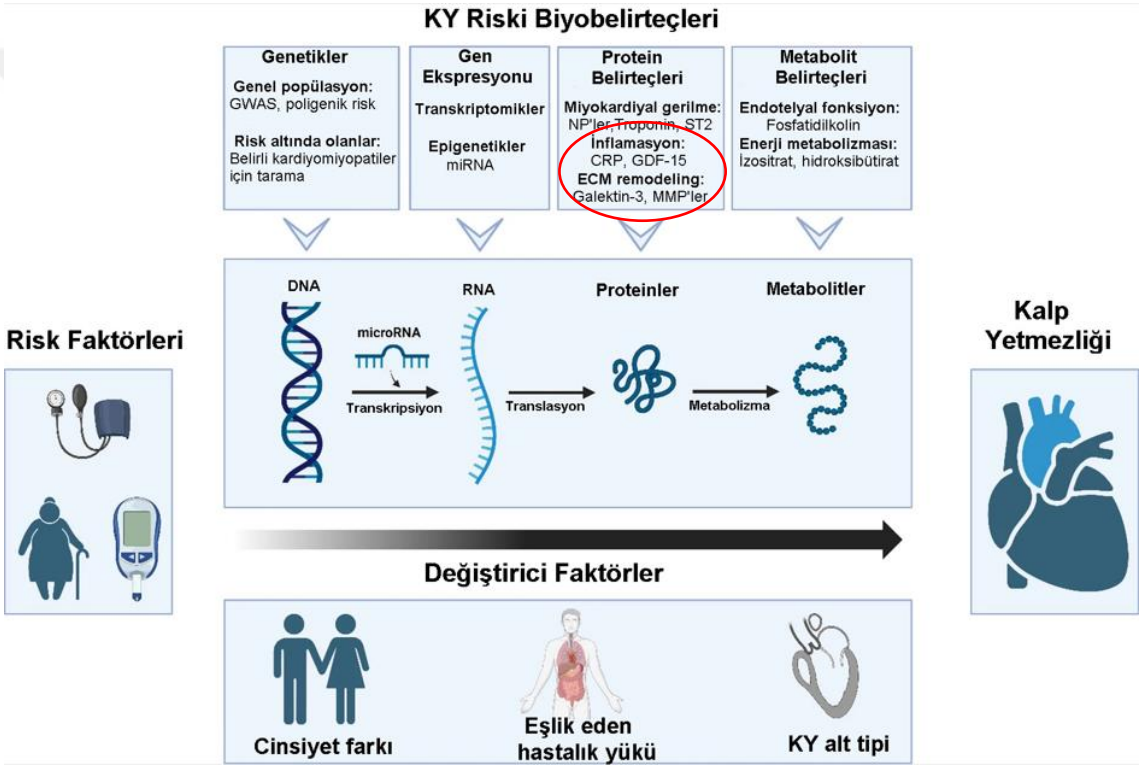
Önemli geleneksel biyobelirteç grubundan bir diğeri, kardiyovasküler sistemde homeostazın korunmasında kritik rolü olan Natriüretik peptidlerdir (NPs). Beyin natriüretik peptid (BNP) ve N-terminal proBNP (NT-proBNP) KY, stabil KAH ve akut koroner sendrom gibi kardiyovasküler olaylarda sağladığı ilgili prognostik bilgiler nedeniyle kullanışlı biyobelirteçlerdir. Natriüretik peptid (NP) seviyesinin değerlendirilmesi, akut kalp yetmezliği hastalarında tanı ve ve prognozda kritik bir öneme sahip olup yaygın olarak kullanılmaktadır ve geçerli kılavuzlarda önerilmektedir (Goryacheva vd., 2022; Pang vd., 2012). NP seviyelerinin ayrı ayrı ve hasta bazında değerlendirilmesi gerekebilir. BNP diğer NP'lere göre inflamasyondan daha fazla etkilenmektedir ve inflamasyonun baskın olduğu durumlarda BNP seviyeleri daha fazla artış göstermektedir. BNP, bu nedenle diğer NP'lere göre kardiyovasküler rahatsızlıklarda tanısal ve prognostik amaçlar için daha iyi bir biyobelirteç olarak görülmektedir. (Ogawa & de Bold, 2012).

Kardiyak (miyokardiyal) dokuya özgü biyobelirteçler, özellikle kardiyak troponinler (cTroponin I (cTnI), cTroponin T (TnT)) MI teşhisinde kullanılan biyobelirteçlerdir (Osredkar vd., 2024). Yüksek duyarlıklı troponin testleri, MI'nün klasik erken semptomlarıyla birlikte, erken saatlerde tespit edilmesini sağlamaktadır. (Wang vd., 2017). Bu yönüyle acil servis departmanlarında kalp krizi doğrulamasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Musunuru vd., 2017). Bununla birlikte, troponin düzeyleri her ne kadar MI teşhisinde gerekli olsa da akut koroner sendrom (AKS) ile ilişkili tüm patobiyolojik süreçleri yansıtmaz. Özellikle inflamasyon, sol ventrikül disfonksiyonu ve hemodinamik stres gibi faktörleri değerlendirmek için tamamlayıcı biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Abubakar vd, 2024). Klinik olarak kardiyak troponinlerin MI dışında ve yokluğunda KY, miyokardit, pulmoner emboli gibi KVH'lar için gösterge sunabileceği bildirilmiştir (Parhi vd., 2025).

Kardiyovasküler risk değerlendirilmesini iyileştirebilmek, KAH için terapötik müdahaleleri geliştirebilmek için yeni ölçülebilir humoral ve genetik belirteçlerin araştırılması sürdürülmektedir. Hamilelik ile ilişkili plazma proteini A, miyeloperoksidaz ve matriks metaloproteinazları akut koroner sendrom tahmini, lipoprotein-ilişkili

fosfolipaz A2 ve salgılanan fosfolipaz A2 gibi biyolojik moleküller, görülen ve tekrar eden kardiyovasküler olaylar ile ilişkili bulunmuştur. Son olarak NP'lerin yanı sıra; Gal-3, ST2, endotelin-1 ve kopeptin, bir MI'nü takiben ölüm ve kalp yetmezliği tahmininde iyi tanımlanmış biyobelirteçlerdir ve kalp yetmezliği risk sınıflandırması için bilgi sağlamaktadırlar. miRNA'ların biyobelirteç olarak değerlendirilmesi gibi hızla gelişen yeni alanlar da araştırmalara konu olmaktadır. Bu biyobelirteçlerin hepsi, aterosklerozun farklı aşamalarında da etkili olabilir (Abubakar vd., 2024; Wang vd., 2017).

Şekil 2.11'de, KY riskinin erken teşhisi için kullanılabilecek dolaşımdaki biyobelirteçler ve risk faktörleri gösterilmektedir.



Şekil 2.11. KY riski biyobelirteçleri (Kosyakovsky vd., 2024)

Şekildeki protein temelli biyobelirteçler miyokardiyal stres, inflamasyon, ECM yeniden şekillenmesi gibi patofizyolojik kategorilerde sınıflandırılmıştır. Ancak bu kategoriler biyolojik süreçlerin kompleksliği nedeniyle birbiriyle örtüşmektedir, örneğin CRP ve GDF-15'in yanı sıra Gal-3 ve ST2 de inflamatuar fonksiyonları nedeniyle inflamasyon kategorisinde de değerlendirilebilir (Kosyakovsky, 2024). Protein biyobelirteçlerine ek olarak miRNA'lar gibi transkriptomik biyobelirteçler ve metabolit belirteçlerinin keşfine olanak sağlayan son yıllardaki moleküler tanı alanındaki

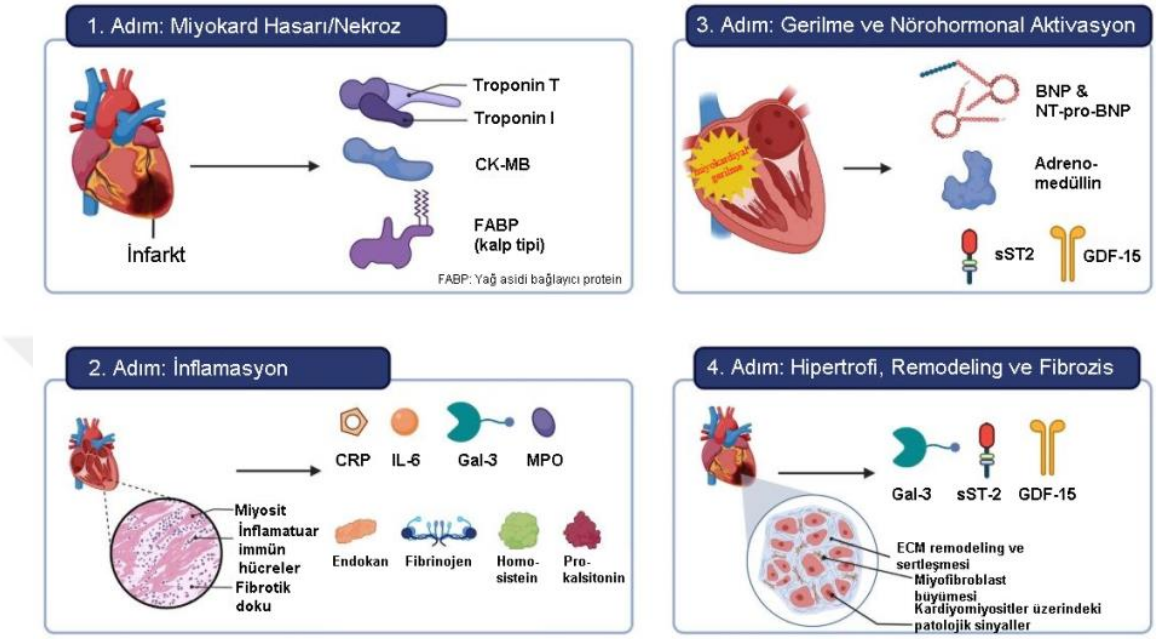
gelişmeler doğrultusunda genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik düzeyde tüm biyolojik süreçleri kapsayan araştırmaların konusu haline gelmiştir (Wang vd., 2017). Şekil 2.12'de biyobelirteçlerin değerlendirilmesinin cinsiyet farklılıkları, eşlik eden hastalıklar (komorbidite), KY alt türleri arasındaki değişkenler gibi modifiye edici faktörlerin dikkate alınarak yapılması vurgulanmıştır (Kosyakovsky vd., 2024).

GDF-15, Gal-3 ve sST2; inflamasyon, kardiyak yeniden şekillenme ve fibröz KVH patogenezinde temel biyolojik yolakları yansıtan çok sayıda aday biyobelirteç arasında, KVH'ların en güçlü belirleyicileri olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca Gal-3 ve sST2'nin klinik kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (Tuegel vd., 2019).

GDF-15, klinik uygulamada kardiyovasküler risk değerlendirmesi için en umut verici yeni humoral biyobelirteçlerden biri olarak sunulmaktadır (Schwarz vd., 2023). KY'de de üstün duyarlılık ve özgüllük sunan sonuçlarıyla, yeni biyobelirteçlerden sayılmaktadır (Elsewify vd., 2022). TGF-β ailesinin atipik bir üyesi olan GDF-15, KVH'larda inflamasyon biyobelirteci olarak tanımlanmıştır ve olumsuz prognozla ilişkilidir. Dolaşımdaki GDF-15 seviyesi, MI, (örn. post-AMI), KY ve ateroskleroz, kalp basıncının aşırı yüklenmesi gibi durumlarda belirgin bir şekilde artış göstermektedir (di Candia vd., 2021; Khan vd., 2009). KY hastalarında tüm nedenlere bağlı ölümlerin güçlü bir prognostik belirleyicisi olarak da literatürde tanımlanmıştır (George vd., 2016; Kempf vd., 2007; Lindholm vd., 2018; Wollert vd., 2017). GDF-15 gelecekteki kalp yetmezliğini ön görmede, CRP ve BNP ile birlikte KY'nin ortak biyobelirteçleri olarak nitelendirilmektedir (Kosyakovsky vd., 2024). Çalışmalar GDF-15'in AKS'da prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Abubakar vd., 2024).

Gal-3, lektin protein sınıfının galektin ailesinin bir üyesidir. KY, ateroskleroz ve diğer birçok KVH'ın da dahil olduğu çeşitli akut ve kronik durumlarda inflamasyonu başlatıcı bir rol alır (Abubakar vd., 2024). İnflamasyonla başlayan fibröz gelişimi, remodelling, miyofibroblast proliferasyonu gibi süreçler ile ilişkili olarak, KY patofizyolojisinde etkilidir (De Boer vd., 2009). Miyokardiyal fibröz KY gelişimi ve ilerlemesinde baskın bir etken olup (Frangogiannis, 2017), bu alanda en kapsamlı şekilde araştırılmış olan biyobelirteçler Gal-3 ve çözülebilir ST-2 (sST-2)'dir (Eltelbany vd., 2022). Gal-3, FDA tarafından 2010 yılında KY risk sınıflandırması için yeni bir biyobelirteç olarak onaylanmıştır.

Gal-3, sST2 ve GDF-15 gibi biyobelirteçlerin Akut koroner sendromunun (AKS) ilerlemesinde birden fazla kategoride yer alması çok yönlü ve karmaşık patofizyolojik rollerini vurgulamaktadır. AKS'nin çeşitli aşamalarında rol oynayan biyobelirteçler Şekil 2.12'de gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Akut koroner sendromun çeşitli patolojik aşamalarında biyobelirteçler (Abubakar vd., 2024)

2.3.1. Büyüme Farklılaşma Faktörü-15 (GDF-15) Proteini

Büyüme/farklılaşma faktörü-15 (Growth Differentiation Factor-15, GDF-15), TGF-β süper ailesinin atipik bir üyesidir ve inflamatuar kaskatta merkezi bir rolü olan, yaklaşık 25-35 kDa büyüklüğünde, kalp ve karaciğer dokuları dahil olmak üzere çeşitli dokulardan salgılanan bir sitokindir (Bootcov vd., 1997; Böttner vd., 1999). TGF-β (Transforming Growth Factor- β; Transforme Edici Büyüme Faktörü- β) süper ailesi, embriyonik gelişim, homeostazinin korunması, hastalık süreçleri (ECM depozisyonu, skar oluşumu vb.) ve doku onarımı gibi çeşitli hayati fonksiyonda rol oynayan çok sayıda proteini kapsayan, büyük bir protein ailesidir (Massagué, 1998).

GDF-15, kardiyovasküler sistemde kardiyomiyositler, makrofajlar, endotel hücreler (ECs), vasküler düz kas hücreleri (VSMCs) gibi çeşitli hücre tiplerinden ve ayrıca adipoz dokudan eksprese olur (Schwarz vd., 2023).

GDF-15, insanda kromozom 19 p13.11'da yer alan iki ekzon (309 ve 891 bp uzunluğunda) ve bir introdan (2.9 kb) oluşan MIC-1/GDF-15 geni tarafından kodlanır (Unsicker vd., 2013). Bu genin translasyon ürünü pre-pro-GDF15 proteini 308 amino asitten oluşur, bu yapının 3 ana segmenti bulunur; sinyal peptidi (29 aa), pro-peptid (167 aa), olgun peptid (112 aa) (Adela & Banerjee, 2015). N-terminalde bulunan sinyal peptidinin uzaklaştırılmasının ardından, pro-peptid zincirleri disülfit bağıyla dimerleşerek pro-GDF15 dimerini oluşturur. Ardından proteolitik işlemlerle pro-peptid bölgesinin ayrılmasıyla biyolojik olarak aktif olan 25 kDa'luk olgun formu olan homodimerik GDF-15 dolaşıma salınır (Li vd., 2024). GDF-15 proteinin kristal yapısı Şekil 2.13'te verilmiştir.

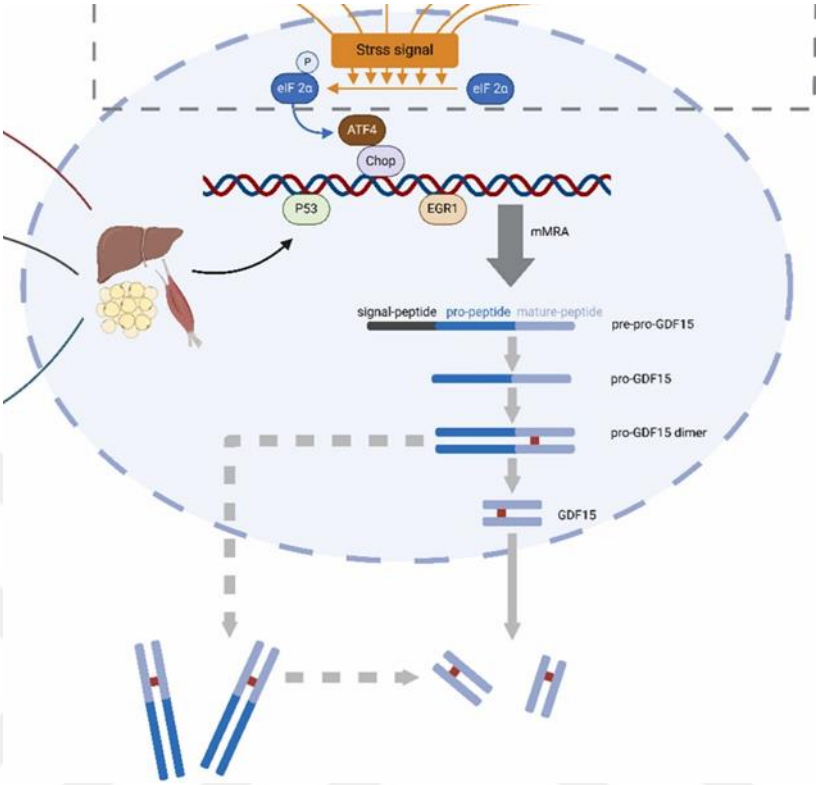


Şekil 2.13. GDF-15 proteininin kristal yapısı (5VT2-RCSB PDB, 2017)

Hücre içi sinyal yollarında, GDF-15'in transkripsiyonu p53 ve EGR-1 (early growth response transcription factor) gibi stresle ilişkili transkripsiyon faktörleri aracılığıyla düzenlenirken, sekresyon süreci, ER-Golgi yolundan geçerek plazmaya salınan aktif formun oluşmasıyla tamamlanır (Unsicker vd., 2013). Olgun GDF-15 formu salgılanmasının ardından hızla dolaşıma geçerken propeptid formu da ECM'de lokalize olup GDF-15 proteinin doğru katlanmasını denetleyen bir kontrol mekanizması olarak işlev görür (Bauskin vd., 2000).

GDF-15'in ekspresyonu fizyolojik koşullarda (plasenta hariç) sınırlıdır; normalde kardiyak dokuda düşük düzeyde bulunurken, inflamatuvar uyaranlar, metabolik stres ve hücresel hasar gibi durumlarda indüklenen GDF-15 plazma düzeyleri, inflamasyonun

sistemik ve lokal etkilerinin bir sonucu olarak artış göstermektedir (George vd., 2016; Schwarz vd., 2023).



Şekil 2.14. GDF-15'in sentezi, olgunlaşması ve salınımı (Li vd., 2024)

GDF-15 hücre içi hasar, oksidatif stres ve inflamatuar sinyallerle hızla uyarılır, bu yönüyle hücresel stresin hassas bir göstergesidir (Şekil 2.14). İnflamasyonla artışı baskın olarak bir stres-duyarlı transkripsiyon faktörü olan p53 üzerinden yürümektedir (Li vd., 2024). GDF-15'in hücresel düzeydeki etkileri; ayrıca SMAD ve Hippo gibi sinyal yolakları üzerinden transkripsiyonel düzenlemeleri de içermektedir. Bu yönüyle GDF-15, yalnızca bir inflamatuvar yanıt belirteci değil, aynı zamanda kardiyometabolik stresin düzenleyicisi ve potansiyel bir terapötik hedef olarak da değerlendirilmiştir (Baek & Eling, 2019).

GDF-15, 1990'lı yılların sonlarına doğru, TGF-β süperailesinin uzak bir üyesi olarak, birbirlerinden bağımsız yürütülen araştırmalarda, keşfedilmiş ve klonlanmıştır. En az 7 farklı araştırma grubunca eş zamanlı olarak tanımlanan protein, 1997 yılında dört ayrı araştırma grubu tarafından karakterize edilmiştir, bu paralel keşiflerin her biri, gen tanımlama çalışmalarına, klonlama stratejilerine ve keşfedilen biyolojik işlevine odaklı

olarak farklı isimlerle anılmıştır (Bootcov vd., 1997; Böttner vd., 1999; Hromas vd., 1997; Lawton vd., 1997; Paralkar vd., 1998; Unsicker vd., 2013). Başlangıçta makrofajlarda "Makrofaj İnhibitör Sitokin-1 (MIC-1)" olarak adlandırılan bu protein, IL-1β, IL-2, and TNF-α gibi sitokinler tarafından aktive edilebilen bir gen olarak tanımlanmıştır (Bootcov vd., 1997). GDF-15 aynı zamanda NAG-1 (non-steroid anti-inflamatuar ilaç [NSAID] ile aktive gen-1) veya plasentada tanımlandığında PLAB (plasental kemik morfogenetik protein), PTGF- β (plasental dönüşüm büyüme faktörü-beta) ve ayrıca PDF (prostat kaynaklı faktör) gibi isimlerle de literatüre girmiştir (Hromas vd., 1997; Lawton vd., 1997). Bu çoklu adlandırma, GDF-15'in farklı doku ve hücre tiplerinde geniş bir ekspresyon yelpazesine sahip olduğunu ve bağlam bağımlı etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Son yıllarda beyinde GDF-15 için GFRAL-RET (GDNF family receptor alpha-like proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret) olarak adlandırılan bir reseptörün tanımlanması gibi bulgular bu molekülün "hormon" olarak da isimlendirilmesine yol açmış ve metabolik ve nörolojik hastalıklar ile ilişkisi yeniden değerlendirilmeye alınmıştır (Lockhart vd., 2020).

GDF-15'in biyolojisi henüz tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Schwarz vd. (2023) tarafından, aterosklerotik plak yırtılmasına neden olan inflamatuar süreçlerde akut-faz modülatörü olarak önerilmiştir. Bu durum, onun sadece bir belirteç değil, aynı zamanda aktif bir patofizyolojik mediyatörü de temsil ettiğini düşündürmektedir. Luan vd. (2019), GDF-15'in akut inflamasyonda koruyucu bir etki gösterdiğini ve sağkalımı desteklediğini bildirmişlerdir. GDF-15'in bakteriyal ve viral enfeksiyonlardaki rolüne odaklanan çalışmalarında, sağkalım için gerekli olduğunu ve koruyucu etkilerinin patojen kontrolünden ve inflamasyonun büyüklüğünden bağımsız olarak hastalık toleransında bir rolü olduğunu da önermektedirler. Tolerans, patojen varlığına adaptasyonu ifade eder. GDF-15'in inflamatuar hasara karşı toleransı trigliserit metobilizmasının düzenlenmesi yoluyla koordine ettiğini göstermişlerdir. Bunun akut durumda "kalbin metabolik taleplerini destekleyerek, kalp hasarını ve kalp yetmezliğini önlediğini" ifade etmektedirler.

GDF-15'in inflamasyon ile ilişkisi, literatürde birçok çalışmayla ortaya konmuştur, özellikle KVH'lar başta olmak üzere inflamasyon temelli diğer birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Bootcov vd., 1997; Luan vd., 2019). GDF-15'in kardiyovasküler olayların ve bunlarda tüm nedenlere bağlı ölümleri öngörmede güçlü bir

belirleyici olduğu bildirilmiştir ve klinik çalışmalar risk sınıflandırmasındaki potansiyelini ortaya koymaktadır (George vd., 2016; Kempf vd., 2007; Lindholm vd., 2018; Wang vd., 2017; Wollert vd., 2017).

KVH'larda, inflamasyon ve doku yeniden yapılanma gibi süreçlerle ilişkili çok boyutlu bir biyobelirteç olarak değerlendirilen GDF-15, özellikle, KY ve aterosklerozda; akut koroner sendrom, koroner arter hastalığı gibi patolojilerde erken tanı, risk sınıflandırması ve prognozda giderek artan bir ilgiyle araştırılmaktadır (Li vd., 2020; Lindholm vd., 2018; Sawalha vd., 2023; Unsicker vd., 2013).

Kardiyovasküler hastalıkların gelişimi, ilerlemesi ve hastalığın prognozu hakkında geleneksel risk faktörlerinin öngöremediği ve hs-CRP, natriüretik peptidler ve kardiyak troponinleri gibi yaygın biyobelirteçler ile dahi tanımlanamayabilen durumlarda ek bilgiler sağladığı belirtilmektedir (di Candia vd., 2021; Schwarz vd., 2023; Wang vd., 2017). Bu bağlamda GDF-15 gelecekteki kalp yetmezliği olasılığını ön görmede, CRP ve BNP ile birlikte KY'nin ortak biyobelirteçleri olarak anılmaktadır (Kosyakovsky vd., 2024). GDF-15'in diğer biyobelirteçlerle birlikte değerlendirilmesi, hastalık seyrinin daha hassas takibi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından umut vadetmektedir. Ayrıca geleneksel risk faktörleriyle açıklanamayan durumlar için önemli bir tanısal boşluğu doldurabilir.

Literatürde dolaşımdaki GDF-15 seviyeleri için verilen aralıklar değişkendir. Kempf vd. (2007) kronik kalp yetmezliği hastalığında, hasta popülasyonun %75'inde GDF-15 seviyesinin 1200 pg/mL'den büyük olduğunu ve bu seviyeyi sağlıklı yetişkin bireyler için üst limiti olarak bildirmiştir. Bazı çalışmalarda normal dolaşım seviyesinin ≤0.25 veya ≤0.40 ng/mL; metabolik hastalıklara odaklanan çalışmalarda ise 0.15–1.15 ng/mL gibi değerler bildirilmiştir (Li vd., 2024; Schwarz vd., 2023). Bu nedenle normal referans aralıklarının standardizasyonu halen araştırma gerektiren bir alandır. Özellikle yaş, obezite, renal fonksiyon gibi faktörler dolaşımdaki GDF-15 seviyelerini etkilemektedir. Bu nedenle dikkatli şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir (Li vd., 2024; Schwarz vd., 2023). Ticari olarak satılan ELISA kitlerinin tayin aralıkları ise 25-1500 pg/mL, 1.1-800 pg/mL gibi aralıklardadır (Bio-techne, t.y.; Thermo Fisher, t.y.). 2022 yılında yayımlanan, 18-98 yaşları arası toplam 21476 katılımcı ile yapılan bir kohort çalışmasında serumda GDF-15 konsantrasyonları; geçmiş kalp hastalığı ve inme

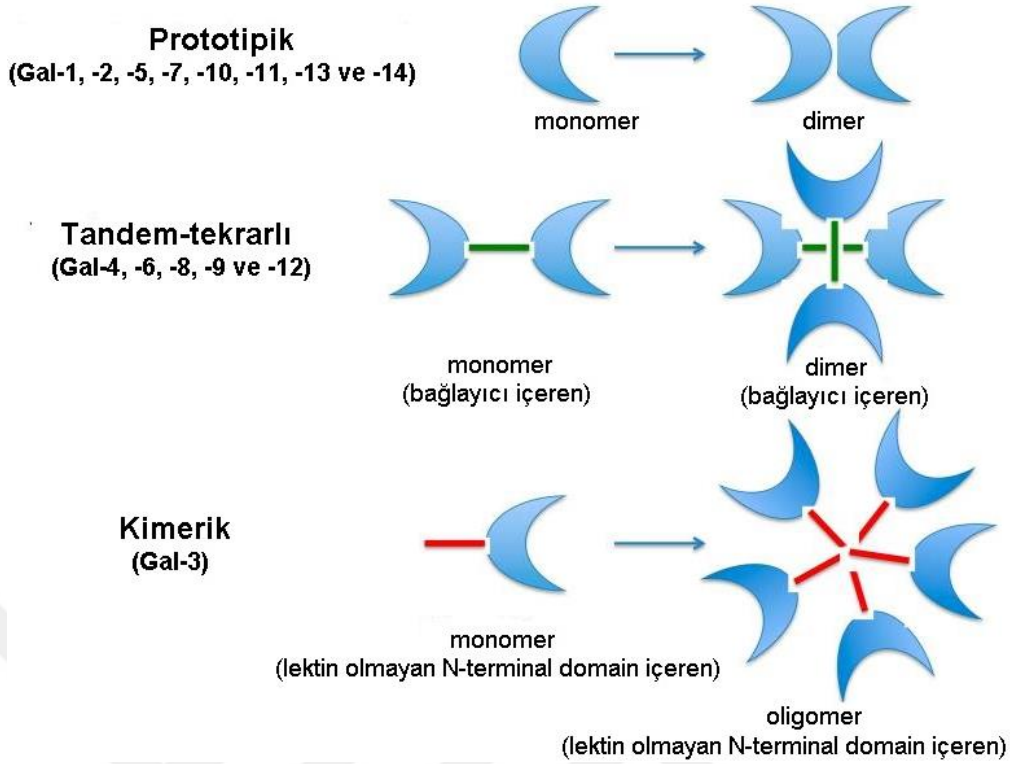
geçirenlerin 1306 pg/mL, kalp krizinde 1776 pg/mL, hamilelikte ise 19311 pg/mL olarak bildirilmiştir. Referans değerlerini belirlemek için sağlıklı bireylerde ortalama GDF-15 konsantrasyonları kadınlarda 816 pg/mL, erkeklerde 793 pg/mL olarak hesaplanmıştır (Welsh vd., 2022).

2.3.2. Galektin-3 Proteini

Galektinler, β-galaktoz içeren glikanlara afinite gösteren küçük ve çözünür lektinlerdir (Barondes vd., 1994b). Galektinler sitoplazmada sentezlenerek hem çekirdekte hem de sitoplazmik bölgelerde işlev görürler. Bunun yanında, plazma membranı dışına ECM'ye salgılanarak dolaşımda da mevcut bulunurlar (Suthahar vd., 2018). Omurgalılarda 16 galektin geni tanımlanmış olup bunlardan 12'sinin insanda eksprese olduğu bildirilmiştir (Kaminker & Timoshenko, 2021). Galektinler inflamasyon, immün yanıt, adezyon, hücre göçü ve hücresel sinyalleşme gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alır ve bu proteinler kalp hastalıkları, fibröz, kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Johannes vd., 2018).

Galektinler, her biri ~130 aminoasitten oluşan bir ya da iki adet korunmuş karbonhidrat tanıma bölgeleri (carbohydrate recognition domains, CRDs) içermektedir (Barondes vd., 1994b). Lektin sınıfı proteinler CRD bölgeleri aracılığıyla spesifik glikokonjugatları, glikan yapıları tanıyarak fonksiyon gösterir (Taylor vd., 2017). Galektinler, CRD sayılarına ve yapısal özelliklerine göre prototip, tandem-tekrarlı ve kimerik olmak üzere üç alt türe ayrılırlar (Şekil 2.15).

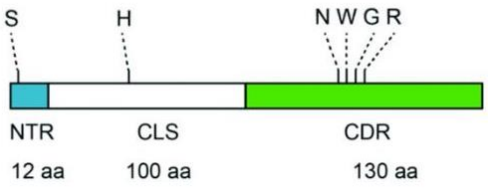
Galektin-3 (Gal-3) galektin ailesinin kimerik yapıya sahip tek üyesidir, kimerik yapısı C-terminal bölgesinde yer alan tek bir CRD ve N-terminal'de oligomerleşmeye olanak tanıyan prolin/glisin açısından zengin bir bölgeden oluşur. Gal-3 aynı zamanda pentamerize olabilen tek galektindir (Kaminker & Timoshenko, 2021) (Şekil 2.15). Bu iki farklı bölgeli yapı Gal-3'e hem yapısal hem de işlevsel olarak belirgin bir çeşitlilik kazandırarak onu çok yönlü bir biyomolekül haline getirir.



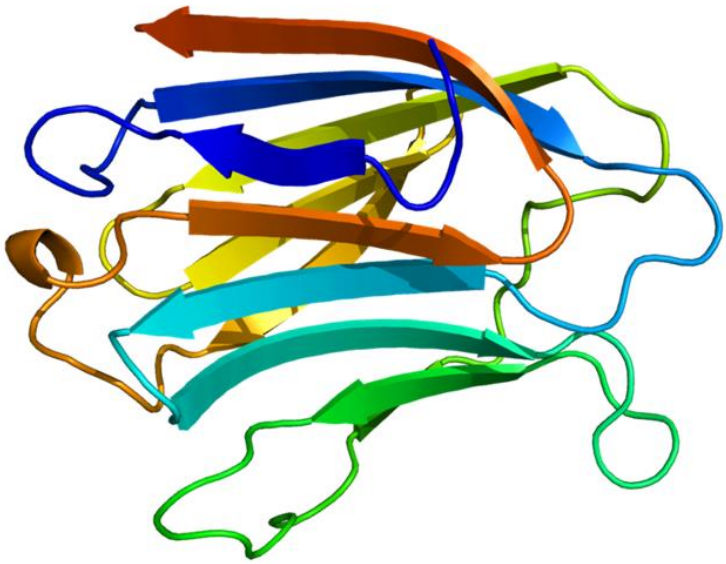
Şekil 2.15. Galektinlerin yapısı (Sciacchitano vd., 2018)

İnsan Gal-3'ü 35 kDa moleküler ağırlığa sahip, çözünür yapıda kimerik bir proteindir ve insan genomunda kromozom 14'ün q21-22 bölgesinde bulunan Gal-3'ü kodlayan tek gen olan LGALS3 geni tarafından kodlanır (Kadrofske vd., 1998; Raimond vd., 1997). Gal-3 proteinin iki birbirinden farklı temel bölgesi bulunur, bunlar, bir adet CRD içeren C-terminal domain ve kendine özgü bir N-terminal domainidir (Şekil 2.16). Lektin özelliği göstermeyen NT domaini, yaklaşık 110-130 aminoasit (aa) uzunluğunda nispeten esnek yapıda çok sayıda (7-14) homolog tekrarlı diziden oluşmaktadır ve Gal-3'e oligomerleşme yeteneğiyle fonksiyonel çeşitlilik kazandıran bölgedir (Seetharaman vd., 1998). NTD'in tekrarlayan bölgeden önceki ilk 12 aa'lik bölgesi NTR (N-terminal region) olarak adlandırılır. Bu bölge serin-6 rezidüsünün kazein kinaz 1 ve 2 tarafından fosforilasyonu ile nükleer translokasyonu Gal-3'ün ligand afinitesini düzenler. NTR ile CRD arasında yaklaşık 100 aa içeren kolajen-benzeri dizilim (collagen-like sequence, CLS) olarak adlandırılan bir bölge bulunur. Bu uzun kuyruk MMP'ler tarafından hedef alınan histidin-64 içeren H-bölgesine sahiptir (Clementy vd., 2018). CRD ise, yaklaşık 130 aa'den oluşan, tıpkı diğer galektinlerde olduğu gibi karbonhidratlara bağlanmayı sağlayan globüler (küresel) bir konformasyon oluşturarak, oligosakkaritlerin β-galaktoz

içeren laktozamin tekrarlarına bağlanmayı sağlar (Şekil 2.17). Gal-3' ün ligand afinitesi, bağlanacağı zincirdeki laktozamin tekrarlarının sayısı ile doğru orantılıdır. Bu bölgenin bir başka özelliği, anti-apoptopik BCL-2 proteinlerinde bulunanlarla benzerlik gösteren bir NGWR (Asp-Trp-Gly-Arg) motifini içermesidir. Bu motifin Gal-3 moleküllerinin herhangi bir ligand bulunmadığında kendi aralarında agregasyonuna aracılık ettiği düşünülmektedir (Barondes vd., 1994a; Clementy vd., 2018).



Şekil 2.16. Gal-3'ün protein yapısı (Clementy vd., 2018)



Şekil 2.17. İnsan Gal-3'ün CRD'ine ait yüksek çözünürlüklü X-ışını kristal yapısı (PDB, 2018)

Galektin-3, ilk olarak Ho & Springer (1982) tarafından murine (fare) makrofajlarında tanımlanmış, makrofajlara özgü bir spesifik belirteç olduğu düşünülerek makrofajların belirli bir alt popülasyonunu tanımlamadaki rolü nedeniyle Mac-2 olarak isimlendirilmiştir. Ho & Springer (1982)'a göre, Mac-2, güçlü inflamatuar uyarıcılara yanıt veren makrofajlarda spesifik olarak indüklenen önemli bir yüzey bileşeni olarak

dikkat çekmiştir. Sonraki yıllarda farklı araştırma gruplarınca bağımsız olarak CBP30 ya da CBP35 (Massa vd., 1993), IGeBP ya da eBP (Cherayil vd., 1989; Robertson vd., 1990), L29 (Massa vd., 1993), L34 (Raz vd., 1987) gibi çeşitli isimlerle izole edilmiştir, 1994 yılına ise tüm bu isimlerin aynı proteini tanımladığı görüşüyle Galektin-3 adı literatürde kabül görmüştür (Barondes, vd., 1994a; Barondes, vd., 1994b; Suthahar vd., 2018).

Gal-3, yetişkinlerde özellikle makrofajlarda ve epitel hücrelerde ağırlıklı olmak üzere ve embriyogenezde ise daha geniş bir hücresel yelpazede bol miktarda sentezlenir (Barondes, vd., 1994b; Seetharaman vd., 1998). Gal-3, fonksiyonel olarak oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip çok yönlü bir protein olarak, hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimlerinin düzenlenmesi, inflamasyon, immünite, proliferasyon, adezyon, apoptoz, pre-mRNA işlenmesi gibi birçok önemli/kritik biyolojik süreçte rol almaktadır (Blanda vd., 2020).

Gal-3 ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunur ancak çekirdeğe de taşınabilir. Bunun yanı sıra hücre yüzeyine ve ECM'e salınır. Monomer olarak kalma ya da oligomer oluşturma konusunda konsantrasyona bağlı bir yeteneğe sahiptir (Henderson & Sethi, 2009). Farklı konumlarda bulunabilmesi çeşitli fonksiyonlarda rol almasını sağlamaktadır. Sitoplazmadaki varlığı ile hücre sağ kalımında etki gösterirken, çekirdekte, pre-mRNA işlenmesini destekler ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol alır. Hücre yüzeyi ve ECM'ye salındığında ise hücreler arası ve hücreler ile matriks arasındaki etkileşimleri modüle ederek hücre farklılaşması, inflamasyon, fibrogenez ve bağışıklık savunmasında önemli roller üstlenir (Dong vd., 2018). Kimerik yapıda tek galektin olan Gal-3, dikkat çekici bir fizikokimyasal ve biyolojik bir profile sahiptir. Otokrin ya da parakrin etkili gibi fonksiyon gösterebilmektedir. Gal-3'ün hücre dışına salgılanması klasik olmayan yolakla salgılanmasının sonucudur. Klasik ER/Golgi kompleksine iletilip salgılanmasını sağlayan sinyal dizilimine sahip değildir. Bu durum, kardiyovasküler hastalıklarda görülen Gal-3 artışına, Gal-3'ün makrofajlardan proteolitik yıkımla salınıp dolaşıma geçmesi ile ilişkili olabileceği fikrini desteklemektedir (Suthahar vd., 2018). Bu gibi özellikler, Gal-3'e inflamasyon da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sistemlerde esnek bir şekilde düzenleyici rol oynama olanağı verir (Henderson & Sethi, 2009).

Gal-3 pek çok patofizyolojik süreci etkileyebilen çok yönlü bir molekül olmakla birlikte, temel patofizyolojik etkisi inflamatuar süreçlerin aktivasyonu ve fibrotik süreçlerin ilerletilmesidir (Sygitowicz vd., 2021). Gal-3 hem akut hem de kronik inflamatuar yanıtları düzenlemede önemli bir regülatör olarak görev yapar. Akut inflamasyon fazında konak savunmasını destekleyen belirgin bir pro-inflamatuar rol üstlenirken, özellikle hasarın tekrarlayıcı veya kalıcı bir niteliğe bürünmesi durumunda inflamasyonun kronikleşmesine aracılık eder. Sürecin kronikleşmesiyle fibrogenezi ve doku/organ skarlaşmasını teşvik ederek doku yeniden yapılanmasında etkili olur. Gal-3, bu yönüyle, inflamasyonun erken evresi olan akut fazından kronikleşmeye ve sonrasında organ fibrozuna uzanan patofizyolojik süreçte işlev gören çok yönlü bir biyolojik aktör olarak değerlendirilmektedir (Henderson & Sethi, 2009).

Gal-3 çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol almakla birlikte, kardiyovasküler hastalıklar, fibrozis ve kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezinde "suçlu molekül" olarak tanımlanmaktadır (Suthahar vd., 2018). Gal-3, kalp yetmezliği, ateroskleroz ve diğer birçok KVH'nın da dahil olduğu çeşitli akut ve kronik durumlarda inflamasyonu başlatıcı bir rol alır (Abubakar vd., 2024). Gal-3 kronik inflamasyon sürecinde belirgin bir rol oynaması nedeniyle kalp hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıda klinik tabloda hastalığın gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (Sygitowicz vd., 2021; Wang vd., 2017).

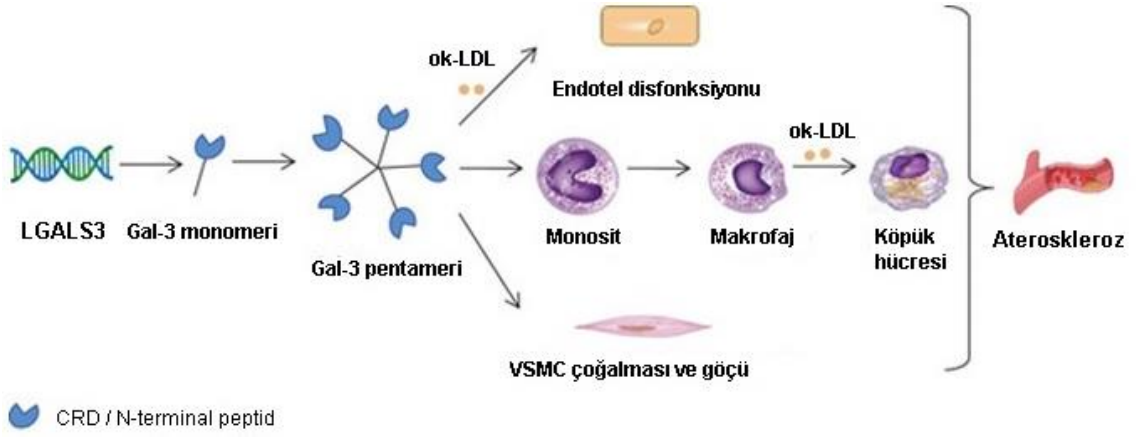
Gal-3'ün bazal düzeydeki ekspresyonu dokudan dokuya farklılık gösterse de inflamasyon, iskemi ve doku hasarı gibi durumlarda çeşitli uyaranlarla indüklenir. Sağlıklı kardiyak dokuda (kalp dokusu) Gal-3 seviyeleri oldukça düşük iken, kardiyak yaralanma sırasında ekspresyonu hızla artmaktadır. Bu artış doku iyileşmesinin erken evrelerinde oldukça önemlidir ve iyileşmeyi destekler ancak uzun süreli ve aşırı ekspresyonunun kardiyak fibroza neden olduğu gözlemlenmiştir (Suthahar vd., 2018). Fibrozis gelişimi kalp yetmezliği gibi patolojilere zemin hazırlamaktadır. Gal-3 ile kalp yetmezliği arasındaki ilişki, özellikle miyofibroblast çoğalması (proliferasyonu), matriks birikimi, miyokardiyal ve ventriküler yeniden şekillenme gibi süreçlerdeki etkileri üzerinden açıklanmaktadır. Gal-3'ün kalp yetmezliği patofizyolojisinde inflamasyonla başlayan, miyofibroblast proliferasyonu fibröz gelişimi gibi süreçler ile ilişkisi çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (De Boer vd., 2009). Hem akut hem de kronik kalp yetmezliği olgularında Gal-3'ün miyokardiyal yeniden yapılanmaya yol açan inflamatuar yolaklara

dahil olarak dolaşımdaki düzeyi artmaktadır (Sygitowicz vd., 2021). Bu olgularda Gal-3 seviyesinin artışı mortalite ile de anlamlı ilişkili bulunmuştur (Abubakar vd., 2024). Miyokardiyal fibröz, kalp yetmezliği gelişimi ve ilerlemesinde baskın bir etkendir (Frangogiannis, 2017). Gal-3 miyofibroblast proliferasyonu ve fibröz oluşumu gibi, kalp yetmezliği türleri olan korunmuş ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği (HFpEF) ve azalmış ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği (HFrEF) gelişimine katkıda bulunan patolojik süreçlerde rol alır. HFpEF hastalarında artan Gal-3 seviyeleri kötü klinik sonuçlar ve olumsuz prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Eltelbany vd., 2022; Jiang vd., 2021). Kalp yetmezliği tanı ve prognozunda cTn ve BNP gibi klasik biyobelirteçler yaygın olarak kullanılsa da HFpEF'de kullanımlarının sınırlı duyarlılığa sahip olduğu bildirilmektedir, bu nedenle de Gal-3 klinik bir değere sahiptir ve yeni bir biyobelirteç olarak umut vericidir (Shi vd., 2022).

FDA, 2010 yılında Gal-3'ü kronik kalp yetmezliği tanılı bireylerde prognoz biyobelirteci olarak kullanılmasını onaylamıştır. Buna göre kronik kalp yetmezliği prognozu için Gal-3 risk kategorileri >259 ng/mL yüksek risk, 25.9-17.8 ng/mL orta riskli, ≤17.8 ng/mL düşük riskli olarak verilmiştir. Onaylanan Gal-3 testi, Gal-3 seviyelerinin ölçülmesinin hastalık seyrine dair öngörüsel bilgi sağlayabileceği klinik araştırmalara dayanmaktadır (Jiang vd., 2021). Klinik çalışmalarda plazma ve serumda Gal-3 seviyelerinin kalp yetmezliği hastalarında kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde artış gösterdiği bildirilmiştir (Shi vd., 2022). Gal-3 seviyesinin yaş ile birlikte de artış gösterdiği belirlenmiştir ancak referans kabul edilen değerleri anlamlı şekilde etkilemediği açıklanmıştır (Krintus vd., 2017). Ayrıca De Boer vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada kadınlarda erkeklere kıyasla daha yüksek Gal-3 serum düzeyleri tespit edilmiştir. FDA, 2010 yılında onayladığı testin yüksek verimlilikli otomatik sistemlerde uygulanmasına onay vererek klinik kullanıma entegre edilmesini kolaylaştıran bir adım atarak 2014 yılında Gal-3'ü kalp yetmezliği risk sınıflandırması için onaylı bir biyobelirteç olarak tanımıştır ve valide edilmiş kardiyovasküler biyobelirteçler listesine eklemiştir (Blanda vd., 2020). Gal-3 ölçümleri ayrıca Amerikan Kalp Birliği (AHA) 2017 kılavuzunda kalp yetmezliğinde prognoz değerlendirmesi ve risk sınıflandırması için önerilmiştir (Chow vd., 2017). Bu gelişmeler Gal-3'ün patofizyolojik rolünün yanında tanısal ve prognostik potansiyelini destekleyen klinik değerini de öne çıkarmaktadır (Zaborska vd., 2023).

Klinik çalışma sonuçlarında Gal-3'ün akut MI sonrası artış gösterdiği ve iskemik hasara karşı kardiyak dokunun inflamatuar cevabının bir göstergesi olabileceği belirtilerek akut MI ve takibinde gelişen kalp yetmezliği için Gal-3'ün prognoz potansiyeli ortaya konmuştur (Tymińska vd., 2019). Bu anlamlı artışın, kalp yetmezliğine geçiş, kötü klinik seyir, morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Gal-3, ST2 ile birlikte miyokardiyal fibröz ile ilişkisi ve biyobelirteç potansiyeli en kapsamlı şekilde araştırılmış proteinlerden biridir (Abubakar vd., 2024).

Gal-3, yalnızca kalp yetmezliği ile değil, aynı zamanda aterosklerotik plakların ilerlemesi ve destabilizasyonu ile de ilişkilendirilmiştir. Koroner anjiyografi uygulanan ve yüksek kardiyovasküler risk taşıyan koroner arter hastalığı olan bireylerde Gal-3 düzeyinin kardiyovasküler ölüm riskini öngörebildiği saptanmıştır. Maiolino vd. (2015) yüksek riskli koroner arter hastalığı olan bireylerde plazma Gal-3 seviyesinin >20.3 ng/mL olması durumunda kardiyovasküler ölüm riski artışı ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir (George vd., 2016). Aterom plaklarında özellikle makrofajlardan salınan Gal-3, fagositozu dolayısıyla köpük hücre birikimini, nitrik oksit dengesinin bozulması ve inflamatuar hücre infiltrasyonu gibi mekanizmalarla plak stabilitesini bozarak kırılganlığını arttırabileceği düşünülmektedir (Abubakar vd., 2024). Hem insan aterosklerotik plaklarında hem de çeşitli hayvan modellerinde Gal-3 eskpresyonunun artığı gösterilmiştir. Endotel hücreler, makrofajlar ve vasküler düz kas hücreleri gibi aterosklerozun gelişim sürecine kritik bir şekilde dahil olmaktadır ve Gal-3 tüm bu hücre tipleri üzerinde etkilidir (Gao vd., 2020) Gal-3'ün aterosklerozla ilişkili bu hücre tiplerine etkisi Şekil 2.18'de verilmiştir.



Şekil 2.18. Gal-3 ve ateroskleroz ile ilişkili hücrelere etkisi (Gao vd., 2020)

Sonuç olarak Gal-3, KVH'ların patogenezinde çok yönlü biyolojik işlevleri ve klinik öngörü kabiliyeti nedeniyle hem tanısal hem de prognostik bir araç olarak dikkatleri çekmektedir. Artmış Gal-3 seviyesi, özellikle miyokardiyal fibrozis, yeniden yapılanma, kalp yetmezliği gelişimi ve mortalite riski ile yakından ilişkilidir.

2.4. Biyosensörler

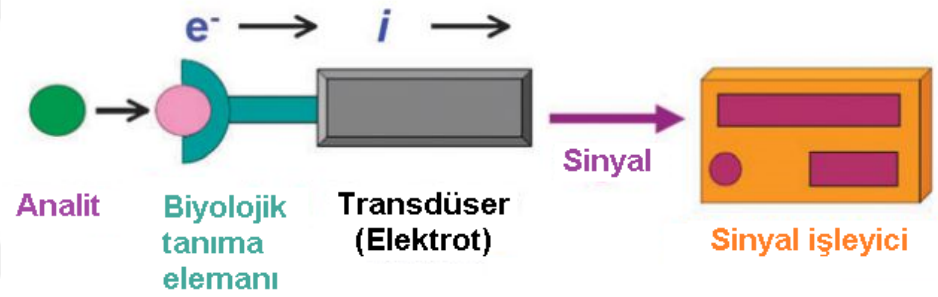
KVH'ların önlenmesi, teşhis edilmesi ve yönetilmesi günümüzün en acil ve önemli küresel sağlık sorunlarından biri olarak görülmektedir (Krumholz vd., 2024). Bu nedenle bu hastalıkların erken tanısı ve erken müdahalesi ve izlenmesi için hızlı, invaziv olmayan, spesifik ve hassas tanı araçlarına duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Biyosensör teknolojisi, bir hastalığın erken evresinde tespiti veya tedavi sürecine verilen cevabın biyobelirteçler ile takip edilmesinde hızlı, ucuz, portatif ve pratik bir alternatif araç olmuştur ve bu yönleriyle büyük bir potansiyel fayda sunmaktadır (Alharthi vd., 2021; Senf vd., 2020). Nanoteknoloji, nanomateryal ve biyoelektronikler gibi alanlardaki gelişmelerle birlikte biyosensör uygulamaları, klinik uygulamalar açısından ileri bir seviyeye geçmiştir (Badillo-Ramírez vd., 2022).

Biyosensörler, biyolojik bir tanıma elemanın hedef bir analite biyokimyasal yanıtı olarak ölçülebilir bir sinyal üretmek amacıyla bir dönüştürücüye (transdüser) entregre edilmesi ile oluşturulan analitik cihazlardır (Mehrotra, 2016). Kimyasal sensörlerin bir alt sınıfı olan olarak kabul edilen biyosensörler, aynı şekilde hedef analit ile spesifik bir biyolojik tanıma elemanı (örneğin enzim, antikor, aptamer ya da hücre reseptörü) arasında gerçekleşen etkileşimi fizikokimyasal bir dönüştürücü aracılığıyla elektriksel, optik, termal vb. bir sinyale çevirir (Thévenot vd., 2001). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) biyosensörleri "vücutta ya da vücut ürünlerinde, bir hastalığı ya da hastalığın meydana gelme ihtimalini öngören ya da etkileyen, ölçülebilen herhangi bir madde, yapı ya da süreç" olarak tanımlanmıştır (Badillo-Ramírez vd., 2022). Bu cihazlar, analiz yapılacak örnekteki fizyolojik ya da kimyasal değişkenleri tespit etmek, ölçmek ve bu verileri kullanıcıya iletmek üzere tasarlanmış çok bileşenli sistemlerdir.

Biyosensörlerin tarihçesi 1900'lerin başına kadar gitse de 1956'da Clark'ın açık kalp ameliyatlarında kanda pH, pO_2, pCO_2 takibinde kullandığı oksijen elektrodu olan "Clark elektrodu"na, 1962'de Clark & Lyons tarafından glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladıkları glukoz tayini için ilk enzim temelli elektrotların

tanıtılması ile modern biyosensör teknolojisinin temelleri atılmıştır (Bhalla vd., 2016). Biyosensörler zamanla farklı biyoalgılama elemanları ve sinyal dönüştürme yöntemlerini içerecek şekilde çeşitlenmiştir. Günümüzde, biyosensör fabrikasyonundaki gelişmelerle de birlikte klinik tanı, çevre analizleri, gıda güvenliği, biyoteknoloji gibi alanlarda geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmaktadır (Aydin vd., 2019; Bhatia vd., 2024).

Biyosensörlerin temel bileşenleri, biyotanıma elemanı (biyoreseptör), transdüser (sinyal dönüştürücü) ve sinyal işleme sistemidir. Biyotanıma elemanı, analiti spesifik olarak bağlayabilen biyolojik bileşendir. Transdüser, biyotanıma elemanıyla analit arasındaki etkileşimi anlamlı, ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihazlardır. Sinyal işleme sistemi ise bu sinyali dijital bir veriye dönüştüp görüntülenmesini sağlayan sistemdir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Bir elektrokimyasal biyosensörün şeması (Ronkainen vd., 2010)

Biyosensörler için yapılarına ve kullanım amaçlarına göre farklı sınıflandırılmalar yapılmaktadır. Bunlar:

- Biyotanıma elemanlarının (biyoreseptörlerinin) türüne göre; antikor temelli (immünosensör ya da immünobiyosensör), enzim temelli (biyokatalitik sensörler), nükleik asit temelli (DNA ya da aptamer temelli biyosensörler), hücre ya da doku temelli biyosensörler,
- Transdüser türüne göre; elektrokimyasal (impidimetrik, amperometrik, potansiyometrik), optik, piezoelektrik, kalorimetrik biyosensörler,
- Kullanım formatına göre; etiketli, etiketsiz (label-free), tek kullanımlık, tekrar kullanılabilir olarak sınıflandırılabilmektedir (Thévenot vd., 2001).

Bu tez kapsamında geliştirilen biyosensörler, tanıma elemanı olarak antikorların, ölçüm yöntemi olarak elektrokimyasal (impidimetrik ve voltammetik) yöntemlerin kullanıldığı etiketsiz immünosensörlerdir.

2.4.1. İmmünosensörler

İmmünosensörler, antijen (Ag)-antikor (Ab) arasında bilinen en spesifik ve non-kovalent etkileşimlerle gelişen bir immünokimyasal reaksiyonu bir transdüserle birleştiren afinite temelli biyosensörlerdir. Biyolojik tanıma elemanı olarak antikor (ya da antijen) varlığında, hedef analit olarak antijenin (ya da antikorun) tespitine yönelik çalışan bu sistemlerde, antikor-antijen arasındaki spesifik bağlanma ile oluşan fiziksel ya da kimyasal değişim bir transdüser tarafından ölçülebilir bir sinyale (örn. akım ve impedans, kapasitans, kütle, optik özelliklerdeki değişim vb.) dönüştürülerek tespit edilir (Luppa vd., 2001). Örneğin hedef antijen, kendine özgü antikor ile immobilize edilmiş bir yüzeye bağlandığında, sensör sisteminin elektriksel özelliklerini -membran potansiyeli, impedans ve akım sinyallerini- değiştirir, elektrot yüzeyi ile çevresi arasındaki elektron transferini engelleyebilir ve bu durum impedans ya da voltametrik ölçümlere yansır (Aydin vd., 2019).

İmmünosensör etiketsiz (label-free) ya da etiketli (labelled) olarak tasarlanabilir. Etiketsiz immünosensörler herhangi bir etiket ya da işaretleyici kullanmadan doğrudan antikor-antijen kompleks oluşumu esnasında gelişen değişimleri saptarken, etiketli immünosensörler enzim ya da nanoparçacıklarla konjuge edilerek etiketlenmiş ikincil bir antikor vasıtasıyla antijen konsantrasyonuna orantılı olarak sinyal amplifikasyonu sağlar (Aizawa, 1994; Morgan vd., 1996). Tipik bir immünosensörde, analiti tanıyacak olan antikor çalışma elektrodu üzerine immobilize edilir.

İmmünosensörler, antikorların sağladığı özgüllükle, kompleks örneklerde dahi yüksek seçicilikle biyobelirteç tespitini mümkün kılar. Örnek hazırlık kolaylığı, ölçüm süresinin kısa oluşuyla, uzun süren ELISA testlerine göre önemli bir avantaj sunar. Özellikle elektrokimyasal immünosensörler, minyatürize edilebilir ve taşınabilir şekilde tasarlanabilmeleri ile saha uygulamalarına olanak sağlar. Hassas tayin yetenekleri ile, modifikasyonlarla desteklenerek düşük konsantrasyonlarda (pg-fg/mL) analit tayin limitlerine ulaşabilirler ve tek bir platform üzerine farklı antikorların immobilizasyonuyla çoklu analit tayinine uygun şekilde tasarlanabilirler. Ayrıca bazı durumlarda yüzey

rejenerasyonu yoluyla tekrar kullanılabilmeleri ve kompakt cihazlara entegre edilebilmeleri gibi avantajları bulunmaktadır (Chen vd., 2023c; Mollarasouli vd., 2019)

KVH'larda kritik klinik öneme sahip biyobelirteçlerin çoğu protein yapılıdır, örneğin kardiyak troponinler, CK-MB (kreatin kinaz miyokard izoenzimi), BNP, CRP, IL-ler gibi. Özellikle sitokinler gibi çok düşük molekül ağırlıklı biyobelirteçler, seçici bir şekilde antikorlarla tanınır. İmmünosensörler, bu protein biyobelirteçlerin vücut sıvılarında hızlı ve spresifik olarak tespit edilmesini sağlayan bir yöntem sunar. Örneğin kardiyak troponin tespiti için önerilen, geliştirilmiş immünosensör tabanlı yerinde bakım (point-of-care, POC) testleri, kliniğe uygulandığında akut MI'nın yerinde teşhisine olanak tanıyarak teşhis ve tedavi süresini önemli ölçüde kısaltabilir (Docherty vd., 2025; Shanmugam vd., 2016).

İmmünsensörler, kardiyak hasarın ya da doku stresinin erken evrelerininde tespitinde, düşük konsantrasyonda salınan biyobelirteçlerin kompleks biyolojik örneklerde dahi hızlı, hassas ve yüksek doğrulukta tespitinde son derece etkilidir ve erken tanı için güçlü bir araç olmasını sağlar. Bu biyobelirteçlere yönelik immünosensörler, risk altındaki hastaların erken dönemde belirlenmesini ya da hastalık ilerlemesinin izlenmesini mümkün kılabilir.

Bu tez kapsamında GDF-15 ve Gal-3 sitokin proteinlerinin kantitatif tayini için geliştirilmiş olan biyosensörler birer immünosensör olarak tasarlanmıştır ve bu biyosensörlerin optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında elektrokimyasal ölçüm tekniklerinden yararlanılmıştır.

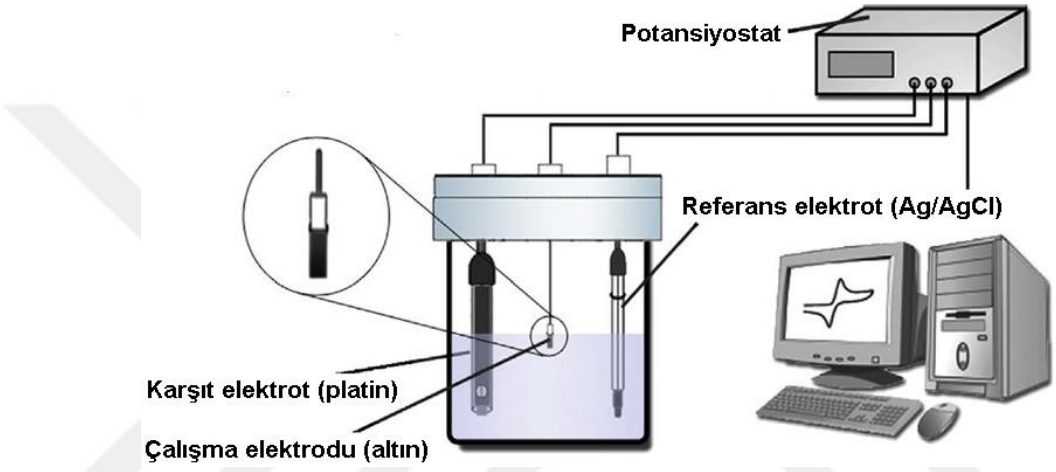
2.4.2. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler kısa analiz süresi, basit cihaz gereksinimi, nispeten düşük maliyetleri ve yüksek doğruluk ve hassasiyetleri, minyaturize edilmeye yatkınlıkları/uygunlukları ve taşınabilirlik gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan biyosensörlerdir ve ayrıca point-of-care uygulamaları için büyük bir potansiyel taşımaktadır (Thévenot vd., 2001).

Elektrokimyasal biyosensörler biyolojik etkileşimleri elektriksel sinyallere dönüştürür, ölçülebilir elektriksel sinyaller yaratmak için elektrokimyasal transdüserlerin (genellikle elektrotlar üzerinden) kullanıldığı biyosensörlerdir. Bu sinyaller türüne göre,

impedans (impidimetri), akım (amperometri), potansiyel ya da yük (potansiyometri), iletkenlik (kondüktometri) gibi parametreler üzerinden elde edilir ve bu parametrelere göre adlandırılır (Daniels & Pourmand, 2007; Ronkainen vd., 2010).

Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde genellikle kimyasal olarak kararlı iki ya da üçlü elektrottan oluşan düzenekler kullanılır. Üç elektrotlu sistemde bir çalışma elektrodu (WE, working electrode), karşıt elektrot (CE, counter electrode) ve referans elektrodu (RE) bulunur. Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre sistemi Şekil 2.20'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.20. Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre sisteminin şematik diyagramı (Olad & Gharekhani, 2015)

Çalışma elektrodu, biyokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği ve sinyalin algılandığı yüzeyi sunan elektrottur. Karşıt elektrot (örn. platin tel) elektrolit çözeltisinin içerisinde daldırılmış olarak devreyi tamamlayıp çalışma elektroduna akım uygulanmasını sağlar. Referans elektrot ise bilinen sabit bir potansiyel sağlayarak ölçüm doğruluğunu garantiler. Elektrobiyokimyasal sistemlerde, referans elektrotlar arasından en çok tercih eldilen, sıcaklık kontrolü gerektirmemesi nedeniyle gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrottur. Üçlü elektrot hücre sistemlerinde elektroliz sırasında oluşan yük karşıt elektrottan geçerken, referans elektrodun yarı-hücre potansiyeli sabit kalır (Bard vd., 2022).

Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan elektrotların yapısı ve özellikleri sistemin performası üzerinde belirleyici bir öneme sahiptir. Çalışma elektrodunun duyarlılığı ve algılama kapasitesini, kullanılan materyalin türü, yüzey modifikasyonları, geometrik yapı gibi unsurlar da önemli ölçüde etkilemektedir (Rezaei & Irannejad, 2019).

Hücrenin elektrik devre iletimini sağlamak için genellikle ferrisiyanat/ferrosiyanat gibi redoks probu olarak adlandırılan çözeltiler kullanılır.

Ölçüm esnasında spesifik antikor immobilize edilmiş çalışma elektrodu yüzeyine hedef antijen bağlandığında, elektrot yüzeyi ile çevresi arasındaki elektron transferi engellenebilir ve bu durum impedans ya da voltametrik ölçümlere yansır. Oluşan impedans ve akım sinyali değişikleri belirlenerek biyosensör yanıtları elde edilir.

2.4.2.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EİS)

İmpedans spektroskopisi, bir sistemin kompleks elektriksel direncini analiz etmek için kullanılan etkili bir yöntemdir ve yüzeydeki olaylara ve hacimsel değişimlere karşı duyarlı bir tekniktir (Chang & Park, 2010). Bu nedenle elektrokimyasal araştırmalarda kullanım alanı bulmaktadır ve literatürde impedans tekniklerinin analitik amaçlar için kullanıldığı çok sayıda çalışma yer almaktadır. Elektrokimyasal impedans spektroskopisinin (EİS) biyosensörlerde kullanımı ilk kez 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olsa da bu yönteme duyulan ilgi ancak 2000'li yıllarda artmaya başlamıştır ve günümüzde de devam etmektedir (Bhatia vd., 2024; Lisdat & Schäfer, 2008).

EİS yöntemi, elektrokimyasal sistemin çok sayıda fiziksel ve elektriksel özelliğini ortaya koyabilmektedir. Difüzyon katsayıları, elektron transfer hız sabitleri, adsorbsiyon mekanizmaları, yük transfer dirençleri, kapasitans değerleri ve gözenek boyutları gibi özellikler hakkında detaylı bilgiler sağlamasıyla ve ayrıca non-invazif, basit, hızlı ve maliyet etkin bir yöntem oluşuyla geniş uygulama alanı bulmaktadır (Randviir & Banks, 2013). Gelişen elektronik donanımlar, nanomalzemeler ve mikroakışkan sistemlere entegrasyonu sayesinde EİS ölçümlerine dayalı biyosensörler, düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tespiti için oldukça uygun hale gelmiştir. İmpidimetrik analiz; tıp, çevresel analizler, gıda analizleri gibi alanların pratik uygulamaları için ihtiyaç duyulan hassaslılığı/duyarlılığı karşılamaktadır (Bard vd., 2022; Lisdat & Schäfer, 2008).

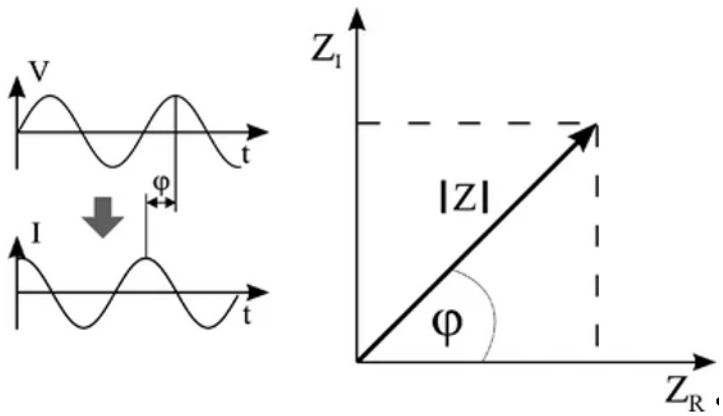
EİS'in en önemli özelliklerinden biri biyomateryaller ile fonksiyonelleştirilmiş elektrotların yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonu için hızlı ve güçlü bir elektrokimyasal teknik oluşudur. Bu teknik, redoks probu varlığında faradaik impedans ve redoks probu içermeyen sistemlerde non-faradaik kapasitans ölçümleri olmak üzere iki temel yaklaşımı içerir. Elektrot yüzeyine biyolojik tanıma elemanlarının

immobilizasyonu, elektrotun kapasitansında ve ara yüzey elektron transfer direncinde değişiklikler, impedans değişimine yol açar. Bu değişiklikler, yüzey modifikasyonları ve biyotanıma olaylarının bir sonucu olarak ortaya çıkan ara yüzeysel etkileşimler/değişimler, EİS tekniğiyle adım adım tespit edilebilir. Böylece, etkileşimlerin etiket kullanılmadan, gerçek zamanlı ve doğrudan izlenmesi mümkün hale gelir (Karunakaran vd., 2015).

İmpedans, elektrokimyasal hücre gibi karmaşık davranışlar sergileyen bir devredeki direnci tanımlamak için kullanılan bir kavramdır (Beasley, 2015). İmpidimetrik sensörler, sistemin elektriksel impedansını ölçerek, biyokimyasal etkileşimlerin elektrot yüzeyinde meydana getirdiği direnç ya da kapasitans değişimlerini izler.

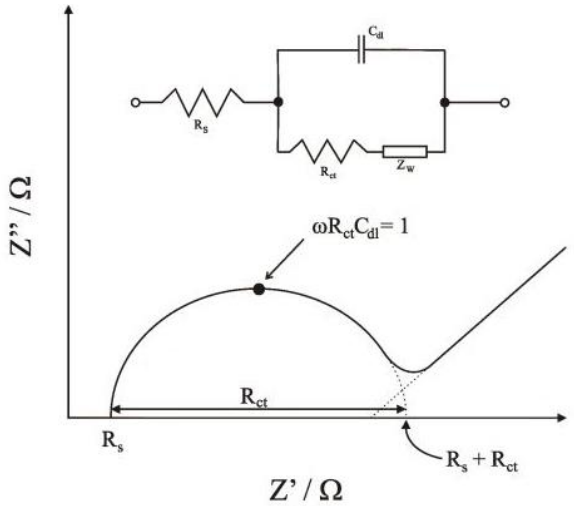
EİS, impedansın (Z) bir elektrokimyasal hücrenin ya da elektrodun uygulanan alternatif akım kaynağının frekansına (f) bağlı olarak yani frekansın fonksiyonu olarak ölçülmesini ifade eder. Bu teknikte, otomatik sistemler, belirli bir frekans aralığında küçük genlikli sinüzoidal değişimler uygular ve sonucunda oluşan sinyal impedans (Z) olarak verir (Bard vd., 2022).

İmpedans, akım ve voltajın zamana bağlı fonksiyonlarının oranı olarak tanımlanan karmaşık bir değerdir. Bu değer impedansın genliği |Z| ve faz açısı ile ifade edilebileceği gibi, reel Z (Z_R) ve sanal Z (Z_I) bileşenleri ile de belirtilebilir (Şekil 2.21), alternatif akımda I ve V'nin zamana (t) karşı frekans dalgaları doğru akımda olduğu gibi birbiriyle örtüşmez ve aralarında oluşan fark "faz açısı" (φ) olarak tanımlanır (Lisdat & Schäfer, 2008).



Şekil 2.21. İmpedansın akım-zaman ve voltaj-zaman bağımlı gösterimi (Lisdat & Schäfer, 2008)

Şekil 2.21'deki ifadelerden yola çıkarak bir impedans ölçümünün sonuçları, log|Z| ve φ'nin logf fonksiyonu olarak çizildiği Bode diyagramı ve sanal impedansın (Zı), her bir frekans noktası için reel impedansa (Z_R) karşı işlendiği Nyquist diyagramı olmak üzere iki şekilde gösterilebilir. Şekil 2.22'de görülen Nyquist diagramı, şeklin üst kısmında yer alan ve Randles devresi olarak adlandırılan elektriksel devreden kaynaklanır. Elektrolit ve elektrot arayüzeyi ile ilişkili elektrokimyasal süreçler ve redoks reaksiyonları, elektriksel bileşenlerin (direnç, kapasitör, indüktör) yer aldığı bir elektriksel devre (eşdeğer devre) şeklinde simüle edilir ve işlenir (Magar vd., 2021).



Şekil 2.22. Randles devresiyle Nyquist diyagramı (Randviir & Banks, 2013)

Bu eşdeğer devre, EİS sisteminin her bir bileşeninin anlaşılıp değerlendirmesi için uygulanır. Bir elektrolitle temas halindeki bir elektrot için tanımlanan eş değer devre modellerinden en çok kullanılan "Randles eşdeğer devre modelleri"dir. Çözeltinin direnci (Rs), elektrot yüzeyinin çift tabaka kapasitansı (double-layer capacidance, C_{dl}), yük transfer direnci (Rct) ve Warburg impedansı (Zw)'nı içeren Randles eşdeğer devre modeline Şekil 2.22'de yer verilmiştir (Magar vd., 2021).

Yük transfer direnci Rct ile seri bağlı ek bileşen olan Warburg impedansı (Zw) iyonların elektrot çözeltisinden elektrot ara yüzeyine difüzyonunu temsil eder. Nyquist diyagramında difüzyon (eğimli doğrusal çizgi) ve kinetik kontrollü (tipik yarım daire) bölgeler sırasıyla düşük ve yüksek frekanslarda görülür. Rs, elektrokimyasal hücrenin geometrisi ve çözelti iletkenliğine bağlıdır. C_{dl} (ya da sabit faz elementi (constant phase element, CPE)), elektrot ile elektrolit arasındaki elektrostatik etkileşimleri temsil eder ve bu parametre elektrolitin iyonik kuvveti ve elektrot yüzey alanı gibi faktörlerden etkilenir.

Yük transfer kinetiği Rct ile ilişkilidir. Rct, Warburg impedansı ile birlikte faradaik impedansı oluşturur, bu da elektron transfer süreçlerinin karakterizasyonunda kritik rol oynar (Ozkan vd., 2022). Yük transfer direnci, Rct faradaik EİS analizleri için en önemli parametrelerden biridir, elektrot ile redoks probu arasındaki elektron transferine yönelik aktivasyon bariyerini yanısıtır. Şekil 2.22'de gösterilen Nyquist diyagramındaki yarım dairenin çapı Rct değerini verir, impedanstaki değişimler biyosensör yanıtının analit konsantrasyona bağlı olarak değişimini ortaya koyar ve böylece analit konsantrasyonunu hesaplamak için kullanılır (Sitkov vd., 2024).

Elektrot ile redoks çift arasında iyi bir elektronik iletkenlik sağlanması için elektrodun modifikasyonlar öncesi düşük bir elektron transfer direncine sahip olması, diğer bir deyişle iletkenliğinin yüksek olması oldukça önemlidir (Lisdat & Schäfer, 2008). Yüzey modifikasyonlarının karakterizasyonunun ardından biyotanıma molekülünün (örn immünosensörler için antikor) elektrot yüzeyine immobilizasyonu Rct değerinde genellikle bir artışa yol açar. Sığır serum albümini (Bovine serum albümin, BSA) gibi bir protein ile spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için gerçekleştirilen bloklama işleminin ardından çalışma elektrodu ile elektrolit arasındaki elektron transferi daha da sınırlanır. Hedef analitin biyotanıma elemanı ile etkileşimi-immünosensörler için antikor-antijen kompleksinin meydana gelmesi, redoks çiftinin oksidasyonu için yük transferinin önemli ölçüde engellenmesine ve buna bağlı olarak Rct'de artışa yol açar. Bu nedenle analit konsantrasyonu Nyquist diyagramındaki yarım dairenin çapını önemli ölçüde etkiler. Böylece bilinen analit konsantrasyonlarında Rct'deki değişime bağlı olarak doğrusal kalibrasyon grafiği oluşturulması ve biyobelirteç konsantrasyonunun belirlenmesi mümkün hale gelir (Mwanza vd., 2022; Sitkov vd., 2024).

2.4.2.2. Döngüsel Voltametri (CV)

Voltametrik yöntemler, biyosensör sistemlerinde yüzey karakterizasyonunu, redoks aktif türlerin elektrokimyasal davranışını incelemek ve konsantrasyon belirlemek gibi amaçlarla yaygın olarak kullanılır. Bir analitin redoks özelliklerini belirlemek ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron transfer olaylarını nitel veya nicel olarak değerlendirebilmek için kullanılan güçlü bir yöntemdir. Voltametrik analiz esnasında, iki elektrot arasına bir uyarılma voltajı uygulanır ve hücreden geçen akım ölçülür. Akım, elektrotlarda oluşan redoks reaksiyonları üzerinden/nedeniyle gerçekleşir (Bard vd.,

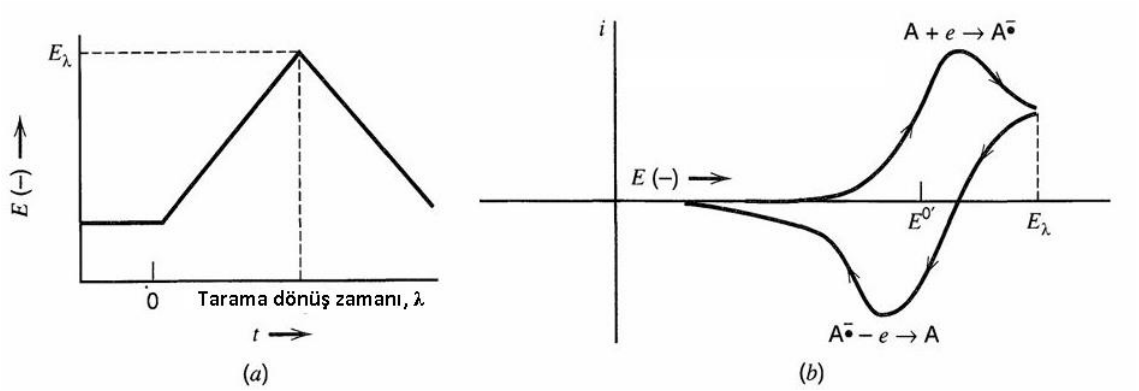
2022). Potansiyelin uygulanma biçimine göre döngüsel voltametri, kare dalga, lineer tarama, diferansiyel puls voltametrisi gibi çeşitli voltametrik yöntemler farklı amaçlarla biyosensör çalışmalarında kullanılmaktadır (Ozkan vd., 2022).

Döngüsel voltametri elektrokimyasal biyosensör uygulamalarında elektroaktif türlerin incelenmesinde en sık kullanılan voltametrik yöntemlerden biridir. CV'nin etkinliği geniş bir potansiyel aralıkta redoks davranışını kolay ve hızlı bir şekilde gözlemlemeye olanak sağlamasından kaynaklanır. CV, elektrokimyasal olarak aktif biyomoleküllerin oksidasyon ve indirgenme davranışlarını, elektron transfer kinetiğini, yüzeydeki bağlanma olaylarının elektriksel etkilerini ve elektrot yüzeyine immobilize edilen biyotanıma elemanlarının (antikor, aptamer, DNA probu vb.) etkinliğini değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle elektrot yüzey modifikasyonlarının her bir aşamasında (yüzey modifikasyonu, biyomolekül immobilizasyonu, analit bağlanması) değişimlerin takibinde oldukça yararlıdır (Kissinger & Heineman, 1983; Marken vd., 2010; Suhito vd., 2021).

CV yönteminde, belirlenen bir potansiyel aralıkta genellikle bir redoks probu varlığında, üç elektrotlu sistemde çalışma elektrodu üzerine uygulanan potansiyel lineer olarak artırılıp azaltılarak döngüsel bir tarama yapılır. Potansiyel taraması sırasında akımın ölçülmesiyle potansiyele karşı bir "döngüsel voltamogram" elde edilir. Bu grafikteki akım yanıtı genellikle analit konsantrasyonuyla orantılı bir pik olarak gözlemlenir (Bard vd., 2022). CV, lineer taramalı voltammetrisinin bir uzantısıdır. Lineer taramalı voltammetride belirlenen potansiyel aralıkta (örn. E1-E2) tarama yapılırken döngüsel voltammetride bu aralıkta ayrıca geri yönlü bir tarama (E2-E1) daha yapılarak başlangıç potansiyeline dönülür.

Biyosensörlerde voltametrik yöntemde, uygulanan değişken potansiyel çalışma elektroduyla referans elektrot arasındadır, çalışma elektrodunda gerçekleşen indirgenme ya da yükseltgenme reaksiyonlarına bağlı olarak oluşan akım ise çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki devreden geçer. İndirgenme ile oluşan akıma katodik akım, yükseltgenme ile oluşan akıma ise anodik akım adı verilir. Bu olaylar döngüsel voltamogramda zirve noktaları (faradaik zirveler) olarak görülür (Bard vd., 2022). Bir redoks molekülünün bir potansiyel tarama döngüsünde zamana karşı potansiyel değişimi

grafiği ve döngüsel voltamogramı Şekil 2.23'te gösterilmiştir. Aranan bilgiye bağlı olarak farklı sayıda taramalar yapılabilir.



Şekil 2.23. (a) Döngüsel potansiyel taraması, (b) Elde edilen voltammogram (Bard vd., 2022)

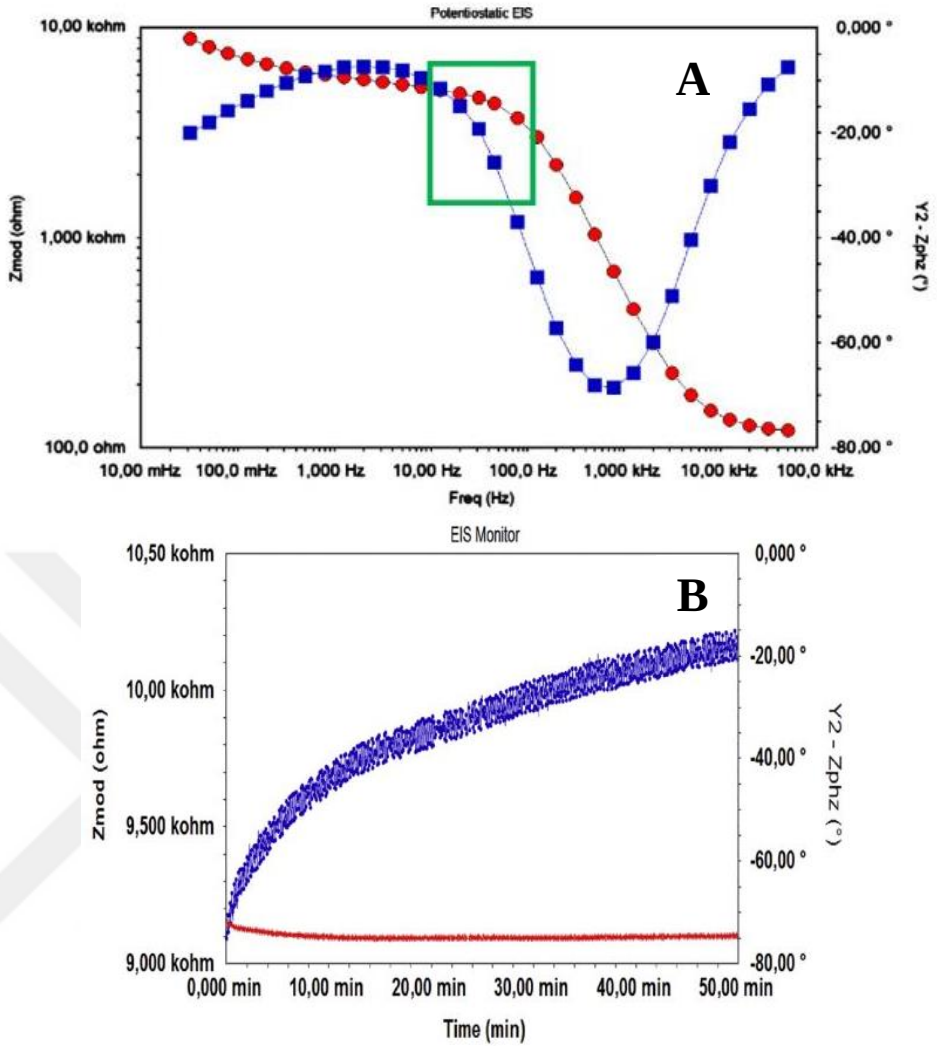
CV, nicel analizden ziyade genellikle kalitatif ve yarı-nicel amaçlarla kullanılır. Bu nedenle, döngüsel voltametri çoğunlukla sensörlerin karakterizasyonunda, stabilite testlerinde, yüzey alanının belirlenmesinde, yüzey modifikasyonunun doğrulanmasında ve sistemin genel redoks davranışının anlaşılmasında önemli bir araçtır.

2.4.2.3. Sabit Frekansta Impedans (SFI) Ölçümü

EİS ile geniş bir frekans aralığında çeşitli elektrokimyasal olayların incelenmesi sağlanırken, alternatif olarak elektrot arayüzeyinin impedansı tek bir frekansta da ölçülebilir.

Özcan vd. (2014), immünosensör çalışmalarında yeni bir metod olarak, antikor-antijen etkileşimlerini değerlendirmek üzere sabit bir frekansta zamana bağlı olarak impedans ölçümünü tanıtmışlardır. SFI analizi için optimum koşullarda üretilmiş biyosensörün EİS ölçümünden elde edilen Bode grafiği üzerinden en uygun bir frekans seçilir. Belirlenen sabit frekansta antijen inkübasyonu süresince, impedans zamana karşı ölçülür böylece antikor-antijen arasındaki etkileşim kinetik olarak incelenir ve onaylanır.

Şekil 2.24'te sabit frekansta gerçekleştirilen impendans analizi için optimum frekansın Bode grafiğinden belirlenmesi ve bu frekansta gerçekleştirilen impedans ölçümünden elde edilen SFI spektrumu verilmiştir.



Şekil 2.24. A) Optimum frekans belirlenmesi için Bode grafiği B) Sabit frekans impedans ölçümü (Özcan vd., 2014)

2.4.3. Bu Tez Kapsamında Biyosensör Fabrikasyonunda Kullanılan İmmobilizasyon Stratejileri ve Elektrotlara Genel Bakış

Biyosensör tasarımında, elektrot seçimi ve yüzey modifikasyon stratejileri sensör performansını doğrudan etkileyen kritik parametrelerdir. Elektrotlar, biyomoleküllerin immobilizasyonunda bir platform ve biyolojik tanıma olaylarını elektriksel sinyale dönüştüren transdüser arayüzü işlevi görür. Bu nedenle elektrodun iletkenlik, yüzey kimyası, geometrik yapı gibi özellikleri; biyosensörün duyarlılık, kararlılık ve ölçüm tekrarlanabilirliği gibi performans özellikleri üzerinde doğrudan etkiye sahiptir (Kalita vd., 2023). Elektrot seçiminde dikkate alınması gereken en önemli parametreler,

elektriksel iletkenlik, maliyet, kimyasal kararlılık, analite ve ara moleküllere yönelik aktivitedir (Silah vd., 2021). Altın, platin, indiyum kalay oksit (ITO), camsı karbon elektrotlar gibi temel elektrotlar yaygın olarak kullanılan elektrot çeşitleridir (Kalita vd., 2023).

Bu tez çalışmasında, GDF-15 ve Gal-3 biyosensörlerinin fabrikasyonları transdüser olarak katı altın elektrot (KAE) ve ITO/PET elektrotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrotların yüzeylerinde öncelikle kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAMs) meydana getirilmiş ve ardından ilgili antikor molekülleri bu SAM'lerin üzerine immobilize edilerek biyosensörler hazırlanmıştır.

2.4.3.1.Katı altın elektrotlar

Katı altın elektrotlar, elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan elektrotlardan biridir. Altının kimyasal kararlılığı, yüksek iletkenliği ve biyouyumluluğu, yüzey modifikasyonlarına elverişliliği, altın elektrotları biyomoleküllerin immobilizasyonu için ve elektrokimyasal transdüksiyon için ideal bir platform haline getirmiştir ve elektrokimyasal uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Zamzami vd., 2024). Özellikle altın yüzeyinde tiyol (–SH) grubu içeren moleküllerin kovalent bağ ile yüzeye tutunabilmesi, yüzey modifikasyonunu oldukça spesifik ve kontrollü hale getirir. Bu bağlanma mekanizması, altın elektrotların SAM'ler oluşturma kapasitesini artırarak biyosensörlerin yüzey fonksiyonelleştirilmesinde avantaj sağlamaktadır (Love vd., 2005). Altın elektrot yüzeyinde oluşturulan SAM tabakaları sayesinde antikor, aptamer, DNA probu gibi biyolojik tanıyıcılar immobilize edilebilir ve spesifik tanıma reaksiyonları etkin şekilde gerçekleştirilir (Chaki & Vijayamohanan, 2002; Singh vd., 2020).

Katı altın elektrotlar genellikle disk şeklinde üretilmekte olup, elektrokimyasal ölçümlerde çalışma elektrotu olarak kullanılır. Bu elektrotların avantajları arasında pürüzsüz yüzey yapısı, tekrar kullanılabilirlik, geniş potansiyel aralığında çalışabilme ve düşük arka plan akımı gibi özellikler yer almaktadır.

Ancak, katı altın elektrotların kullanımında maliyet önemli bir sınırlayıcı faktördür. Altının değerli bir metal olması, bu elektrotların üretim maliyetini artırmakta ve geniş çaplı uygulamalar için ekonomik açıdan sınırlamalar oluşturmaktadır. Bu

nedenle, düşük maliyetli alternatiflerin geliştirilmesi ve altın yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesine yönelik yenilikçi yöntemler, biyosensör teknolojisinin ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda baskı teknolojileriyle üretilen düşük maliyetli, tek kullanımlık, altın bazlı elektrotlar veya altın nanoparçacık destekli karbon elektrotlar gibi alternatif yaklaşımlar kullanılmaktadır (Jalalvand, 2019; Kalita vd., 2023; Zamani vd., 2023).

Maliyet sınırlayıcı bir faktör olmasına rağmen, katı altın elektrotlar kullanımı kolay ve sağlam elektrotlar olmaları, elektrokimyasal yöntemlerde hızlı, duyarlı ölçüm sonuçları vermeleri, yüzey modifikasyonu kolaylığı nedeniyle halen biyosensör çalışmalarında kullanım alanı bulmaktadır (Januarie vd., 2023; Malinowska vd., 2020; Mwanza vd., 2022). Ayrıca elektrokimyasal optimizasyon ve metod optimizasyonu gibi amaçlar için de kullanılabilmektedir (Crossley vd., 2019).

Bu tez çalışması kapsamında GDF-15 biyosensörü geliştirilmesi sürecinde çalışma elektrodu olarak katı altın elektrot kullanılmıştır. Tez planlamasında, katı altın elektrot ile biyosensör üretimi için immobilizasyon metodu optimize edildikten sonra minyatürize ve tek kullanımlık altın baskılı elektrotların (SPGE-screen printed gold electrode) kullanılması hedeflense de hem satın alınan ticari altın SPGE'lerden hem de 3D yazıcı ile hazırlanan altın kaplı çalışma elektrotlarından tekrarlanabilir sonuç alınamadığı için tez kapsamında GDF-15 biyosensör çalışmalarına katı altın elektrot ile devam edilmiştir.

Altın elektrot yüzeyinin temizliği ve aktivasyonu, yüzey modifikasyonun başarısını doğrudan etkiler. Elektrot yüzeyinin alümina ile temizlenip etanol ve distile su ile sonikasyonu, piranha solüsyonu (H_2SO_4/H_2O_2) gibi kimyasal ya da elektrokimyasal yöntemlerle temizlenmesi gibi işlemler etkin SAM'lerin oluşumu için gereklidir. Yüzeydeki adsorplanmış türlerin uzaklaştırılması, SAM'lerin düzenliliğini ve immobilize edilen biyomoleküllerin aktivitesini artırır (Carvalhal vd., 2005).

2.4.3.2. ITO/PET Elektrotlar

İndiyum kalay oksit (ITO, indium tin oxide) filmler, yüksek iletkenlik (10–5 Ω cm) ve %80'den fazla optik transparanlığı aynı anda sağlaması gibi eşsiz özellikleri başta olmak üzere, modern elektronik endüstrisinde güneş pilleri, dokunmatik, düz ve sıvı

kristal ekranlar, ışık yayan diyotlar gibi elektro-optik malzemelerin üretiminde kullanıldığı gibi, elektrokimyasal uygulamalarda biyoalgılama ve biyoelektronik alanlarında da geniş bir kullanım alanına sahiptir (Aydın & Sezgintürk, 2017; Khan, 2016; Valapil vd., 2023).

Kalay katkılı indiyum oksit (%5-10 atomik Sn safsızlık katkılı yarı-iletken) olarak da bilinen ITO, indiyum (In_2O_3) ve kalay oksitlerinin (SnO_2) genellikle 9:1 oranındaki katı çözeltisidir (Valapil vd., 2023). ITO, şeffaf iletken oksitler (TCOs, transparent conductive oxides) arasında en yaygın kullanılan ve en yüksek iletkenlik ve optik geçirgenliğe sahip yarı iletken metal oksitlerden biridir (Chopra vd., 1983; Stadler, 2012).

ITO, ince film halinde görünür ışıkta şeffaf ve renksizdir, öbek halde sarımsı gri renktedir. Saydam ve iletken ITO filmler, genellikle cam yüzeyler ve plastik gibi polimer yüzeyler üzerinde hazırlanır. İnce filmler yüzeylere geleneksel sıvı içine daldırma, döndürme, püskürtme, kimyasal ya da fiziksel buharlı biriktirme gibi yöntemlerle veya vakumda termal ya da elektron demetiyle buharlaştırma, iyon ya da elektron demetli püskürtme, magnetron püskürtme gibi farklı teknolojik yöntemlerle elde edilir (Stadler, 2012; Toikka vd., 2024; Valapil vd., 2023).

ITO, biyosensör uygulamalarında elektrokimyasal ve optik analizler için çalışma elektrodu olarak cazip bir materyaldir. Fiziksel ve kimyasal stabilite, geniş çalışma aralığı, yüzeyinin kimyasal modifikasyona uygunluğu (fonksiyonelleştirme kolaylığı), iyi iletkenlik ve saydamlık, düşük gürültü sinyali, solventlere karşı dayanıklılık, ticari olarak erişilebilirlik ve düşük maliyet gibi özellikleriyle sayesinde ITO elektrotlar biyosensör uygulamalarında ilgi görmektedir (Aydın & Sezgintürk, 2017; Song vd., 2010).

ITO, polietilen teraftalat (PET) gibi esnek bir polimer yüzeye kaplandığında hafif, esnek ve şeffaf elektrot sistemlerinin oluşturulmasına imkân tanır. Ticari olarak satılan ITO/PET tabakalar metal elektrotlara göre oldukça uygun fiyatlıdır. ITO/PET elektrotlar düşük maliyet, geniş yüzey alanına uygun hazırlanabilirliği, minyatürizasyona uygunluğu, şeffaf ve esnek yapısıyla öne çıkarak, özellikle tek kullanımlık biyosensör tasarımında giderek artan bir öneme sahip olmuştur (Altay vd., 2023; Törer vd., 2018).

Ancak, ITO/PET elektrotların bazı sınırlayıcı yönleri de bulunmaktadır. Özellikle yüksek sıcaklığa karşı dayanıksızlılık (PET tabanın >150 ^oC' de bükülmeye başlaması nedeniyle), mekanik aşınmaya karşı yüzey kaplama hassaslığı ITO/PET sensör

dayanıklılığı açısından dikkat edilmesi gereken hususlardır (Lee vd., 2008). Ayrıca ITO tabakanın iletkenliği bükülmelerden etkilenebilir, bu durum esnek organik elektroniklerdeki uygulamalarını kısıtlar. İndiyum kaynaklarının ekranlar ve pillerde kullanımı da kaynakları azaltarak üretim maliyetlerini artırır.

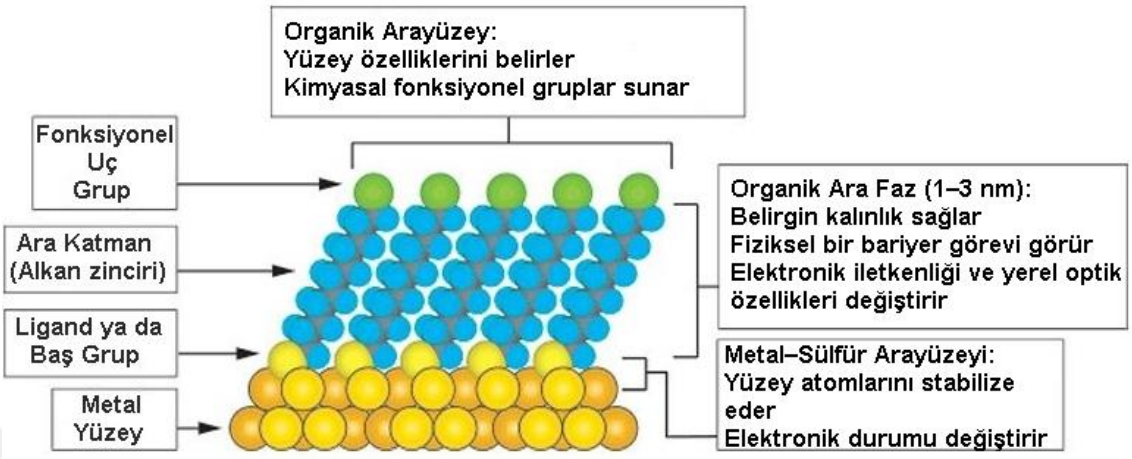
2.4.3.3. İmmobilizasyon ve Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar

Biyosensörlerin fabrikasyonları sürecinde kullanılan immobilizasyon stratejileri, biyosensörlerin duyarlılığı, tekrarlanabilirliği ve uzun süreli stabilitesi açısından kritik öneme sahiptir. Analiz edilecek biyomoleküller, biyoalgılayıcı moleküller, bifonksiyonel uç grup taşıyan ara kimyasal moleküller ve çalışma elektrotları belirlendikten sonra bu biyoalgılayıcı elemanları bu ara moleküller üzerinden elektrot yüzeyine immobilize etmek için uygun yöntem(ler) belirlenir. Kovalent bağlanma, tutuklama ve çapraz bağlama, fiziksel adsorpsiyon, afinite etkileşimleri gibi yöntemler biyoalgılayıcı moleküllerin elektrot yüzeyine bağlanması için kullanılan temel immobilizayon yöntemleridir (Chaki & Vijayamohanan, 2002). Kovalent immobilizasyonda biyomoleküller, elektrot yüzeyindeki fonksiyonel gruplara genellikle amino, karboksil grupları ya da CH_x uçları aracılığıyla bağlanır (Shakeri vd., 2019).

Biyoişlevselleştirilmiş elektrot yüzeylerinin oluşturulması için bazı durumlarda biyoalgılayıcı moleküller elektrot yüzeyine direkt bağlanabildiği gibi (Jie vd., 1999), genellikle yüzey modifikasyonlarına ihtiyaç duyulur. Yüzey modifikasyonlarında ara kimyasal moleküllerden yararlanılır. Moleküler düzeyde entegre işlevsel yüzeylerin oluşturulması, nanoteknolojide “bottom–up (aşağıdan-yukarıya)” yaklaşıma örnek teşkil etmektedir. Bu yaklaşım, moleküler yapı taşlarının kontrollü bir şekilde bir araya getirilerek fonksiyonel sistemlerin inşa edilmesini esas alır. Elektrokimyasal biyosensörlerde bu stratejinin en dikkat çekici uygulamalarından biri kendiliğinden oluşan tek tabaka (Self-Assembled Monolayer, SAM) yapıların kullanımıdır (Gooding vd., 2003).

SAM’ler, moleküllerin (alifatik ya da aromatik organik moleküller) belirli katı yüzeylere (örn. altın, platin, bakır, gümüş vb. metal, metal oksit) güçlü bir şekilde kimyasal adsorbsiyonla bağlanıp kendiliğinden organize olarak oluşturduğu düzenli moleküler tabakalardır (Ulman, 1996). Bu moleküller tipik olarak üç temel kısımdan oluşur: bağlanma grubu (baş grup), alkil zincir (omurga, ana zincir), fonksiyonel uç grup

(-COOH, -NH_2, -OH vb.). Altın yüzeyde oluşturulmuş bir SAM yapısı Şekil 2.25'te verilmiştir.



Şekil 2.25. Altın yüzeyde SAM oluşumunun gösterimi (Love vd., 2005)

Baş grup (örn. tiyoller, silanlar, disülfitler, aminler veya karboksilik asitler) yüzeye tutunmayı sağlar, alkil zinciri moleküller arasında düzenli bir hizalama oluşturur, uç grup ise biyomoleküllerin (antikor, enzim, DNA vs.) ya da biyomoleküllerin bağlanacağı farklı moleküllerin immobilizasyonu için fonksiyonel alan oluşturur. Böylece, biyosensör tasarımında SAM'ler hem kimyasal seçicilik hem de yüzey fonksiyonelleştirme imkânı sunar (Vericat vd., 2010). Terminal grup ve zincir uzunluğunun seçimiyle yüzeyin hidrofilik/hidrofobik özellikleri ve moleküller arası mesefa kontrol edilebilir. Özellikle uzun zincirli alkan tiyolleri kullanılarak oluşturulan SAM yapıları biyomoleküllerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu için membran benzeri yoğun ve düzenli bir yüzey meydana getirir (Chaki & Vijayamohanan, 2002).

Hazırlama kolaylığı ve farklı teminal gruplar kullanabilme esnekliği SAM'leri organik tek tabakalar arasında öne çıkarmaktadır. Ayrıca SAM'ler sadece düzlemsel yüzeylerde değil aynı zamanda her boyutta ve çeşitli şekillerdeki yüzeylerde oluşturulabilmektedir ve bu yönüyle nanoteknolojide hem nanoelektrot tasarımı hem de çoklu analit tespiti gibi ileri seviye uygulamarda da tercih edilmektedir (Gooding vd., 2003; Vericat vd., 2010).

Farklı SAM çeşitleri mevcuttur. Bunlardan, baş grubunda tiyoller, ditiyoller ve baş gruplarında kükürt içeren diğer bileşikler (örn. disülfitler, sülfitler) kullanılarak metal

yüzeylerin üzerinde sıklıkla, yarıiletkenler üzerinde daha az olmak üzere SAM'lerin oluşturulması oldukça yaygındır. Ayrıca, baş grubunda alkilklorosilanlar, alkilalkoksisilanlar ve alkilaminosilanlar gibi silan bazlı moleküller veya fosfonatlar içeren kimyasal moleküller kullanılarak hidroksillenmiş yüzeylerde (SiO_2/Si, Al_2O_3/Al, TiO_2/Ti, mika, cam, vb.) SAM oluşumu da tercih edilmektedir. Bunların haricinde Al_2O_3, AgO gibi metal oksitler üzerine yağ asitleri ile ve Si üzerinde hidrokarbonlarla oluşturulan SAM'ler de kullanılmaktadır (Vericat vd., 2010).

Çoğu impedans biyosensöründe elektrot yüzeyine biyoalgılayıcı molekülleri immobilize etmek için ve elektrot-çözelti arayüzüne probları çekmek için SAM'lerden faydalanılır, bu amaçla en yaygın kullanılan yüzey kimyası yöntemleri altın yüzeylere bağlanan tiyoller ve oksit yüzeylere bağlanan siloksan temelli yapılardır (Daniels & Pourmand, 2007).

Altın Yüzeyde Tiyol-SAM'ler: Altın yüzeyinde SAM'lerin oluşturulması, biyomoleküllerin yönelimli ve kararlı bir şekilde immobilizasyonuna olanak tanır. Altın yüzeyler üzerine tiyol (-SH) grupları içeren moleküllerin adsorpsiyonu, SAM oluşumunun en klasik ve yaygın örneğidir. Tiyol-altın etkileşimi güçlü ve yönelimlidir; bu da yüksek düzenlilikte ve kararlı tek tabakaların elde edilmesini sağlar. Bu özellikleri nedeniyle altın SAM'ler, elektroaktif biyosensör elektrotlarının hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilmektedir (Love vd., 2005; Ulman, 1996).

Özellikle, tiyol ve ditiyol SAM'leri, altın yüzeyler üzerinde kolay hazırlanabilir olmaları ve çözeltiden ya da gaz fazından uygulanabilmeleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Vericat vd., 2010). Nuzzo & Allara (1983), altın yüzeyler üzerinde tiyolat SAM'lerinin bifonksiyonel organik disülfit çözeltisinden adsorbsiyon yoluyla hazırlanabileceğini bildirmiştir. Metal yüzeylerde SAM oluşturmak için en çok kullanılan protokol, temizlenmiş yüzeyin tiyol çözeltisine (~1-10 mM aralığında, etanolde) daldırılarak 12-18 saat civarı oda sıcaklığında bekletilmesidir (Love vd., 2005).

Tiyol gruplarının altın yüzeylerine güçlü bağlanması ve van der Waals etkileşimleri sayesinde, bu tabakalar ortam koşullarında nispeten yüksek kararlılık sergiler. Ayrıca, moleküler düzeyde iyi bir düzenlilik gösterir ve biyosensör elektrotlarının hazırlanmasında hem yüzey fonksiyonelleştirme hem de biyouyum açısından avantaj sağlar (Vericat vd., 2010). Bu bağlamda örneğin 6-merkaptohekzanol,

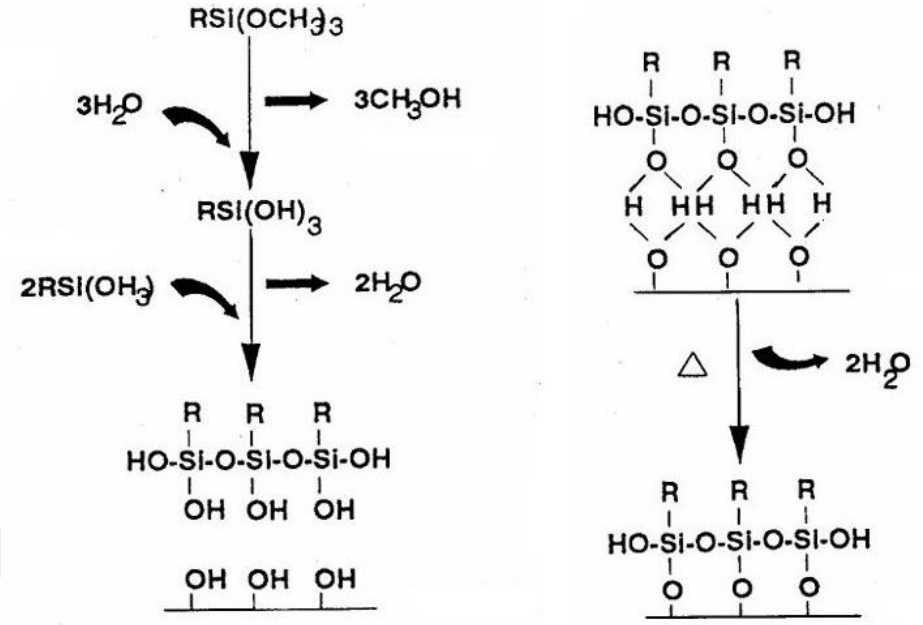
altın yüzeyine bağlanarak uçta hidroksil grupları açıkta kalır ve bu sayede yüzeyin daha hidrofilik ve fonksiyonel hale gelmesini sağlar. Ayrıca belirtilen protokolle farklı alkantiyollerin karışımı ile hazırlanan SAM tabakalarının kullanıldığı çok sayıda immünosensör çalışması mevcuttur. İmmünosensör fabrikasyonu sürecinde SAM oluşturma koşullarına örnek olarak, IL-6 tespiti için, temiz altın yüzey üzerinde, iki alkantiyolün (1 mM 11-merkaptoundekanoik asit ve 6-merkaptohekzanol, 1:3 oranında) gece boyunca adsorpsiyonu ile tasarlanmış olan bir immünosensör gösterilebilir. Alkantiyol karışımı, yüzeyde düzenli bir tek tabaka oluşturmak için kullanılmış ve sonrasında SAM'lerin karboksilli asit grupları EDC/NHS kimyası kullanılarak biyomoleküllerin immobilizasyonuna uygun hale getirilmiştir (Sánchez-Salcedo vd., 2023).

Silan Tabanlı SAM'ler: Silan bileşikleri, hidroksil grupları içeren katı yüzeylerin, özellikle metal oksit ve yarı iletken yüzeylerin kimyasal modifikasyonunda kullanılmaktadır (Ulman, 1996; Vericat vd., 2010; Wilson & Schiffrin, 1995).

Silanizasyonun prensibi hidroksillenmiş yüzeyde SAM oluşumuna dayanır (Törer vd., 2018). Silan bazlı SAM tabakaların kolay hazırlanması, tekrarlanabilirliği ve stabilitesi gibi avantajları nedeniyle DNA, antikor, enzim gibi biyolojik moleküllerin yarı-iletken yüzeylere kovalent immobilizasyonu için ideal bir ara yüzey sağlayarak biyosensör geliştirme çalışmalarında yüzey fonksiyonelleştirme ve yapılandırmada kullanım alanı bulmaktadır (Khan, 2016; Moore vd., 2006).

Kaplama endüstrisinde dayanıklı malzeme geliştirme çalışmaları adhezyon artırıcılar, çapraz bağlayıcılar ve hidrofoblar olarak kullanılmak üzere alkoksi fonksiyonel silanların geliştirilmesine yol açmıştır ve bu alkoksisilanlar biyosensör fabrikasyon süreçlerinde silan bazlı SAM tabakaların oluşturulması için de kullanılır olmuştur. Alkoksisilanların genel formülü $R_nSi(X)_{4-n}$'dir. R, bir alkil, aromatik, organofonksiyonel veya bu gruplardan birkaçının bir kombinasyonu olabilen, organik uyumluluğu sağlayan, hidrolize edilemeyen bir organik kısımdır. Biyosensör çalışmalarında bu kısım biyoalgılama elemanı ile etkileşime giren kısımdır. X en yaygın olarak –metoksi ya da etoksi gruplarının kullanıldığı alkoksi kısmıdır. Bu kısım çeşitli hidroksil formlarıyla reaksiyona girebilen, reaksiyon sonucu etanol ya da metanolün

ayrıldığı kısımdır (Witucki, 1992). Alkoksisilanların silanlama prosesindeki genel reaksiyon mekanizması Şekil 2.26'da verilmiştir.



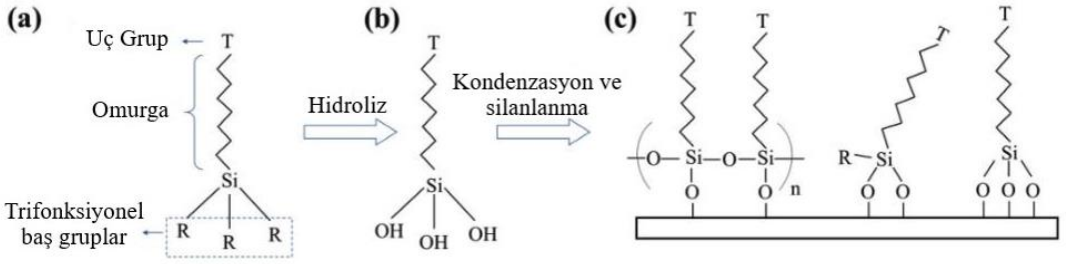
Şekil 2.26. Alkoksisilanların reaksiyon prosesi (Witucki, 1992)

Şekil 2.26'da görüldüğü gibi alkoksisilanların reaksiyon mekanizması dört temel aşamada gerçekleşir. İlk olarak alkoksi (şekilde metoksi, $-OCH_3$) grupları hidrolize uğrar. Birinci ve ikinci alkoksi gruplarının hidrolizinden sonra silanlar kondenzasyon yoluyla siloksan bağları (-O-Si-O-) oluşturarak oligomerleşmeye başlar. Silan molekülünün üçüncü metoksi grubu genellikle substrat yüzeyindeki hidroksi gruplarına doğru yönelerek hidrojen bağları oluşturur. Ardından yüzey ile kovalent bağların (oksan bağı, –Si-O-M) oluşumu ve su çıkışı gerçekleşir (Witucki, 1992). Bu yapılarda kovalent bağların yanı sıra; elektrostatik kuvvetler, van der Waals etkileşimleri, sterik ve itici kuvvetler gibi kovalent olmayan etkileşimler de yapının stabilizasyonuna katkı sağlar (Shakeri vd., 2019).

Silanlama oda koşullarında yavaş, ısıyla hızlı gerçekleşen bir reaksiyondur. Silan tabakasının oluşumu 110°C'de 5-10 dk, oda koşullarında 24 saattir.

Yüzey silanlamanın en basit yöntemi, silan çözeltisinin alkol çözeltisi ile hazırlanıp uygulanmasıdır. Genellikle metanol, etanol veya izopropanol gibi alkol çözeltileri içerisinde %2-0.5'lik silan çözeltileri hazırlanabilir (Witucki, 1992). Üç fonksiyonlu silanların $-Si-(OX)_3$ daha sıkı paketlenip, iyi hizalanmış moleküler tabakalar

oluşturduğu düşünülmektedir ve Şekil 2.27'de üç fonksiyonel grup taşıyan bir silanlama ajanı ve onun yüzeye olası bağlanma şekilleri gösterilmektedir (Krasnoslobodtsev & Smirnov, 2002; Shakeri vd., 2019).



Şekil 2.27. a) Trifonksiyonel silanlama ajanının yapısı b) hidroksilasyonu c) hidroksillenmiş yüzeyde silanlama ajanı bağlanma ihtimallerinin üç örneği (Shakeri vd., 2019)

SAM oluşumunu açıklayan iki temel model önerilmiştir: (1) katmanlı büyüme modeli (sürekli büyüme modeli), burada başlangıçta sıvı benzeri düzensiz bir film tabaka oluşur, yüzey ile bağlanma arttıkça kademe kademe düzenli bir tek tabaka hale gelir; (2) ada büyüme modeli, burada lokalize SAM bölgeleri oluşur ve sonra birleşerek bütünleşmiş bir yapı oluşturur. Yüksek nem veya su içeriğinin fazla olduğu koşullarda silan polimerizasyonun çözeltide başlayarak sonra yüzeyde birikmesi (yapılanması), yani ikinci modelin gerçekleşme olasılığı daha yüksektir (Krasnoslobodtsev & Smirnov, 2002; Shakeri vd., 2019).

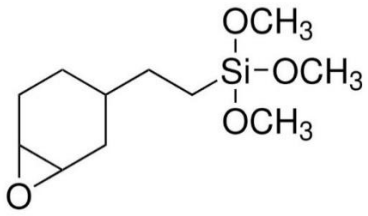
Silanol (-Si-OH) grubundaki H atomu tipik alkollerin H atomlarına kıyasla daha elektrofiliktir, bu silisyum atomunun boyutu ve daha elektropozitif oluşu silanolün dipol momentinin daha yüksek olup daha reaktif olmasına yol açar (Witucki, 1992).

Bağ enerjisi analizi, Si-O yüzey bağı oluşumunun, kuru ve aprotik koşullar altında reaksiyonun itici gücü olduğunu göstermektedir. Organofonksiyonel silanların yüzeyle reaktivitesine katkıda bulunan ikincil faktörler, yan ürünlerin uçuculuğu, yan ürünün yüzeydeki hidroksillerle hidrojen bağı oluşturma kabiliyeti, yan ürünün daha fazla reaksiyonu katalize etme kabiliyeti ve silisyum atomundaki grupların sterik kütlesidir (Dey & Naughton, 2016).

Silan moleküllerinin kendi kendine kondenzasyonunu azaltmak için, çözeltiyi taze hazırlamak, alkol bazlı çözücüler kullanmak, düşük konsantrasyonlarda çalışmak ve pH aralığını kontrol etmek önerilmektedir (Witucki, 1992). Ayrıca silan reaktiflerindeki

hidrolize edilebilir fonksiyonlar (X) sulu çözeltilerde hızla yok olur, bu nedenle, silan reaktiflerinin katılımıyla gerçekleşen tüm reaksiyonlar her zaman sulu olmayan çözeltilerde (genellikle kuru toluen, absolut etanol) gerçekleştirilir (Smutok & Katz, 2023).

Bu tezde tasarlanan her iki biyosensörün üretim sürecinde SAM-tabanlı yüzey modifikasyon stratejileri yer almıştır. GDF-15 biyosensörü fabrikasyonunda, altın elektrotların yüzey modifikasyonu tiyol bazlı ve silan bazlı iki ayrı SAM tabakanın kombinasyonu şeklinde gerçekleştirilirken, Gal-3 biyosensörünün fabrikasyonu ise sadece silan bazlı SAM tabaka ile gerçekleştirilmiştir. Her iki biyosensörün hazırlanmasında silanlayıcı molekül olarak trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan (TMOHES) kullanılmıştır ve TMOHES çözeltisi absolut etanolde hazırlanmıştır. GDF-15 biyosensörü için, altın elektrot yüzeyinde önce 6-merkaptohekzanol ile oluşturulan tiyol-bazlı SAM'lerin üzerine TMOHES ile silan-bazlı ikinci SAM tabakalar oluşturulmuştur. Gal-3 biyosensörü için ise ITO/PET elektrodun hidroksillendirilmesi ile oluşturulan -OH fonksiyonel grupları üzerinden TMOHES kullanılarak silan kimyası ile SAM yapısı oluşturulmuştur. TMOHES'in uç epoksi grupları her iki biyosensörün biyoalgılayıcı molekülleri olan spesifik antikorlarını başka bir ara kimyasal basamağa gerek kalmadan, oluşturulan silan SAM tabakaların üzerine doğrudan ve kovalent olarak immobilize edilmesini sağlar. Bu yaklaşım, tasarım adımlarını kolaylaştırırken, tasarlanan immünosensörlerin daha güvenilir, etkin ve maliyet açısından avantajlı hale gelmesini sağlar. TMOHES molekülünün yapısı Şekil 2.28'de verilmiştir.

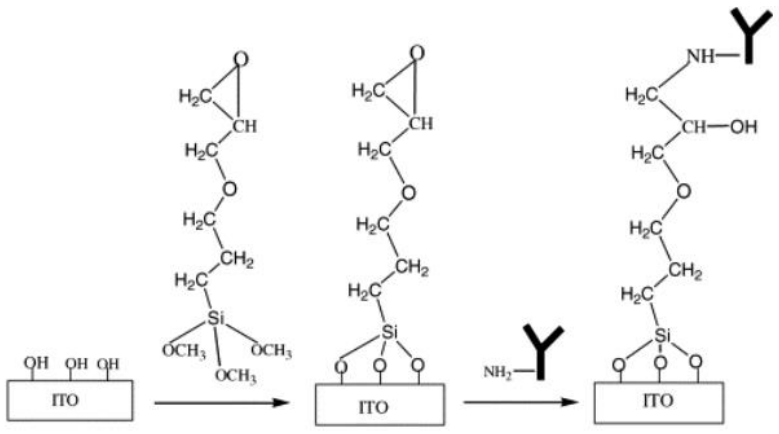


Şekil 2.28. TMOHES molekülünün kimyasal yapısı

Epoksi grupları organik sentezlerde kimyasal olarak çok yönlü ve işlevsel gruplardır, bir destek üzerinde epoksi grupları taşıyan moleküller, endüstriyel biyokatalizörler olarak ve biyosensör uygulamalarında kullanım alanı bulmaktadır (Yang

& Li, 2005; Yılmaz vd., 2019). Epoksi halkaları proteinlerin ya da amin-konjuge biyomoleküllerin amino gruplarını doğrudan bağlayabilir (Shakeri vd., 2019). Epoksi halkalarınca zengin yüzeylere enzim ya da antikor gibi makrobiyomoleküllerin kovalent immobilizasyon ile kalıcı olarak sabitlenmesinde üç üyeli epoksi halkası, çeşitli nükleofilik katılma reaksiyonları ile açılır. Proteinlerin bu epoksi uçlara direkt olarak immobilizasyonu, proteinlerin çoğunlukla birincil amin kısımlarından, tiyollerden ya da proteinin yapısına, konformasyonuna bağlı olarak farklı fonksiyonel bölgelerinden gerçekleşebilir (Jiang vd., 2005; Liu vd., 2010).

Epoksi grubu taşıyan silanlayıcı moleküller biyosensör teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yang & Li, 2005; Yılmaz vd., 2019). Biyosensör fabrikasyonu sürecinde silan-SAM tabaka üzerine antikor immobilizasyonuna örnek olarak, Yang & Li (2005), (3-glisidoksipropil)trimetoksisilan'ın ITO yüzeyinde oluşturduğu SAM tabakayı ve antikor immoblizasyonunu inceledikleri çalışma gösterilebilir. Bu çalışma, epoksi fonksiyonel grup içeren bu silanlama ajanının ITO yüzeyinde SAM tabakanın yoğun, tam ve homojen şekilde biriktiğini ve ardından gelen antikor immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamıştır (Şekil 2.29). Silan-SAM'lerin düzenli yapısı, antikorun, silanın fonksiyonel bölgesinden düzenli ve homojen bir şekilde bağlanmasına olanak tanır. Bu da biyosensörün hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği için önemlidir.



Şekil 2.29. ITO substrat yüzeyinde (3-glisidoksipropil)trimetoksisilan SAM oluşumu ve antikor immobilizasyonunu (Yang & Li, 2005)

SAM tasarımı, immobilizasyon stratejisi veya algılama mekanizmasından bağımsız olarak, SAM tabanlı biyosensörlerin performansını belirlemede kritik bir rol

oynamaktadır (Chaki & Vijayamohanan, 2002). Bunun yanısıra, SAM'lerin kararlılığı özellikle elektrokimyasal biyosensörlerde önemlidir, çünkü uygulanan elektrik potansiyeli SAM yapının bütünlüğünü etkileyebilir (Gooding vd., 2003).

2.5. Kardiyovasküler Hastalıkların Erken Teşhisinde Biyosensörler

Biyosensörler tıpta hastalıkların erken tespit edilmesinde önemli bir rol oynar ve uygulamaları/kullanım alanları giderek artmaktadır. Klinik uygulamalarda özellikle glukoz biyosensörleri diyabet tanısında ve glukoz kan şekerinin hassas bir şekilde kontrol edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Evde kullanılan kan şekeri ölçüm cihazları dünya biyosensör pazarında %85 civarında bir paya sahiptir. Ayrıca biyosensörler bulaşıcı ajanların hızlıca tespit edilebilmesinde, geleneksel analiz yöntemleriyle sadece merkezi laboratuarlarda tespit edilebilecek biyobelirteçlerin (virüsler, interlökinler) erken evrede tanınmasına olanak sağlayabilirler (Mehrotra, 2016).

KVH'lar her yıl milyonlarca insanın yaşam koşullarını olumsuz etkilemekte ve küresel çapta morbitide ve mortalitenin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir (Martin vd., 2024; Mensah vd., 2023; Roth vd., 2020). KVH'ların önlenmesi, teşhis edilmesi ve yönetilmesi günümüzün en acil ve önemli küresel sağlık sorunlarından biri olarak görülmektedir (Krumholz vd., 2024). Bu nedenle bu hastalıkların erken tanısı ve erken müdahalesi ve izlenmesi için hızlı, invaziv olmayan, spesifik ve hassas tanı araçlarına duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır.

KVH'ların da erken teşhisi ve yönetimi için, inflamasyon biyobelirteçlerinin zamanında ve yerinde (point of care) analizinde kullanılabilecek yeni biyosensörlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Biyobelirteçlerin tespitinde rutinde genellikle ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) gibi laboratuar immünoassaylere başvurulmaktadır. İnflamasyon biyobelirteçleri araştırmalarında, ELISA ve görüntüleme teknikleri haricinde, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), DNA dizileme gibi teknikleri kullanılmaktadır (Badillo-Ramírez vd., 2022). Bu geleneksel yöntemler yüksek duyarlılık ve spesifiklik sunuyorsa olsalar da genellikle büyük ölçekli cihazlar ve özel alt yapı gerektiren, zaman alıcı analizleri, örnek hazırlama için nitelikli personel gerektirme gibi kısıtlılıklara sahiptir. Buna karşılık, biyosensörler, hızlı ve maliyet etkin analiz imkânı sunarak aynı

zamanda portatif hale getirilmeye açık yapılarıyla, erken teşhis ve müdahale ile hasta sonuçlarını iyileştirme potansiyeline sahiptir (Pittman vd., 2024).

Miyokard infarktüsünün altın standart biyobelirteçleri olan kardiyak troponinlerin tespiti için gerçekleştirilen biyosensör çalışmaları, yüksek hassasiyetten ödün vermeden hasta başında anında sonuç almayı ve laboratuvar testlerine bağlı gecikmeleri ortadan kaldırmayı hedeflemektedir (Docherty vd., 2025; Shanmugam vd., 2016). Benzer şekilde, yeni nesil kalp yetmezliği biyobelirteçlerine yönelik biyosensör çalışmaları da ayakta hasta izlemelerinde veya kaynakların sınırlı olduğu bölgelerde yerinde tanı için kullanımını hedeflemektedir. Ayrıca son yıllarda giyilebilir biyosensör uygulamaları üzerine yapılan çalışmalar da artmaktadır. Kullanılan bazı akıllı saatlerin kan oksijenini değerlendirmeyi mümkün hale getirdiği ve atriyum fibrilasyonu denen ritim bozukluğunu tespit etmede olumlu sonuç verdiği bildirilmiştir. Bu cihazlar sayesinde atriyum fibrilasyonunu %90 üzerinde özgüllük ve duyarlılıkla tanınabildiği ve ileri tetkikler için yol gösterici olduğu belirtilmiştir (Türk Kalp Vakfı, 2020).

Geleneksel ve yeni kardiyak biyobelirteçlerinin tespitine yönelik çok sayıda immünosensör çalışması bulunmaktadır. Kalp yetmezliğinin prognostik bir biyobelirteci olarak FDA onaylı Gal-3 (Zaborska vd., 2023) ve akut MI, koroner arter hastalığı ve kalp yetmezliği gibi önemli KVH'ların izlenmesinde biyobelirteç olarak resmi kılavuzlarda önerilen GDF-15, ST2 (FDA onaylı) gibi yeni inflamatuar belirteçlerinin klinik ölçümüne yönelik çalışmalar dikkat çekmektedir. Son yıllarda geliştirilen, Gal-3 ve GDF-15 gibi düşük molekül ağırlıklı inflamasyon belirteçlerininin yüksek duyarlılık ve hassasiyetle tespitine olanak veren immünosensörler, bu biyobelirteçlerin kanda veya hatta tükürükte pratik ölçümlerine olanak sağlayarak, riskli hastalarda hastalıkların erken evrede tespitine ve hastalığın ilerlemesinin izlenmesine katkı sunabilir (Pittman vd., 2024).

2.5.1. Literatürde GDF-15 Analizi İçin Geliştirilmiş Biyosensörler

GDF-15, başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere kanser, diyabet, böbrek hastalıkları gibi çeşitli inflamatuar ve metabolik durumların biyobelirteci olarak klinik açıdan öne çıkan bir sitokindir (Wollert vd., 2017). Plazma konsantrasyonundaki artışlar, özellikle kalp yetmezliği, akut koroner sendrom ve ateroskleroz gibi hastalıklarda prognostik öneme sahiptir (Lindholm vd., 2018; Welsh vd., 2022). Düşük seviyelerde dolaşımda bulunan bu biyobelirtecin hassas ve seçici şekilde tayini, konvansiyonel

yöntemlerle (ELISA, immunoassay sistemleri) mümkün olmakla birlikte, yüksek maliyet, uzun analiz süresi ve laboratuvar altyapısı gereksinimi gibi sınırlılıklar nedeniyle biyosensör tabanlı alternatif tespit yöntemlerine olan ihtiyaç artmaktadır.

Literatürde GDF-15 tayini amacıyla geliştirilen bazı biyosensör sistemleri, özellikle elektrokimyasal prensiplere dayanan platformlar üzerinden tasarlanmıştır.

Chen vd. (2023c), KVH'ların erken tanısı amacıyla, GDF-15 tespiti için hidrojen peroksit (H_2O_2) temelli sinyal üretimine dayanan sandviç tipi bir elektrokimyasal immünosensör geliştirmiştir. Bu sensörde, sinyal arttırımı için MoS_2-AuPtCu hekzagonal nanoçerçeveler (HNF) kullanılmış, camsı karbon elektrot yüzey modifikasyonu ise grafen (GDY)-Au üçgen nanoparçacıkları (TNPs) ile gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda, sensör 500 fg/mL–50 ng/mL aralığında geniş bir tayin aralığı ve 0.212 pg/mL gibi düşük bir tespit limiti sunmuş, bu da onun klinik uygulamalarda GDF-15'in güvenilir tespiti için umut vadeden bir platform olduğunu göstermiştir.

Chen vd. (2022)'nin GDF-15 tayini için bir başka sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör tasarımında, substrat platformu olarak amin-modifiye grafen destekli altın nanoçubuklar (NG/AuNPs) ve ikincil antikorlar (Ab2) için işaretleyici yapı olarak dikenli (durian-şekilli) MoS_2/AuPtPd nanodendritleri (NDs) kullanmıştır. NG/AuNPs, elektrot yüzey alanını artırmak ve birincil antikorların (Ab1) immobilizasyonunu sağlamak amacıyla tercih edilmiştir. Öte yandan, MoS_2/AuPtPd NDs yapıları, yüksek kristal yüzey indeksine sahip morfolojileri sayesinde H_2O_2'nin elektrokatalitik indirgenmesi için geniş aktif yüzey sunmakta ve Ab2 taşıyıcı olarak yüksek stabilite göstermektedir.

Benzer bir sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör çalışmasında camsı karbon (GC) sensörün taban platformu olarak polianilin (PANI) mikrotübüllerine yüklenmiş paladyum nanoparçacıkları (Pd NPs) kullanılmıştır. Etiketleyici olarak ise, altın nanoparçacıklarla kombine edilmiş peony-çiçeği şeklinde $ZnGa_2O_4$ yapısı ($ZnGa_2O_4$/Au NPs) tercih edilmiştir. Bu yapı, H_2O_2'nin elektrokatalitik indirgenmesinde yüksek etkinlik göstermiştir (Chen vd., 2023a). Etiketli elektrokimyasal biyosensörlerin dışında KVH'ların erken tespitinde GDF-15 biyobelirtecinin analizi için etiketsiz bir immünosensör AuPtCu-SWCNTs@MoS_2-rGO ile üç boyutlu bir nanokompozit elektrot platformu kullanılmıştır (Jiao vd., 2022).

Optik tabanlı biyosensörler de KVH'ların erken tanısında kullanılmak üzere GDF-15 tayini için çalışılmıştır.

P16K peptidi ile fonksiyonlandırılmış CdTe kuantum noktalarına (QDs) dayalı yeni bir fluoresan immünosensör (QDs-P16K@FLISA) geliştirmiştir. Bu sistemde, P16K peptidi QD yüzeyine bağlanarak sinyal amplifikasyonu sağlanmış ve streptavidin-biotin sistemi üzerinden anti-GDF15 antikorları immobilize edilmiştir. Hazırlanan platform, 6–1600 pg/mL aralığında yüksek doğrulukla çalışmakta, 0.98 pg/mL gibi düşük bir LOD değeri sunmaktadır. Klinik serum örnekleri ile yapılan karşılaştırmalar, sistemin ELISA ile uyumlu olduğunu ve pratikte yüksek hassasiyet sunduğunu göstermiştir (Chen vd., 2025).

KVH'ların dışında farklı hastalıkların tespiti için geliştirilen GDF-15 biyosensörleri de bulunmaktadır.

Glokomun erken teşhisinde GDF-15 tespiti için BLI-ELASA (Biyolayer inferometri-enzim bağlı aptamer sandviç assay) tabanlı bir biyosensör platformu geliştirmiştir. Bu platform için insan ve fare GDF-15 proteini ile yüksek afinite gösteren bir aptamer (APT2TM) elde edilmiştir. Optik değişimin ölçüldüğü sistemde DAB (diaminobenzidin) çözeltisi ile HRP (horseradish peroksidaz)-konjugatlı aptamerlerin kristal çöktürme yoluyla sinyal amplifikasyonu sağlanmıştır (Gao vd., 2023).

Tejerina-Miranda vd. (2024), kolorektal kanserinin teşhis ve prognozunda kullanılmak amacıyla, GDF-15 tayini için manyetik mikrodestekli, amperometrik bir immünosensör platformu geliştirmiştir. Bu platformda, ekran baskılı karbon elektrotlar (SPCE) kullanılarak, streptavidin-peroksidaz (strep–HRP) ile etiketlenmiş sandviç tipi immünokompleksler, manyetik boncuklar (MB'ler) aracılığıyla elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidrokinon (HQ) varlığında ölçülen katodik akım değişimi ile orantılı olarak GDF-15 konsantrasyonu tayin edilmiştir. Geliştirilen biyoplatform, 140–10 000 pg/mL aralığında geniş bir lineer yanıt göstermiş ve 42 pg/mL gibi düşük bir tespit sınırı (LOD) elde edilmiştir.

2.5.2. Literatürde Gal-3 Analizi için Geliştirilmiş Biyosensörler

Galektin-3 (Gal-3), β-galaktozid bağlayıcı lektin ailesine ait bir protein olup hücre proliferasyonu, adezyon, apoptoz ve inflamasyon gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol

almaktadır (Dumic vd., 2006). Son yıllarda Gal-3'ün özellikle kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve fibrotik hastalıkların tanı ve prognozunda önemli bir biyobelirteç olarak öne çıkması, bu molekülün tespiti için hassas, özgül ve hızlı analiz yöntemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır (Sygitowicz vd., 2021). Bu bağlamda, özellikle elektrokimyasal ve optik transdüksiyon mekanizmalarına dayanan biyosensör sistemleri, Gal-3 tespiti amacıyla giderek artan oranda geliştirilmektedir.

Elektrokimyasal biyosensörler, düşük tespit limitleri, yüksek özgüllük, minyatürizasyon imkânı ve düşük maliyet avantajları sayesinde Gal-3 tayininde de çalışılmıştır.

Tang vd. (2018), kalp yetmezliğinde Gal-3 tayini için GC elektrot üzerinde N-dopantlı grafen nanoşeritler (N-GNRs), AuNP'ler ile kaplanmış Fe-bazlı metal organik frameworkler (Fe-MOFs) ile oluşturulan yüzey modifikasyonlarıyla (N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs) ve AuPt-metilen mavisi (MB) redoks aktif nanoprobu ile işaretlenen bir sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör geliştirmiştir. Sensör, 100 fg/mL-50 ng/mL arasında oldukça geniş bir doğrusal bir aralıkta ve 33.33 fg/mL gibi düşük bir tespit sınırı sunmuştur. Tekrarlanabilirlik ve stabilite açısından ve klinik serum örneklerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, çok aşamalı hazırlanışı nedeniyle klinik uygulamalarda yerinde (POC) testler için sınırlayıcı bulunmuştur.

Bir başka elektrokimyasal sensörde galaktozun Gal-3'ün karbonhidrat tanıma bölgesine seçici bağlanma özelliği esas alınmıştır. Park vd. (2011), tek duvarlı karbon nanotüpleri (SWCNTs), D-(+)-galaktoz ile fonksiyonlandırıp, oluşan yapıyı SiO_2-Mo elektroduna damlatarak Gal-3'ü tayini için hazır hale getirmişlerdir. Bu çalışmada Gal-3 bir kanser biyobelirteci olarak ele alınmıştır.

KVH'larda Gal-3 tespiti için tanımlanan ilk optik immünosensör Primo vd. (2018) tarafından tanımlanmıştır. Yüzey plazmon rezonansı (SPR) temelli sensörde tiyollenmiş Au yüzey üzerine, poli(diallildimetilamonyum klorür) (PDDA) grafen oksit (GO)'tan oluşan dört katmanlı bir yapı ile SAM oluşturularak üzerine GO destekli 3-aminofenilboronik asit (3ABA) immobilize edilmiştir. İkinci defa kullanılan GO anti-Gal3'ün bağlanmasını sağlarken, 3ABA antikoru yönlendirerek Fc bölgesinden yüzeye bağlanmasını sağlar. Etiketsiz ölçüme imkân veren bu sensör, anlamlı klinik aralıkta duyarlı olup, insan serumunda başarılı sonuçlar vermiştir.

Hashimoto vd. (2021), Gal-3'e spesifik bir floresan biyosensör geliştirmek amacıyla, özel olarak tasarlanmış yeni bir molekül sentezlemiştir. Bu amaçla, α-sarmal yapıda katlanan dört amino asit residüsünün ortasında yer alan bir sistein rezidüsünün prob modifikasyon bölgesi olarak bulunduğu, florofor (NBD, 4-nitrobenzoksadiazol) modifiye edilmiş peptitlerden oluşan bir kütüphane elde ederek tasarlamışlardır. Sisteine bağlı NBD probunun floresan şiddeti, artan Gal-3 konsantrasyonuyla artmış ve bu artış görsel olarak da gözlemlenebilmiştir. Elde edilen bu yeni molekül, hızlı ve özgül tanıma sağlayabilen, görsel temelli tanı sistemlerine uygun, dolayısıyla yerinde (POC) tespite yönelik biyosensör tasarımlarında kullanıma elverişli bir platform olarak değerlendirilmiştir.

KVH'lar dışında, Cerqueira vd. (2021), tarafından melanoma tanısında kullanılmak üzere, Gal-3 proteinini hedefleyen, elektrokimyasal bir moleküler baskılı polimer (molecular imprinted polymer, MIP) sensör geliştirilmiştir. Bu sensörde 2-aminofenol ve Gal-3 (analit) kullanılarak elektropolimerizasyonla oluşturulan MIP film, karbon bazlı screen printed elektrotlar (C-SPE) üzerine inşa edilmiştir. Ardından protein sensör yüzeyinden okzalik asit ile uzaklaştırarak, polimer üzerinde Gal-3'e afinite gösteren bölgelerin elde edilmesi sağlanmıştır. Sensör, kısa inkübasyon süresiyle dikkat çekmiş, serum örneklerinde de başarılı sonuçlar vermiştir. Sensörün analitik performansı EİS ölçümleri ile değerlendirilmiş ve ayrıca insan serum örneklerinde de test edilmiştir.

KY'nin hızlı teşhisi amacıyla serum dışında ağız sıvısında Gal-3 konsantrasyonunun tespiti için biyosensör çalışmaları da bulunmaktadır. Bunlardan biri Au nanoyapılı kâğıt elektrot kullanılarak hazırlanan elektrokimyasal immünosensör çalışması Nihal vd. (2024) tarafından tasarlanmış olup, parlak fotoğraf kâğıdı üzerine Au kaplanması ve EDC/NHS ile hazırlanan anti-Gal3 antikorunun sülfidril (S-H) gruplarının yüzeyde Au-S bağıyla immobilizasyonuna dayanmaktadır. Bu biyosensörle ölçülen örnekler karşılaştırma için eş zamanı ELISA ile de gerçekleştirilmiş ve sonuçların %92.7 oranında uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kardiyovasküler İnflamasyon Biyosensörlerinin Tasarımında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

GDF-15 ve Gal-3 tayini için üretilen biyosensörlerin hazırlığında kullanılan kimyasallar ve materyaller şunlardır:

- GDF-15 biyosensöründe analit olarak CHO hücrelerinde üretilmiş İnsan Büyüme Farklılaşma Faktörü 15 (Human Growth Differentiation Factor 15, GDF-15) aktif proteini (25 µg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- GDF-15 proteinine özgü antikor olarak Anti-GDF15 (tavşandan izole edilen antijene özgü poliklonal antikor, 100 µg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Gal-3 biyosensöründe analit olarak *E. coli*'de üretilmiş İnsan Galektin-3 Aktif Proteini (Human Galektin-3, Gal-3) (100 µg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Gal-3 proteinine özgü antikor olarak Anti-Galektin3 (tavşandan izole edilen antijene özgü poliklonal antikor, 100 µg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Biyosensör ölçümleri esnasında elektrokimyasal hücrede Ferrisiyanat-Ferrosiyanat redoks prob çözeltisi içerisinde kullanılan elektrotlar:

- Çalışma elektrotları:

- GDF-15 biyosensöründe katı altın elektrot: 2.01 mm^2 yüzey alanına sahip altın (%99.95 saflıkta) elektrotlar (BASi, Warwickshire, UK)

- Gal-3 biyosensöründe indiyum kalay oksit kaplı polietilen teraftalat (ITO-PET) tabaka: iletkenlik 550 nm (>%79) ve yüzey direnci 60Ω/sq, tabaka A4 boyutunda olup

2 cm x 3 mm ölçülerinde kesilerek hazırlanan çalışma elektrotları (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Karşıt elektrot: 10 cm'lik platin tel (BASi, Warwickshire, UK)
- Referans elektrot: KCl ile doygunlaştırılmış 3M Ag/AgCl elektrot (BASi, Warwickshire, UK)

Çalışma elektrotlarının temizlik prosedürlerinde kullanılan kimyasallar:

- Katı altın elektrot temizliği için: Alüminyum oksit (Gamma Alümina Tozu, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sentetik rayon (Buehler Microcloth PSA, Buehler, Coventry, UK)
- ITO-PET elektrotların temizliği için: Aseton (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Sabun Çözeltisi (Honeywell, Fluka, North Carolina, USA)

Temizlik sonrası ITO-PET elektrotları hidroksillemede kullanılan kimyasallar:

- %35'lik hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- %25'lik amonyum hidroksit (Isolab, Eschau, Germany)

Elektrot yüzeylerinde SAM oluşturulması için kullanılan kimyasallar:

- Katı altın elektrot için:
- 6-Merkapto-1-hekzanol, %97 (6-MHL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan, %98 (TMOHES), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ITO/PET elektrot için:
- Trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan, %98 (TMOHES), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Etanol (Absolute %99,9) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; Honeywell, Kuzey Carolina, USA)

Antikor immobilizasyonları sonrasında nonspesifik bağlanmaları önlemek amacıyla kullanılan kimyasallar:

- Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Elektrokimyasal ölçümler için redoks probunun hazırlanmasında kullanılanlar:

- Potasyum ferrisiyanat ($K_3[Fe(CN)_6]$), potasyum ferrosiyanat ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), potasyum klorür (KCl) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar:

- Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Karakterizasyon deneylerinde kullanılan diğer proteinler:

- İnsan Serumu (Normal Human Serum, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- İnsan Serum Albümini (Human Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amiloid beta 42 ($A\beta_{42}$) proteini (sentetik olarak elde edilen, Amyloid beta protein fragment 1-42, 0.1 mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Alfa-1 Antitripsin (A1AT), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kemerin (CH), (Human Chemerin, MyBioSource, San Diego, USA)
- Kemik siyaloprotein (BSP), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Luteinleştirici hormon (LH), (from human pituitary ≥ 8500 IU/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Osteokalsin (OCN), (human, fragment 1-49, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Visfatin (VIS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

İmmobilizasyon aşamaları için kullanılan çözeltilerin tümü deney esnasında taze hazırlanmıştır. Tüm antikor ve antijen proteinler belirli konsantrasyonlarda porsiyonlara bölünüp kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.1.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

50 mM, pH 7.0 Fosfat tamponu: 3.459 g Na_2HPO_4 ve 3.4015 g KH_2PO_4 tartılıp ayrı ayrı ultra saf su içerisinde çözülüp 500 mL'ye tamamlanarak çözeltileri hazırlandı. Bu iki çözelti pH 7.0'a ayarlanacak oranda karıştırılarak fosfat tamponu hazırlandı.

1X Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (1X PBS) (pH 7.4): 1.44 g Na_2HPO_4; 245 mg KH_2PO_4; 8 g NaCl; 200 mg KCl tartılıp ultra saf su içerisinde çözüldü, hazırlanan çözelti ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Redoks Prob Çözeltisi: 0.8231 g $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 1.0560 g $K_4[Fe(CN)_6]$ tartılıp ayrı ayrı pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözülüp 500 mL'ye tamamlarak çözeltileri hazırlandı. 5.0 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 5.0 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltileri 1:1 oranında karıştırıldı. Bu çözeltinin içerisine KCl (3.72 g, 0.1 M) eklenip çözülerek redoks prob çözeltisi hazırlandı.

Hidroksilleme çözeltisi: Her bir ITO-PET elektrot için ayrı ayrı sırasıyla NH_4OH; H_2O_2; ultra saf su 1:1:5 (V/V) oranında karıştırılarak hidroksilleme çözeltisi hazırlandı.

%1 Trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan (TMOHES): %98'lik ana stoktan 100 µL çekilip, 9.7 mL absolut etanol içerisinde çözüldü.

20 mM 6-Merkapto-1-hekzanol (6-MHL): Ana stoktan (7.089 M) 34 µL çekilip, 12 mL absolut etanolde çözüldü.

%1'lik Sığır serum albümin (BSA) Çözeltisi: 1 mg BSA tartılıp, 100 µL ultra saf su içerisinde çözüldü.

İnsan Serumu Çözeltisi: Satın alınan insan serumu çözeltisi 1XPBS çözeltisi ile 10^6 kat seyreltildi. Biyosensör çalışmalarında kullanılacak analit proteinler (GDF-15 ve Gal-3) bu çözelti ile seyreltilerek porsiyonlandı.

3.1.2. Kardiyovasküler İnflamasyon Biyosensörlerinin Tasarımında Kullanılan Cihazlar

İnflamasyon temelli kardiyak biyobelirteçlerinin tespitine yönelik biyosensör fabrikasyonunda kullanılan tüm cihazlar aşağıda sıralanmıştır:

- Döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ölçümleri için EİS ve CV yazılımı olan Gamry Framework ve analiz programı Echem Analyst içeren bilgisayar destekli, Gamry potentiostat/galvanostat/ZRA cihazı (Gamry Instruments Interface 1000, Warminster, USA)
- pH metre (Jenco pH metre (6173 pH), USA için Çin'de üretilmiştir)
- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Eppendorff mikropipet)
- Hassas teraziler (Citizon CX 220 (220g-2 mg)
- Ultrasonik banyo (Wise Clean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore)
- Manyetik karıştırıcı (Biosan MSH 300, Letonya)

- Ultra saf su cihazı (ELGA Purelab Option DV25, Paris, Fransa) kullanıldı.

Elektrot yüzeylerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI-Quanta FEG 250) ile Enerji Dağılımlı X Işını Spektroskopisi (EDX) Nokta Alan, Haritalama, Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizleri Namık Kemal Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuarı'nda (NABİLTEM) hizmet alımı olarak gerçekleştirildi.

3.1.3. Elektrokimyasal Ölçümlerin Parametreleri

Geliştirilen her iki biyosensörün elektrot yüzeylerine uygulanan immobilizasyon işlemlerinin ve optimizasyon adımlarının takibinde, döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) kullanıldı. Biyosensörlerin elektrokimyasal ölçümleri, 0.1 M KCI içeren 5.0 mM ferri-ferro redoks probu (10 mL) çözeltisinin olduğu reaksiyon hücresinin içerisinde, çalışma elektrodu (GDF-15 biyosensörü için katı altın elektrot; Gal-3 biyosensörü için ITO-PET elektrot), karşıt elektrot (platin tel) ve referans elektrot (KCl ile doygunlaştırılmış 3 M Ag/AgCl) içeren üçlü elektrot sistemi kullanılarak Gamry potansiyostat/galvanostat cihazıyla gerçekleştirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. GDF-15 Biyosensörü

3.2.1.1. GDF-15 Biyosensörünün Hazırlanması ve Ölçüm Prensibi

3.2.1.1.1. Katı altın elektrotların temizlenmesi

Çalışma elektrodu olarak katı altın elektrotların (KAE) kullanıldığı GDF-15 biyosensörünün hazırlık aşamasının önem taşıyan ilk adımı, çalışma elektrodunun yüzeyinin temizlenmesidir. Bu süreçte, Au elektrot yüzeyinde önceki denemelerden kalmış veya dış ortamdan gelen elektrot üzerine yapışmış olabilecek safsızlıkların ölçüm sonuçlarına olumsuz etkisini önlemek amacıyla, her biyosensör fabrikasyonu öncesinde elektrot temizliği yapıldı. Temizlik için öncelikle sentetik rayon yüzeyi üzerine alınan alümina tozu (alüminyum oksit) birkaç damla ultra saf su ile karıştırılarak pelte kıvamına getirildi. Yalın elektrotlar sentetik rayon yüzeyindeki bu pelte alümina üzerinde saat

yönünde, saat yönünün tersi yönünde ve sekiz çizerek birer dakika, nazikçe gezdirilerek temizlendi.

Elektrot yüzeyindeki kirliliği mekanik olarak gidermek için yapılan bu işlemden sonra, elektrot sırasıyla; ultra saf su ve etanol içinde 10'ar dakika ultrasonik banyoda sonike edildi. Sonrasında, saf su ile yıkanan elektrot argon gazı ile kurutuldu. Elektrot yüzeyinin temizliği EİS ve CV ölçümleri ile doğrulandı.

3.2.1.1.2. KAE yüzeyinde SAM'lerin oluşumu

KAE yüzey modifikasyonu için öncelikle 6-MHL ve TMOHES çözeltileri kullanılarak yüzeyde ard arda, iki ayrı kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM'ler) sırasıyla oluşturuldu. Bu amaçla, temizlenmiş yalın KAE yüzeyinde SAM'ler oluşturulması için elektrotlar öncelikle çözücü olarak absolut etanol ile hazırlanan 20 mM 6-merkapto hekzanol (6-MHL) çözeltisinde oda koşullarında gece boyunca (16 saat) karanlık bir ortamda inkübe edildi. 16 saat inkübasyonun ardından elektrotlar, yüzeylerine bağlanmamış 6-MHL moleküllerinden arındırılmak üzere önce kendi çözücüsü olan etanol ile ardından saf su ile yıkandı ve argon gazı ile kurutuldu. 6-MHL kullanarak altın yüzeyinde kükürtlü-SAMs tabakaların oluşumunun kontrolü EİS ve CV analizleri ile yapıldı. Böylelikle altının tiyollere yüksek afinitesinden yararlanarak 6-MHL moleküllerinin SAMs oluşturmak üzere yalın altın yüzeye bağlanması ve 6-MHL moleküllerinin diğer ucundaki -OH fonksiyonel gruplarının açıkta bırakılarak ikinci SAM'leri oluşturacak kimya yüzeyde sağlanmış oldu.

Yüzeyinde fonksiyonel –OH grupları oluşturulmuş elektrotlar, ilk SAM tabaka üzerinde ikinci bir SAM tabaka oluşturmak üzere, çözücü olarak absolut etanolde hazırlanmış %1'lik TMOHES çözeltisine daldırılarak gece boyunca (16 saat) 55 ℃ sabit sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında modifiye elektrot yüzeyine bağlanmamış TMOHES moleküllerini uzaklaştırmak için elektrotlar önce etanol, ardından saf su ile yıkanarak argon gazı ile dikkatlice kurutuldu. TMOHES çözeltisi ile bekletmeyle silan-SAM tabakaların oluşumu EİS ve CV analizleri ile kontrol edildi. Bu aşamada TMOHES molekülünün metoksi grupları Au elektrot yüzeyindeki tiyol yapılı ilk SAM'in açıktaki hidroksil gruplarına doğru yönelerek bağlanmıştır. Hidroksil grupları üzerine silan SAM oluşumu Şekil 2.30'da gösterilmiştir. İkinci silanlı SAM tabakanın oluşturulmasıyla birlikte elektrot yüzeyi Anti-GDF15 antikorlarının immobilizasyonu için uygun hale

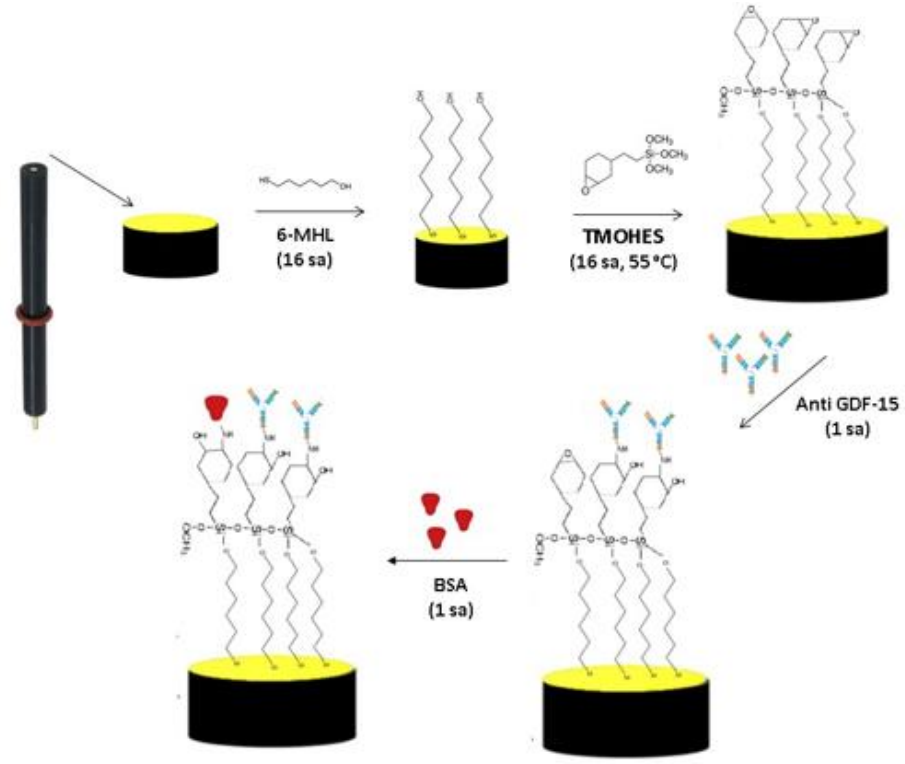
getirilmiş oldu. Böylece, herhangi bir başka ara kol veya çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duyulmadan, etiketsiz (label free) ve diğer immünoassaylerde olduğu gibi kompleks sandviç tipi bağlanmalar olmaksızın biyoalgılayıcı molekülün immobilizasyon ortamı hazırlanmış oldu.

3.2.1.1.3. Anti-GDF15 immobilizasyonu ve GDF-15 biyosensörünün tasarım stratejisi

TMOHES immobilizasyonu ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonuyla KAE'ların yüzeyindeki epoksi halkaları ile Anti-GDF15 moleküllerinin amino uç grupları arasında kovalent immobilizasyon gerçekleştirmek üzere, 1X PBS ile hazırlanan Anti-GDF15 çözeltisinden 5 µL elektrot yüzeyine damlatılarak oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 1 saat inkübe edildi. Bu işlemin ardından bağlanmamış antikor moleküllerini yüzeyden temizlemek için elektrotlar ultra saf su ile yıkandı, ardından argon gazı ile kurutuldu.

Açıkta olan ve Anti-GDF15'in bağlanmamış olabileceği aktif epoksi gruplarının kalmasını önlemek için, bloklama ajanı olarak elektrot yüzeyine ultra saf su içerisinde hazırlanmış olan %1'lik BSA çözeltisinden 5 µL damlatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Her immobilizasyon adımının sonrasında olduğu gibi bu aşamada da elektrotlar bağlanmamış BSA moleküllerini uzaklaştırmak üzere saf su ile yıkanıp argon gazı ile kurutuldu. Böylece biyosensör fabrikasyonu tamamlandı ve GDF-15 analizine hazır hale getirilmiş oldu. Hem biyoreseptör Anti GDF-15 antikorunun elektrot yüzeyine kimyasal bağlanması hem de BSA ile elektrot yüzeyinde antikor bağlanmadan kalan aktif epoksi gruplarının kapatılması işlemlerinin başarısı EİS ve CV analizleri ile kontrol edildi.

GDF-15 biyosensörünün tüm tasarım adımları (Au-Yalın, Au-6MHL, Au-6MHL/TMOHES, Au-6MHL/TMOHES/AntiGDF15, Au-6MHL/TMOHES/AntiGDF15 /BSA) Şekil 3.1'de gösterilmektedir.

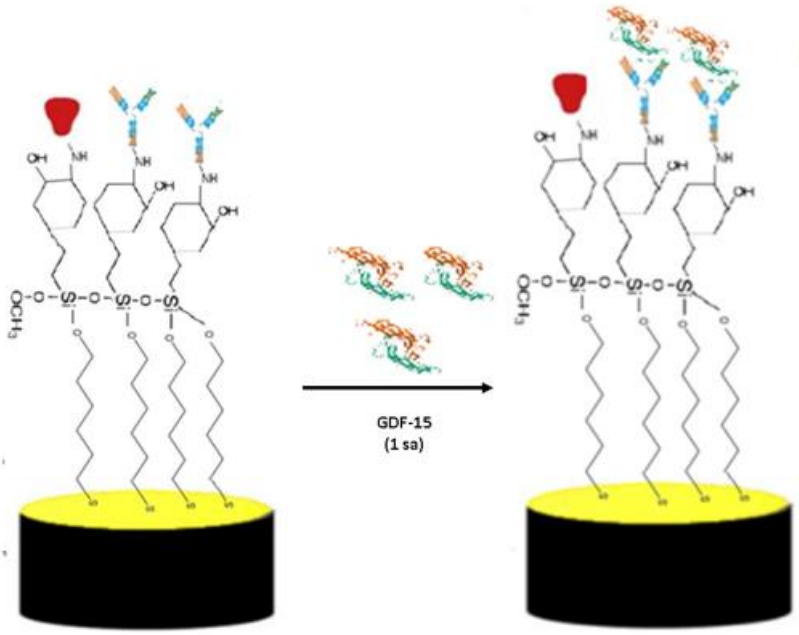


Şekil 3.1. GDF-15 biyosensörünün tasarım adımları

3.2.1.1.4. GDF-15 biyosensörü ile kantitatif analiz ve elektrokimyasal ölçümlerin parametreleri

Yüzeyi modifiye edilip GDF-15 proteinine spesifik Anti GDF-15 antikorunun immobilizasyonu ve ardından BSA molekülleri ile açık reaktif uçların kapatılması işlemlerinden sonra, biyosensör GDF-15 analizine hazır hale getirilmiştir. GDF-15 proteininin analizleri 125 pg/mL-1500 pg/mL konsantrasyon aralığında, yedi farklı GDF-15 konsantrasyonu için yapıldı. Analiz sürecinde ekleme yöntemi kullanıldı ve bu ölçümlerde elektrot yüzeyine GDF-15 analit proteininin 1X PBS tamponunda 125 pg/mL ve 250 pg/mL olarak porsiyonlanmış çözeltilerinden, ilk iki ölçümde 125 pg/mL'lık porsiyondan, sonraki beş ölçümde 250 pg/mL'lik porsiyonlardan 5'er µL damlatıldı ve 1'er saat inkübe edildi. Her inkübasyon sonrasında bağlanmamış GDF-15 moleküllerini uzaklaştırmak üzere biyosensörün yüzeyi saf su ile yıkanarak redoks prob çözeltisi içeren elektrokimyasal hücre içerisine daldırıldı ve EİS ve CV ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonrasında elektrot saf su ile yeniden yıkandı ve argon gazı ile kurutuldu.

GDF-15 biyosensörü ile GDF-15'in kantitatif analizi adımı Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



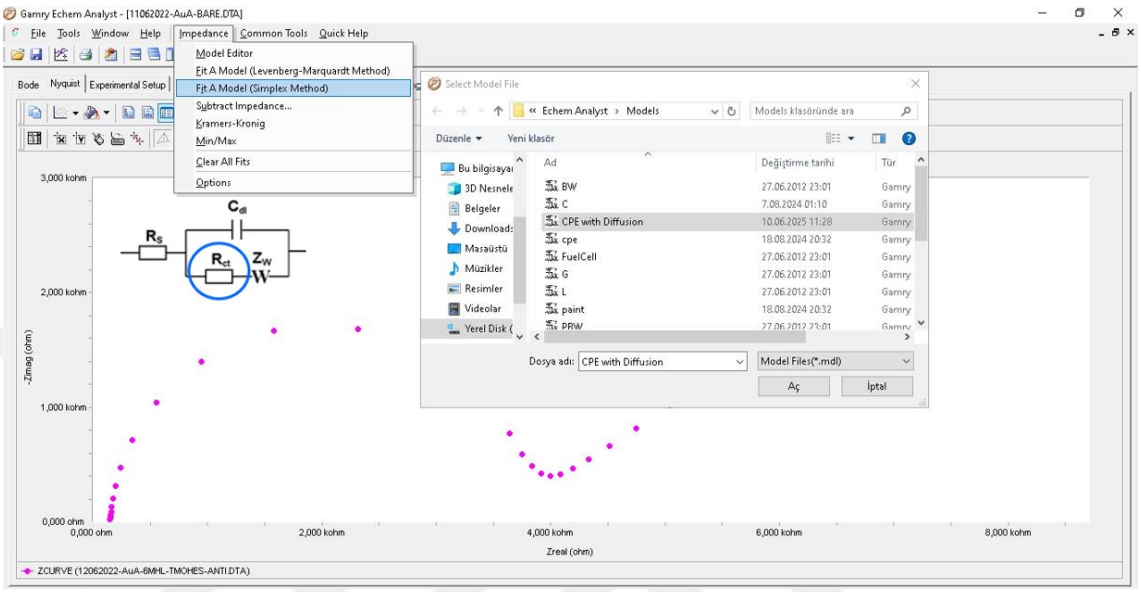
Şeki 3.2. GDF-15 biyosensörü ile GDF-15'in kantitatif analizi

Bu tez kapsamında geliştirilen GDF-15 biyosensörünün elektrot yüzeylerine uygulanan her bir immobilizasyon adımının ve optimizasyon-karakterizasyon çalışmalarının izlenmesinde analit molekül GDF-15'in analizleri EİS ve CV ölçümleri yapılarak gerçekleştirildi. Biyosensörlerin elektrokimyasal ölçümleri 0.1 M KCI içeren 5.0 mM ferri-ferro redoks probu (10 mL) çözeltisinin bulunduğu reaksiyon hücresinde, çalışma elektrodu (KAE), karşıt elektrot (Pt tel) ve referans elektrot (Ag/AgCl) içeren üçlü elektrot sistemi kullanılarak oda sıcaklığında (25 °C'de) gerçekleştirildi. EİS ve CV ölçümleri sonucunda elde edilen veriler Echem Analyst yazılımı aracılığıyla kaydedildi ve bu yazılım programı kullanılarak analizlendi.

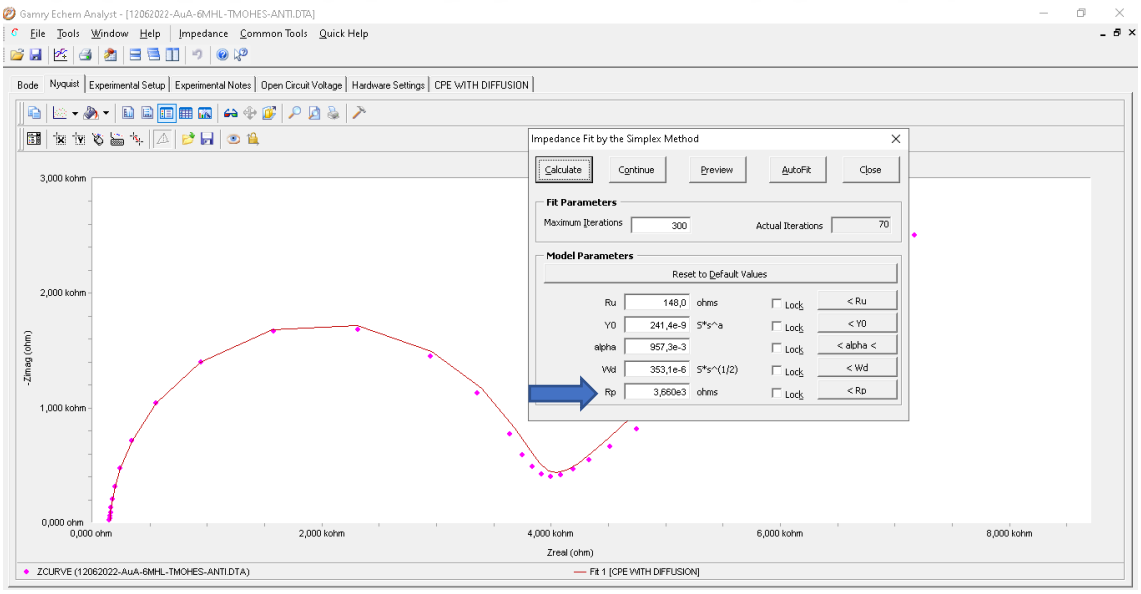
Elektrokimyasal impedans ölçümleri 5 mV alternatif akımda gerçekleştirildi. Spektrumların frekans aralığı 50 000-0.1 Hz alındı. Döngüsel voltametri ölçümlerinde uygulanan potansiyel aralığı −0.1-0.5 V, adım büyüklüğü 1 mV, tarama hızı 50 mV/s ve döngü sayısı 4 olarak seçildi.

EİS ölçümlerinden Nyquist eğrileri EChem Analyst yazılımında "Randels eşdeğer devre modeli" kullanılarak elde edildi. Nyquist eğrilerinin yarım daire çapından "yük

transfer direnci (Rct)" hesaplandı. Bu işlem için EChem Analyst programında ilgli Nyquist grafiği açıldıktan sonra üst menüde yer alan "Impedance" sekmesinden "Fit a Model (Simplex Method)" seçeneği seçildi. Açılan pencerede "CPE with diffusion" modeli seçildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Nyquist grafiğinden Rct değerinin hesaplanması



Şekil 3.4. Rct değeri hesaplama tablosu

Bu model seçildikten sonra Rct değerinin hesaplancağı yeni bir pencerede açılır (Şekil 3.4). Açılan yeni pencerede öncelikle "Reset to Default Values" seçeneği

kullanılarak tablodaki veriler varsayılan değerlere sıfırlandı. Ardından "Calculate" seçilerek ilgili Nyquist grafiğine ait Rct değerinin de dahi olduğu çeşitli parametreler hesaplandı. Şekil 3.4'te yer alan hesaplama tablosundaki Rp değeri çalışma elektroduna uygulanan belirli bir potansiyeldeki aktivasyon bariyerini temsil etmektedir. Bu potansiyeldeki Rp, standart elektrot potansiyelinde yük transfer direncine (Rct) karşılık gelmektedir (Chang & Park, 2010).

Her bir GDF-15 konsantrasyonu için elde edilen Rct değerlerinden BSA immobilizasyonu sonrası elde edilen Rct değeri çıkarılarak ($\Delta Rct = Rct_{(GDF\text{-}15)} - Rct_{(BSA)}$) ΔRct değerleri hesaplandı ve bu ΔRct değerleri ile GDF-15 konsantrasyonuna karşı standart grafiği çizildi. Herbir denemenin sonuçları, oluşturulan bu standart grafiklerin doğru denklemleri ve regresyon katsayıları dikkate alınarak değerlendirildi.

3.2.1.2. GDF-15 Biyosensörünün Optimizasyon Adımları

Biyosensör tasarımında iki ardışık SAM tabaka oluşturmak için kullanılan 6-MHL ve TMOHES çözeltilerinin konsantrasyonu, Anti-GDF15 konsantrasyonu ve inkübasyon süresi, GDF-15 analit proteininin inkübasyon süresi gibi parametrelerin optimizasyonu ile biyosensör cevabının ve duyarlılığının artırılması amaçlanmıştır.

Belirtilen her bir parametrenin optimizasyonu, diğer parametreler sabit tutularak hazırlanan biyosensörlerle GDF-15'in değişen konsantrasyonlarında kantitatif analizleri yapılarak gerçekleştirildi.

Elde edilen impedans ölçümlerinden yük transfer dirençleri (ΔRct değerleri) Bölüm 3.2.1.1.4'de belirtildiği gibi hesaplandı. Artan GDF-15 konsantrasyonuna karşı ΔRct değerleri ile çizilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve regresyon katsayıları karşılaştırılarak en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği optimum koşullar belirlendi.

Her bir optimizasyon adımının sonrasında belirlenen optimum parametre değeri kullanılarak hazırlanan GDF-15 biyosensörleri ile optimizasyon çalışmalarına devam edildi.

3.2.1.2.1. 6-MHL Konsantrasyonunun Optimizasyonu

GDF-15 biyosensörünün optimizasyonu için ilk olarak, KAE yüzeyinde ilk SAM tabakayı oluşturmak için kullanılan 6-MHL'nin optimum miktarını belirlendi. Bu amaçla, biyosensör fabrikasyonunda kullanılan diğer tüm parametreler sabit tutulup, etanol içerisinde hazırlanmış 6-MHL'nin farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri **(10 mM; 20 mM; 30 mM)** kullanılarak biyosensörler üretildi.

6-MHL immobilizasyonu ve biyosensör hazırlığı Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi uygulandı. Yalın elektrotlar bu çözeltilere daldırılarak 16 saat boyunca oda koşullarında inkübe edildi. Devamındaki immobilizasyon adımları gerçekleştirildi EİS ve CV ölçümleri alınan modifiye elektrotlar GDF-15 ölçümüne hazır hale getirildi. GDF-15 analizi için, üç farklı 6-MHL konsantrasyonunda hazırlanan her bir biyosensör yüzeyine GDF-15'in 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL; 1000 pg/mL; 1250 pg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltileri eklenerek EİS ve CV ölçümleri alındı. EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplandı. Artan GDF-15 konsantrasyonuna karşı ΔRct değerleri ile çizilen standart grafiklerden yararlanarak en yüksek biyosensör yanıtının alındığı 6-MHL konsantrasyonu optimum olarak belirlendi.

3.2.1.2.2. TMOHES Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Elektrot yüzeyinde düzgün ve tekrarlanabilir bir SAMs tabakası oluşturabilmek biyosensör performansını iyileştirmede kritik bir öneme sahiptir. GDF-15 biyosensörünün tasarımında TMOHES kullanarak, 6-MHL ile oluşturulan SAM üzerine ikinci bir SAM daha yapılandırılmıştır. TMOHES ile ikinci SAM tabaka oluşturmanın ve optimum konsantrasyonunun biyosensör yanıtına etkisini değerlendirebilmek için TMOHES'in üç farklı konsantrasyonu **(%0.5, %1, %2)** ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Elektrotlar, yukarıdaki üç TMOHES konsantrasyonunda hazırlanan çözeltilerine daldırılarak 55 °C'de ve karanlık bir ortamda 16 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Diğer tüm koşullar (6-MHL konsantrasyonu, anti-GDF15 ve GDF-15 konsantrasyon aralığı ve inkübasyon süreleri) sabit tutuldu.

GDF-15'in 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL; 1000 pg/mL; 1250 pg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri eklenerek EİS ve CV ölçümleri alındı. EİS

ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplanarak GDF-15 konsantrasyonuna karşı çizilen standart grafiklerinden optimum TMOHES konsantrasyonu belirlendi ve bundan sonraki denemelere bu konsantrasyonla devam edildi.

3.2.1.2.3. Anti-GDF15'in Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Daha duyarlı bir biyosensör geliştirmenin en önemli adımlarından biri de analitin spesifik olarak bağlanacağı biyoalgılayıcının optimum konsantrasyonunun belirlenmesidir. Bu amaçla optimize edilmiş 6-MHL (20 mM) ve TMOHES (%1) koşullarında, farklı Anti-GDF15 konsantrasyonları kullanılarak (**4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL**) biyosensörler hazırlandı. Her bir biyosensör için, GDF-15 proteininin 250-1250 pg/mL konsantrasyon aralığında yapılan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplandı ve standart grafikleri oluşturuldu. En iyi biyosensör cevabının elde edildiği optimum Anti-GDF15 konsantrasyonu belirlendi.

3.2.1.2.4. Anti GDF-15'in İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Altın elektrot yüzeyinde oluşturulmuş aktif tabakaya immobilize edilecek antikor miktarı kadar antikorun bu tabaka ile etkileşeceği sürenin optimize edilmesi de biyosensör performansını iyileştirmek için önemli bir optimizasyon aşamasıdır. Bu amaçla optimize edilmiş parametreler kullanılarak oluşturulan SAM'lerin üzerine 2 µg/mL Anti-GDF15 çözeltisinden damlatılarak, farklı sürelerde **(30 dk, 45 dk, 60 dk)** inkübasyonları gerçekleştirildi. Her bir biyosensörde GDF-15 proteininin 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL; 1000 pg/mL; 1250 pg/mL; 1500 pg/mL konsantrasyonlarına karşı alınan impedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle standart grafikleri oluşturuldu ve optimum Anti-GDF15 inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.1.2.5. GDF-15'in İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Optimize edilmiş koşullarda hazırlanan GDF-15 biyosensörünün son optimizasyon çalışması antijen-antikor bağlanması ile biyo-afinite komplekslerinin yüksek verimle oluşumu için kantitatif analiz esnasında gereken en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla hazırlanan GDF-15 biyosensörlerinde Anti-GDF15/GDF-15 etkileşimi, GDF-15 analit proteininin **30, 45 ve 60 dakikalık**

inkübasyon süreleri için test edildi. Her bir biyosensörde GDF-15 proteininin 250 pg/mL; 500 pg/mL; 750 pg/mL; 1000 pg/mL; 1250 pg/mL; 1500 pg/mL konsantrasyonlarına karşı alınan impedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle standart grafikleri oluşturuldu ve en yüksek biyosensör yanıtının gözlendiği optimum GDF-15 inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.1.3. GDF-15 Biyosensörünün Analitik Karakterizasyon Çalışmaları

GDF-15 biyosensörünün fabrikasyonunda kullanılan tüm immobilizasyon işlemlerinin optimizasyon deneyleri tamamlandıktan sonra, geliştirilen GDF-15 biyosensörünün sensör performansını, hassasiyetini, doğruluğunu, güvenilirliğini ve pratikte uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla analitik karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Belirlenen optimum koşullarda üretilen GDF-15 biyosensörlerinin analitik karakterizasyon çalışmaları doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, ticari olarak satın alınan insan serumunda analizi ve sabit frekansta impedans analizi olarak yapıldı.

3.2.1.3.1. GDF-15 Biyosensörünün Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

GDF-15 biyosensörünün geniş bir analit konsantrasyonu aralığında doğru ve tutarlı ölçümler yapabilme yeteneğini değerlendirmek amacıyla doğrusal tayin aralığı çalışması yürütüldü. Bölüm 3.2.1.2'de anlatılan optimizasyon çalışmaları ile optimum koşulların belirlenmesinin ardından, bu koşullarda hazırlanan biyosensörler ile GDF-15'in **125-1500 pg/mL** konsantrasyon aralığında çalışılarak 7 farklı konsantrasyonunda alınan EİS ve CV ölçümleriyle doğrusal tayin aralığı belirlendi. LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

Üretilen biyosensörlerin tayin sınırlarını (LOD ve LOQ değerlerini) belirlemek için, GDF-15 derişimlerine karşı impedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerlerinin kullanılmasıyla hazırlanan standart grafiklerinin eğimi (m) ve bu verilerin Microsoft Excel® yazılımı ile yapılan regresyon analizinden elde edilen standart hata (S) değerleri kullanılarak LOD=3,3xS/m; LOQ=10xS/m formülleriyle hesaplandı (Desimoni & Brunetti, 2013).

3.2.1.3.2. GDF-15 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensörlerin tekrar üretilebiliriliğini değerlendirmek adına, belirlenen optimum koşullarda ve doğrusal tayin aralığındaki konsantrasyonlarda (125-1500 pg/mL), farklı günlerde hazırlanan 10 adet GDF-15 biyosensörü ile, GDF-15 analit proteininin EİS ve CV ölçümleri alınmıştır. İmpedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle standart grafikleri oluşturuldu. 10 adet GDF-15 biyosensörü için elde edilen biyosensör yanıtları, standart grafiklerin doğru denklemleri ve regresyon katsayıları karşılaştırılarak GDF-15 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik başarısı değerlendirildi.

3.2.1.3.3. GDF-15 biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Tek bir analit konsantrasyonu için çok sayıda biyosensörün benzer biyosensör yanıtları vermesi biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Bu amaçla optimize edilmiş koşullarda hazırlanan GDF-15 biyosensörlerinden 8 adedi ile 750 pg/mL sabit GDF-15 konsantrasyonunda, diğer 8 adedi ile 1000 pg/mL sabit GDF-15 konsantrasyonunda ve10 adedi ile de 1250 pg/mL sabit GDF-15 konsantrasyonunda gerçekleştirilen EİS ölçümlerinin verileri kullanılarak GDF-15 biyosensörünün tekrarlanabilirlik potansiyeli değerlendirildi. Çalışılan bu üç konsantrasyondaki GDF-15 çözeltileriyle ayrı ayrı yürütülen çalışmalardan elde edilen impedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerlerinden ortalama biyosensör yanıtları ve bu ortalama değerlerin standart sapmaları, relatif standart sapmaları ve geri kazananım yüzdeleri hesaplandı.

3.2.1.3.4. GDF-15 biyosensörünün seçicilik çalışmaları

Bir immünobiyosensörün yüksek seçicilik özelliği, spesifik analit proteinine yüksek biyosensör cevabı verirken farklı proteinlerle düşük ya da hiç cevap vermemesi olarak açıklanabilir. GDF-15 biyosensörlerinin seçicilik çalışmasında, GDF-15 biyosensörünün farklı proteinlere verdiği cevaplar, GDF-15 analit proteinine verdiği cevap ile karşılaştırılarak incelendi. Farklı proteinler olarak; osteokalsin (OCN), kemik siyaloprotein (BSP), kemerin (CH), alfa-1-antitripsin (A1AT), amiloid beta 42 ($A\beta_{42}$), luteinleştirici hormon (LH) ve insan serum albümini (HSA) kullanıldı. Bu proteinlerin

1500 pg/mL konsantrasyonlarında 1X PBS tamponunda hazırlanan çözeltileri, GDF-15 biyosensörleri ile analizlendi. Böylece her bir proteine karşılık elde edilen biyosensör yanıtları (ΔRct değerleri) aynı konsantrasyondaki (1500 pg/mL) GDF-15 analit proteini ile alınan biyosensör yanıtlarıyla (ΔRct değerleri) karşılaştırılarak, antikorun farklı proteinlerle spesifik olmayan bağlanmalarının olup olmadığı değerlendirildi.

3.2.1.3.5. GDF-15 biyosensörünün sabit frekansta impedans (SFI) analizi

Antijen-antikor etkileşiminin kinetik davranışını izlemek amacıyla üretilen GDF-15 biyosensörü ile sabit frekansta impedans analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle optimum koşullarda hazırlanan GDF-15 biyosensörünün BSA immobilizasyonu sonrası alınan impedans ölçümünden Bode grafiği elde edildi ve bu grafikten SFI ölçümünde uygulanacak olan sabit frekans seçildi. SFI ölçümünde diğer ölçümlerden farklı olarak üçlü elektrot sistemi ölçüm hücresinde redoks probu yerine 5.0 mM fosfat tamponunda (pH 7.0) kullanıldı. Yük transferi değişimlerinin ve yüzeydeki reaksiyonların en net şekilde gözlenebileceği şekilde seçilen bu frekansta, GDF-15 analit proteini çözeltisinin ölçüm hücresine eklenmesiyle başlatılan impedans ölçümü, GDF-15'in optimum inkübasyon süresi olarak belirlenmiş olan 60 dakika (3600 saniye) boyunca gerçekleştirildi. Anti-GDF15/GDF15 arasındaki spesifik bağlanmanın zamana bağlı olarak verdiği impedanslardaki ve faz açısındaki değişimler incelendi.

3.2.1.3.6. GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulaması

Geliştirilen GDF-15 biyosensörünün gerçek biyolojik örneklerdeki kullanım potansiyelini değerlendirebilmek ve serum içerisindeki bileşenlerin antikor-analit bağlanmasına etkisini belirleyebilmek amacıyla, insan serumunda GDF-15 biyobelirtecinin analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ticari olarak satın alınan insan serumu örneği 10^6 kat seyreltilerek kullanıldı. Seyreltilmiş ticari insan serumunda GDF-15'in 125 pg/mL-1500 pg/mL çalışma aralığında hazırlanan çözeltilerinin, optimize koşullar altında hazırlanmış GDF-15 biyosensörleri ile EİS ve CV analizleri yapıldı. Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle oluşturulan standart grafiklerin doğru denklemleri ve regrasyon katsayıları üzerinden insan serumunun biyosensör cevabına etkisi değerlendirildi.

3.2.1.4. GDF-15 Biyosensörünün Yüzey Karakterizasyonu

3.2.1.4.1. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı hesaplamaları

GDF-15 biyosensörünün üretimi sürecinde, Anti-GDF15 immobilizasyonu sonrasında antikor moleküllerinin katı altın elektrot yüzeyini ne kadar kapladığını belirlemek amacıyla, yalın ve Anti-GDF15 immobilize edilmiş olan elektrotların 10-100 mV/s^{-1} potansiyel aralığında sırasıyla 10 mV'luk artışla CV ölçümleri alındı. Ölçümlerden elde edilen veriler Laviron Eşitliği'ne ($\mathbf{Q} = \mathbf{n} \times \mathbf{F} \times \mathbf{A} \times \Gamma$) uygulanarak, yalın elektrot ve Anti-GDF15 kaplanmış biyosensör yüzeylerinin yüzey alanları hesaplandı (Bard vd., 2022; Laviron, 1979).

Laviron Eşitliği'nde Q: yük miktarı, A: elektrot alanı (0.0201 cm2), n:10 farklı tarama hızında elde edilen CV'lerden belirlenen katodik akım ile potansiyel arasında çizilen grafiğin eğimi, F: Faraday Sabiti (96485 C/mol), Γ: kaplanan yüzey alanı (mol/cm^2) ifade etmektedir.

3.2.1.4.2. Taramalı elektron mikroskobu SEM ve FTIR analizi

GDF-15 biyosensörünün yüzey karakterizasyon çalışmalarında, üretilen biyosensörlerin yüzey morfolojisinin yüksek çözünürlüklü görüntülerinin alınması SEM görüntüleme analizi ile, yüzeyin elementel kompozisyonunun incelenmesi SEM-EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi) analizi ve Elementel Haritalama analizleri ile Namık Kemal Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda (NABİLTEM) elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca, biyosensör yüzeyindeki kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların tanımlanması için, 6-merkaptohekzanol, TMOHES ve Anti-GDF15 immobilizasyonu adımlarında 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR analizleri de NABİLTEM'de gerçekleştirildi.

3.2.2. Gal-3 Biyosensörü

3.2.2.1. Gal-3 Biyosensörü Hazırlanması ve Ölçüm Prensibi

3.2.2.1.1. ITO-PET elektrot hazırlığı ve temizliği

Galektin-3 (Gal-3) biyobelirtecini tayin etmek üzere üretilen Gal-3 biyosensörlerinin hazırlığının ilk aşaması çalışma elektrodu olarak kullanılacak ITO-PET elektrotların yüzey modifikasyonları için hazırlanmasıdır. Öncelikle, 1 x 1 ft boyutunda satın alınan ITO-PET tabakadan eni 3 mm olan bir şerit alınıp boyu 2 cm'lik boylarda olacak şekilde kesilerek elektrotlar elde edildi. Bu elektrotların temizlik aşamasında, üzerindeki koruyucu şerit dikkatlice kaldırılarak elektrotlar sırasıyla aseton, sabun ve ultra saf su içerisinde 10'ar dakika sonike edildi. Her bir sonikasyon işlemi arasında ve sonrasında ultra saf su içerisine daldırılarak yıkandı. Temizlenmiş elektrotlar argon gazı ile kurutularak yüzey modifikasyonuna hazır hale getirildi.

3.2.2.1.2. ITO elektrot yüzeyinde aktif hidroksil gruplarının biriktirilmesi

Temizlenmiş ITO-PET elektrotların yüzeyinde TMOHES molekülleri ile silan-SAM tabaka oluşturmak için öncelikle elektrotların yüzeyinde aktif –OH grupları biriktirmek gerekmektedir. Temizlenmiş ITO-PET elektrotlar, sırasıyla 1:1:5 (V/V) oranında hidrojen peroksit, amonyum hidroksit ve ultra saf su ile taze olarak hazırlanan çözelti içerisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 90 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda çözeltiden çıkarılan elektrotlar ultra saf suya daldırılarak yıkandı, ardından dikkatlice argon gazı ile kurutuldu. Bu işlemler sonucu SAM modifikasyonuna hazır hale getirilen ITO-PET elektrotların hidroksillenme başarısı EİS ve CV analizleri ile belirlendi.

3.2.2.1.3. TMOHES ile SAMs oluşumu

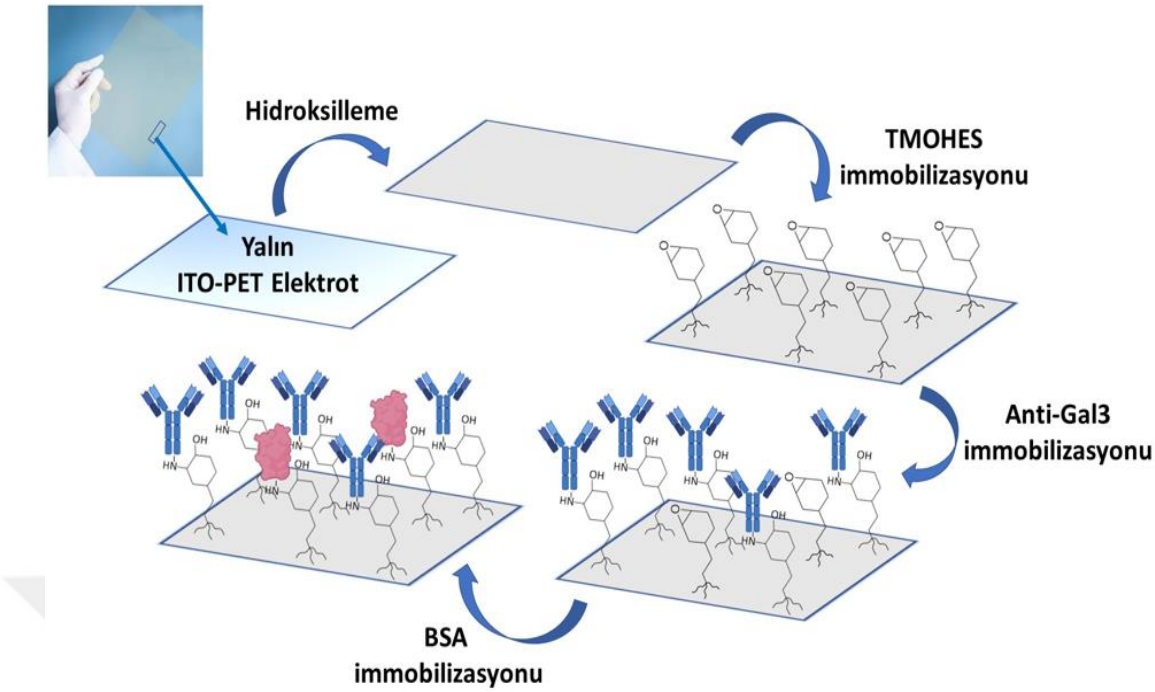
Hidroksillenmiş ITO-PET elektrot yüzeyinde silan-SAM tabakası oluşturabilmek amacıyla elektrotlar absolut etanol içerisinde hazırlanan %1'lik TMOHES çözeltisine daldırılarak gece boyu (16 saat) 37.5 ^{o}C sıcaklıkta karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bağ yapmamış TMOHES moleküllerini uzaklaştırmak için elektrotlar önce etanol ardından ultra saf su ile daldırma yapılarak yıkandı ve ve argon

gazı ile dikkatlice kurutuldu. Silan-SAM tabakalarının TMOHES çözeltisinde bekletme ile oluşumu EİS ve CV analizleri ile belirlendi.

3.2.2.1.4. Anti-Gal3 immobilizasyonu ve Gal-3 biyosensörünün tasarım stratejisi

Gal-3 biyosensörünün üretiminde ITO-PET çalışma elektrotlarının yüzeyi aktif hidroksil gruplarıyla kaplanmasının ardından TMOHES molekülleriyle modifiye edilerek Anti-Gal3 biyoreseptörünün immobilizasyonuna hazır hale getirilmiştir. Bu modifiye elektrotlar, elektrot yüzeyini kaplayan silan-SAM tabakasının epoksi uçlarıyla Anti-Gal3 moleküllerinin amino uç grupları arasında kovalent bağlar oluşturmasını sağlamak amacıyla, 1X PBS tamponunda (pH 7.4) hazırlanan 100 µL'lik Anti-Gal3 çözeltisinin içerisinde oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elektrot yüzeyindeki bağlanmadan kalan Anti-Gal3 moleküllerinin uzaklaştırılması için elektrotlar ultra saf su içerisine daldırılarak yıkandı ve argon gazı ile dikkatlice kurutuldu. Bu işlemin ardından, spesifik olmayan etkileşimleri önleyebilmek için elektrotlar %0.5'lik BSA çözeltisinde 60 dk inkübe edilerek antikor bağlanmamış açıkta kalan TMOHES uçlarının bloklanması sağlandı. Bağlanmamış BSA moleküllerinin yüzeyden arındırılması için elektrotlar ultra saf su içerisinde yıkandı ve argon gazı ile dikkatlice kurutuldu. ITO-PET elektrot yüzeyine Anti-Gal3 antikor proteinin immobilizasyonu ve antikor moleküllerinin bağlanmadığı aktif epoksi gruplarının BSA çözeltisi ile kapatılması adımlarının başarısı EİS ve CV analizleri ile belirlendi. Bu adımla birlikte Gal-3 biyosensörünün fabrikasyonu tamamlanmış oldu. Hazırlanan biyosensörler kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

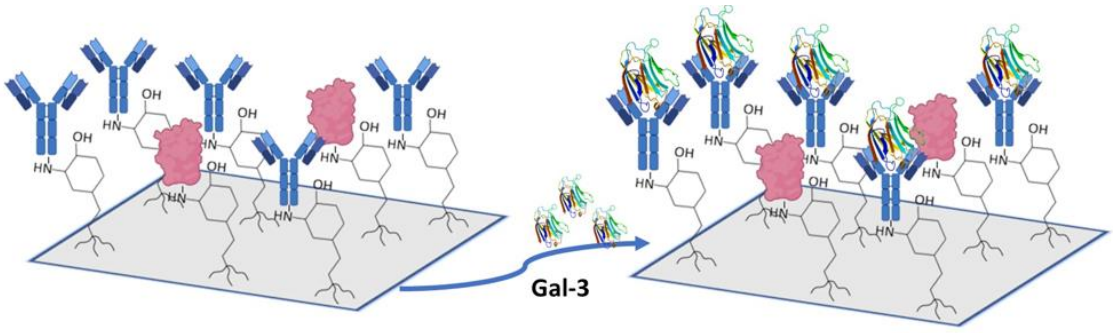
Biyosensörün tasarımı Şekil 3.5'de gösterilmiştir. Hazırlanan ITO yüzeyler ve modifikasyon aşamaları: yalın ITO; ITO-OH; ITO-OH-TMOHES; ITO-OH-TMOHES-AntiGAL3; ITO-OH-TMOHES-AntiGAL3-BSA şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 3.5. Gal-3 biyosensörünün tasarım stratejisi

3.2.2.1.5. Gal-3 biyosensörü ile kantitatif analiz ve elektrokimyasal ölçümlerin parametreleri

ITO/PET elektrotlarla üretilen Gal-3 biyosensörleri Gal-3 biyobelirtecinin kantitatif analizi için, 1X PBS tamponunda 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığında porsiyonlanmış 100 µL'lik Gal-3 çözeltilerine daldırılarak 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elektrotlar, bağlanmamış Gal-3 moleküllerini yüzeyden uzaklaştırmak için saf su ile yıkandı ve redoks prob çözeltisi içeren elektrokimyasal hücre içerisine daldırılarak EİS ve CV ölçümleri alındı. Böylece Gal-3 proteininin belirtilen konsantrasyon aralığında kantitatif analizleri gerçekleştirilmiş oldu. Şekil 3.6'da Gal-3 biyosensörü ile Gal-3 proteininin analiz adımı verilmiştir.



Şekil 3.6. Gal-3 biyosensörü ile Gal-3 proteininin analizi

Gal-3 biyosensörünün elektrot yüzeylerine uygulanan her bir immobilizasyon işleminin ve optimizasyon adımlarının izlenmesinde, CV ve EİS teknikleri kullanıldı. EİS ve CV ölçümleri sonucunda elde edilen veriler Echem Analyst yazılımı aracılığıyla analiz edildi. Biyosensörlerin elektrokimyasal ölçümleri 0.1 M KCI içeren 5.0 mM ferri-ferro redoks probu (11 mL) çözeltisi içerisindeki reaksiyon hücresinde, çalışma elektrodu (ITO-PET), karşıt elektrot (platin tel) ve referans elektrot (Ag/AgCl) içeren üçlü elektrot sistemi kullanılarak oda sıcaklığında (25 °C'de) gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal impedans ölçümleri 10 mV alternatif akımda 50 000-0.05 Hz frekans aralığında gerçekleştirildi. Döngüsel voltametri ölçümlerinde uygulanan potansiyel aralığı -0.1-0.5 V, adım büyüklüğü 10 mV, tarama hızı 100 mV/s ve döngü sayısı 5 olarak seçildi.

Gal-3 biyosensörünün üretimi esnasında uygulanan immobilizasyon basamaklarının doğrulanmasında, Gal-3 biyobelirtecinin miktar tayininde, biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında öncelikli olarak EİS verilerinden yararlanıldı. Bölüm 3.2.1.1.4'te açıklandığı şekilde Gal-3 protein ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinin yarım daire çapı verileri kullanılarak belirlenen Rct değerlerinden, BSA immobililizasyonu ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinin farkı alınarak $\Delta Rct = Rct_{(Gal\text{-}3)} - Rct_{(BSA)}$ formülü üzerinden standart grafik çiziminde kullanılan ΔRct değerleri hesaplandı.

3.2.2.2. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının optimizasyonu

Gal-3 biyosensörünün biyosensör cevabının ve hassasiyetinin iyileştirilmesi amacıyla tüm immobilizasyon süreçleri optimize edilmiştir. Bu amaçla silan-SAM tabakanın oluşmasında kullanılan TMOHES çözeltisinin konsantrasyonu, antikor molekül anti-Gal3'ün konsantrasyonu, Anti-Gal3 ve Gal-3 inkübasyon sürelerinin optimizasyonu gerçekleştirildi.

Her bir optimizasyon çalışmasında diğer parametreler sabit tutularak, Bölüm 3.2.2.1'de belirtildiği gibi hazırlanan Gal-3 biyosensörleri ile, 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki Gal-3 çözeltileri inkübasyonunun ardından EİS ölçümleri yapıldı ve ΔRct değerleri Bölüm 3.2.2.1.5'de açıklandığı şekilde hesaplandı. Artan Gal-3 konsantrasyonuna karşı ΔRct değerleri ile çizilen standart grafiklerinin doğru

denklemleri ve regresyon katsayıları karşılaştırılarak en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği optimum koşullar belirlendi.

Her bir optimizasyon adımının sonrasında belirlenen optimum parametre değeri kullanılarak hazırlanan Gal-3 biyosensörleri ile optimizasyon çalışmalarına devam edildi.

3.2.2.2.1. TMOHES konsantrasyonunun optimizasyonu

Optimum TMOHES konsantrasyonunun belirlenmesi, hidroksillenmiş ITO-PET elektrotların yüzeyinde düzenli silan-SAM tabakalar oluşturarak biyosensör performansını iyileştirmede oldukça önemli bir basamaktır. Bu amaçla, TMOHES konsantrasyonunun biyosensör yanıtına etkisini değerlendirebilmek üzere hidroksil grupları ile bağ yapabilen silan gruplarına sahip TMOHES'in absolut etanol içerisinde hazırlanmış **%0.25, %0.5, %1, %1.25** konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanıldı. Bu TMOHES çözeltilerine hidroksillenmiş ITO-PET elektrotlar daldırılarak, 37.5 °C'de ve karanlık bir ortamda 16 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Gal-3 biyosensörü üretiminin devamındaki diğer koşullar (Anti-Gal3 konsantrasyonu, Anti-Gal3 ve Gal-3 inkübasyon süreleri, BSA konsantrasyonu) sabit tutularak hazırlanan biyosensörler Gal-3 biyobelirtecinin ölçümü için hazır hale getirildi. Farklı TMOHES konsantrasyonlarında üretilen biyosensörlerin 100 µL'lik Gal-3 çözeltilerinde 1 saat süreyle inkübasyonu sonrasında EİS ve CV öçümleri alındı.

EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplandı. Artan Gal-3 konsantrasyonuna karşı ΔRct değerleri ile çizilen standart grafiklerinden yararlanarak optimum TMOHES konsantrasyonu belirlendi.

3.2.2.2.2. Anti Gal-3 konsantrasyonunun optimizasyonu

Tez kapsamında tasarlanan Gal-3 biyosensöründe antikor elektrot yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanarak etkili bir antikor immobilizasyonu gerçekleşebilmesi için, silanlama ajanı optimizasyonunun ardından en yüksek biyosensör cevabını gösteren optimum antikor konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla önceki çalışmada belirlenen optimum TMOHES konsantrasyonunda hazırlanan elektrotlar, Anti-Gal3'ün 1X PBS tamponunda hazırlanan **500 ng/mL, 1000 ng/mL, 1500 ng/mL** konsantrasyonlarındaki 100 µL'lik porsiyonlarındaki çözeltilerine daldırılarak, 60 dakika süreyle, kapalı bir

ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir biyosensör için, Gal-3 proteininin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığında yapılan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden ΔRct değerleri hesaplandı ve standart grafikleri oluşturuldu. En iyi biyosensör cevabının elde edildiği optimum Anti-Gal3 konsantrasyonu belirlendi.

3.2.2.2.3. Anti Gal-3 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Antikor immobilizasyonu adımının optimizasyonu ile ilgili yapılan bir diğer çalışma ise antikor inkübasyon süresinin optimize edilmesidir. Belirlenen optimum TMOHES ve Anti-Gal3 koşullarında hazırlanan ITO-PET elektrotlar, antikor immobilizasyonu aşamasında farklı inkübasyon sürelerinde **30-60 ve 90 dakika** olacak şekilde ayrı ayrı inkübe edildi.

Her bir biyosensörde Gal-3 proteininin 2.5 ng/mL; 5.0 ng/mL; 10 ng/mL; 20 ng/mL; 30 ng/mL ve 40 ng/mL konsantrasyonlarına karşı alınan impedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleri kullanılarak standart grafikleri oluşturuldu ve optimum Anti-Gal3 inkübasyon süresi belirlendi. Böylece antikorun elektrot yüzeyine etkili bir şekilde immobilize edilmesi sağlanarak Anti-Gal3 immobilizasyonunun optimizasyonu adımı tamamlandı.

3.2.2.2.4. Gal-3 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Tasarlanan Gal-3 biyosensörü ile analitin kantitatif analizi esnasında elektrot yüzeyinde etkili bir analit-antikor bağlanmasının gerçekleşmesi için, analit inkübasyonunun optimum süresinin belirlenmesi bir diğer gerekli parametredir. Bu amaçla, optimize koşullarda ITO-PET elektrotlarla hazırlanan Gal-3 biyosensörlerinde antikor/antijen etkileşimi, Gal-3 analit proteininin **30-60-90 dakikalık** inkübasyon süreleri için test edildi. Her bir biyosensörde Gal-3 proteininin 2.5 ng/mL; 5.0 ng/mL; 10ng/mL; 20 ng/mL; 30 ng/mL; 40 ng/mL konsantrasyonlarına karşı alınan impedans ölçümlerinin verdiği Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle standanrt grafikleri oluşturuldu ve en yüksek biyosensör yanıtının gözlendiği optimum Gal-3 inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.2.3. Gal-3 Biyosensörünün Analitik Karakterizasyon Çalışmaları

Gal-3 biyobelirtecinin analizi için tasarlanan Gal-3 biyosensörünün optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra biyosensörün analitik performansını, yanıtlarının tutarlılığını, hassasiyetini, güvenilirliğini ve diğer özelliklerini belirlemek amacıyla doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik, insan serumunda uygulanabilirlik ve depolama süresinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Tüm karakterizasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2.1'de belirtilen optimum koşullar altında hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirildi.

3.2.2.3.1. Gal-3 biyosensörünün doğrusal tayin aralığı

Optimum koşullarda hazırlanan Gal-3 biyosensörünün doğrusal tayin aralığı Gal-3 analit proteininin farklı konsantrasyonlarında (2.5 ng/mL-40 ng/mL) alınan EİS ölçümleriyle belirlendi ve LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.1.3.1'de belirtildiği gibi hesaplandı.

3.2.2.3.2. Gal-3 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Tez kapsamında geliştirilen Gal-3 biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, optimum koşullarda farklı zamanlarda hazırlanan **10 adet** Gal-3 biyosensörünün, Gal-3'ün 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığında ölçümleri alınarak karşılaştırması yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

3.2.2.3.2.1. Farklı bir çalışmacı tarafından yapılan tekrar üretilebilirlik çalışması

Gal-3 biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesinin bir diğer ölçütü aynı biyosensör çalışmasının farklı bir çalışmacı tarafından gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla Gal-3 biyosensörünün optimum koşullarda hazırlanması ve doğrusal tayin aralığındaki konsantrasyonlarında kantitatif analizi, başka bir çalışmacı tarafından aynı laboratuvar koşullarında ve ölçüm cihazında gerçekleştirilerek sonuçların karşılaştırılması yapıldı.

3.2.2.3.3. Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında, optimize koşullarda hazırlanmış **8'er adet** biyosensör ile 30 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL ve 5 ng/mL sabit Gal-3 konsantrasyonlarında gerçekleştirilen EİS ölçümlerinden Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirlik başarısı değerlendirildi. Çalışılan bu dört farklı Gal-3 konsantrasyonundaki Gal-3 çözeltileriyle ayrı ayrı yürütülen analizlerden elde edilen ΔRct değerlerinden ortalama biyosensör yanıtları ve bu ortalama değerlerin standart sapmaları, relatif standart sapmaları ve geri kazananım yüzdeleri hesaplandı.

3.2.2.3.4. Gal-3 biyosensörünün seçiciliği

Gal-3 biyobelirtecinin tayini için üretilen biyosensörün seçicilik çalışmasında, Gal-3 biyosensörünün farklı proteinlere verdiği biyosensör yanıtları, Gal-3 analit proteinine verdiği yanıtlarla karşılaştırıldı. Bu amaçla, visfatin (Vis), kemik siyaloprotein (BSP), büyüme farklılaşma faktörü-15 (GDF-15), alfa-1-antitripsin (A1AT), amiloid beta 42 ($A\beta_{42}$), ve insan serum albümini (HSA) proteinleri kullanıldı. Bu proteinlerin 1X PBS tamponunda hazırlanan 40 ng/mL konsantrasyonundaki çözeltileri, ayrı ayrı hazırlanan Gal-3 biyosensörleriyle, Gal-3 analit proteini ölçüm prosesi ile aynı şekilde analiz edildi. Böylece her bir analit proteinine karşılık elde edilen biyosensör yanıtları aynı konsantrasyondaki (40 ng/mL) Gal-3 analit proteini ile alınan yanıtlarla karşılaştırılarak, biyosensörün seçicilik performansı değerlendirildi.

3.2.2.3.5. Gal-3 biyosensörünün insan serumunda uygulaması

Gerçek biyolojik örneklerin içerisindeki bileşenlerin antikor-antijen immünokompleksinin oluşumuna ve dolayısıyla Gal-3 biyosensörünün cevaplarına etkisi olup olmadığı ticari olarak satın alınan insan serumu kullanılarak belirlendi. Bu denemede, Gal-3'ün 2.5 ng/mL-40 ng/mL çalışma aralığındaki çözeltileri 10^6 kat seyreltilmiş insan serumunda hazırlandı. Bu analit çözeltileri için EİS ve CV analizleri yapıldı. Hesaplanan ΔRct değerleriyle oluşturulan standart grafiklerin doğru denklemleri ve regrasyon katsayıları tamponda hazırlanan Gal-3 analit çözeltilerininkiyle karşılaştırılarak, insan serumunun biyosensör cevabına etkisi değerlendirildi.

3.2.2.3.6. Gal-3 biyosensörünün depolama kararlılığı

Gal-3 biyosensörlerinin depolama kararlılığını tespit etmek amacıyla, Gal-3 biyosensörleri tek kullanımlık ITO-PET elektrotlarla optimum koşullarda hazırlandı ve yaklaşık üç ay süresince +4-8 °C'de muhafaza edildi. Bu süre boyunca, 7 günde bir olmak üzere bu biyosensörlerden ikişer adedi 20 ng/mL konsantrasyonundaki Gal-3 çözeltilerinin analizinde kullanıldı. Biyosensörlerin depolama süresi boyunca verdiği yanıtlar ilk hazırlandıkları günkü biyosensör yanıtları ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma ilk günkü biyosensör yanıtı %100 kabul edilerek, diğer günlerde elde edilen biyosensör cevapları bağıl olarak değerlendirilerek yapıldı.

3.2.2.3.7. Gal-3 biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (Rejenerasyonu)

Aynı biyosensörün birden fazla ölçümde tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için rejenerasyon çalışmaları gerçekleştirilir. Rejenerasyon çalışmasında, biyosensörün ilk analit tayini sonrası biyosensör yüzeyinde oluşmuş biyoafinite kompleksi rejenere edilerek, birden fazla kez analiz için uygun olup olmadığının ve kaç tekrar kullanım ile kabul edilebilir cevaplar elde edilebileceğinin tespiti yapılmaktadır.

Geliştirilen Gal-3 biyosensörünün rejenerasyonunda, optimize edilmiş koşullarda ITO-PET elektrot yüzeyinde üretilen Gal-3 biyosensörleri 40 ng/mL konsantrasyondaki Gal-3 analit protein çözeltisiyle inkübe edildi ve yapılan EİS ölçümlerinden ΔRct değeri belirlendi. Ölçüm sonrasında ITO-PET elektrotlar 10 mM HCl çözeltisine daldırılarak 2 dakikalık bir süre boyunca rejenere edildi. Ardından elektrotlar ultra saf su içerisinde daldırılarak yıkandı. Yüzeyin durumunu ve antikor-antijen immünokompleksinin ayrışmasını tespit etmek için yeniden EİS ölçümleri yapıldı.

Ölçümün ardından, biyosensör film tabakanın yüzeyi hala anti-Gal3 antikoru ile kaplı olduğu kabul edilerek, biyosensör yeniden Gal-3 analit proteini (40 ng/mL) ile inkübe edilip EİS analizleri yapıldı. Bu işleme biyosensör aktivitesindeki kaybın anlamlı derecede azalmasına ve/veya elektrot yüzeyindeki proteinlerin denatürasyonuna ve/veya elektrot yüzeyinde geri dönüşümsüz deformasyonların oluşumu tespit edilene kadar tekrarlanarak devam edildi. Biyosensörün rejenerasyon başarısı, ilk biyosensör yanıtı %100 kabul edilerek, rejenerasyonlar sonrasında elde edilen diğer biyosensör cevapları ilk yanıta göre bağıl olarak belirlendi.

3.2.2.4. Gal-3 Biyosensörünün yüzey karakterizasyonu

Tasarlanan Gal-3 biyosensörünün yüzey karakterizasyon çalışmaları kapsamında, üretilen biyosensörlerin yüzey morfolojisinin yüksek çözünürlüklü görüntülerinin alınmasında SEM görüntüleme analizi ile yüzeyin elementel kompozisyonunu incelemek için SEM-EDX ve Elementel Haritalama analizleri ve biyosensör yüzeyindeki kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların tanımlanması için, TMOHES ve Anti-Gal3 immobilizasyonu adımlarında 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR analizleri NABİLTEM'de gerçekleştirildi.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. GDF-15 Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensör ile Elde Edilen Bulgular

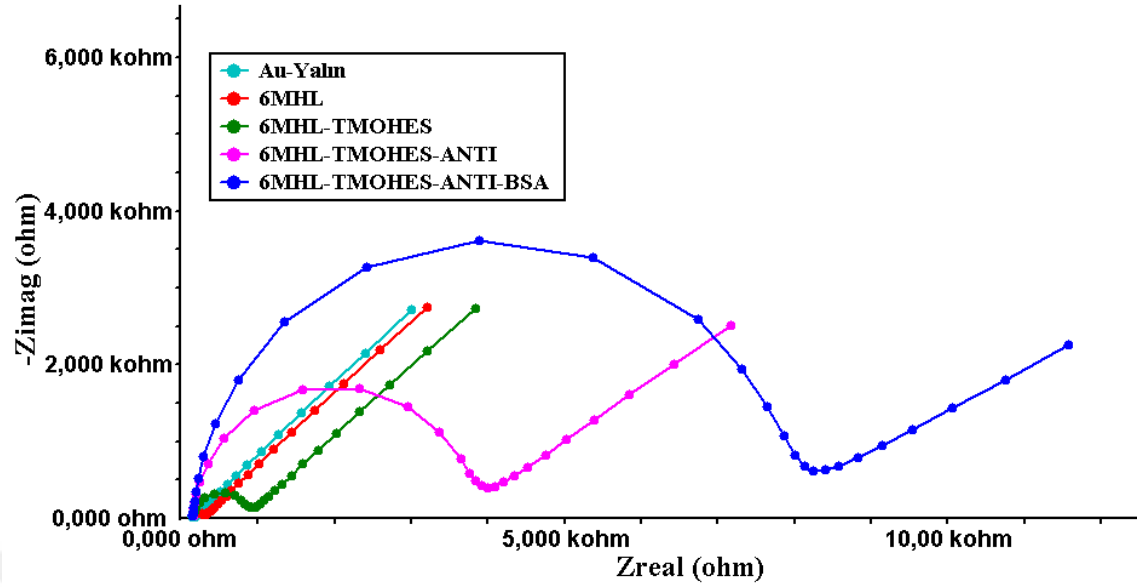
4.1.1. GDF-15 Biyosensörünün Üretim Sürecinde Elde Edilen Bulgular

GDF-15 tayini için üretilen biyosensörde üretim süreci; elektrot temizliği, tiyol-SAM ve ardından silan-SAM oluşumu, antikor immobilizasyonu ve açık epoksi uçlarının BSA ile kapatılması adımlarından oluşmaktadır.

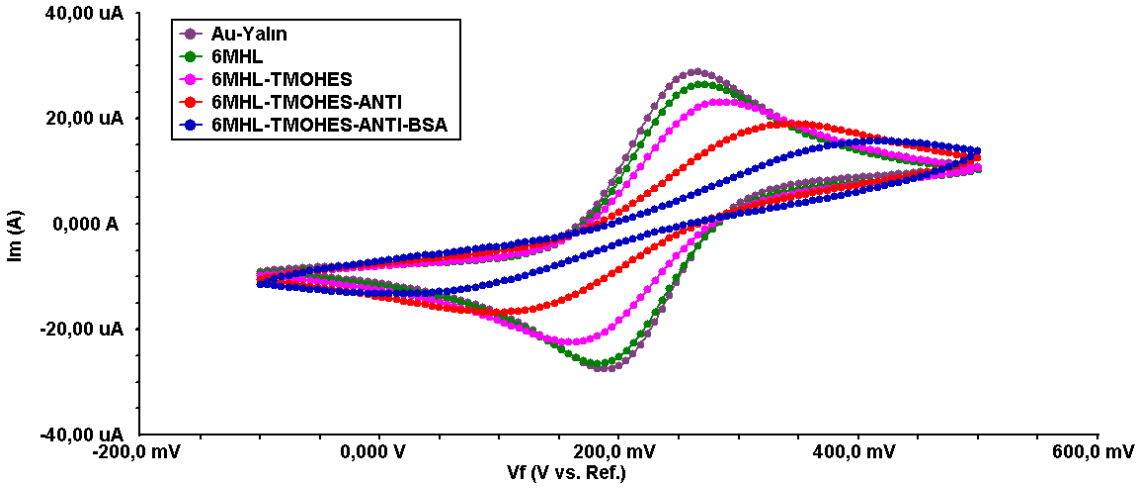
Gal-15 biyosensörünün fabrikasyonu esnasında yürütülen herbir üretim adımı aşağıda belirtilen kısaltmalarla ifade edildi:

1. **Au-Yalın**: Temizlenmiş altın elektrot yüzeyi
2. **6-MHL**: 6-MHL ile hazırlanmış ve hidroksil uç gruplarını barındıran organosülfür SAM tabakası ile modifiye edilmiş Au elektrot yüzeyi
3. **6-MHL-TMOHES**: TMOHES immobilizasyonu ile oksit üzerinde oluşan siloksan bağlarıyla düzenlenmiş SAM tabakalı Au elektrot yüzeyi
4. **6-MHL-TMOHES-AntiGDF15:** Antikor immobilize edilmiş Au elektrot yüzeyi
5. **6-MHL-TMOHES-AntiGDF15-BSA:** Antikor bağlanmamış aktif grupların BSA ile bloklanmasıyla sağlanan ve analit ölçümüne hazır Au elektrot yüzeyi

Bölüm 3.2.1.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen GDF-15 biyosensörünün hazırlığında yalın elektrottan itibaren her bir immobilizasyon basamağı sonunda EİS ve CV ölçümleri yapıldı. GDF-15 biyosensörünün fabrikasyonu esnasında gerçekleştirilen tüm adımlara ait ölçümlerden Şekil 4.1a'da gösterilen EİS spektrumları ve Şekil 4.1b'de gösterilen CV voltamogramları elde edildi.



Şekil 4.1a. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



Şekil 4.1b. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

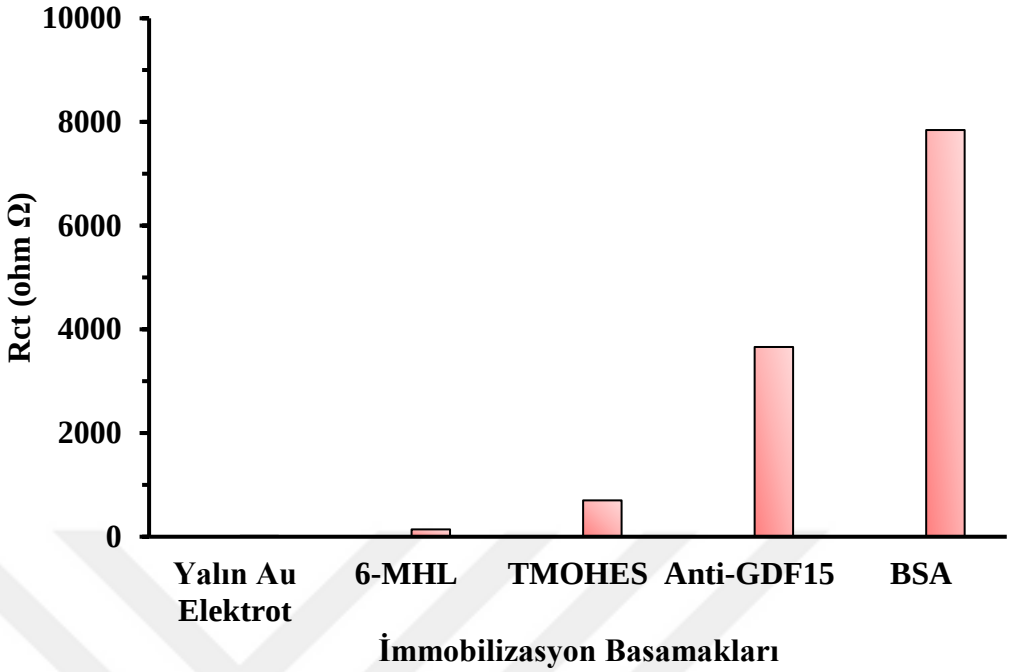
GDF-15 biyosensörü immobilizasyon basamaklarının takibinde uygulanan EİS ve CV ölçümleri, elektrot yüzey modifikasyonlarının yük transfer direncinde meydana getirdiği değişiklikleri izleme imkânı sunar. EİS spektrumlardaki Nyquist eğrilerinin yarım daire çapı yük transfer direnci (Rct) değerlerini verir. Döngüsel voltametride ise elektrot yüzeyinde meydana gelen redoks reaksiyonları esnasında oluşan akım, voltamogramlarda pik olarak gözlemlenir. Voltamogramlardaki pik yükseklikleri elektrot yüzeyinin elektriksel iletkenliği ile doğru orantılıdır.

Bu tez çalışmasında, GDF-15 biyosensörünün üretimi esnasında immobilizasyon basamaklarının doğrulanmasında, GDF-15 biyobelirtecinin miktar tayininde, biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının verilerinin değerlendirilmesinde impedansı gösteren EİS spektrumlarından öncelikli olarak yararlanıldı. Nyquist eğrileri olarak verilen bu impedans spektrumları genellikle yük transfer direnç (Rct) değerleri üzerinden yorumlanmaktadır. Rct değeri faradaik EİS analizleri için en önemli parametrelerden biridir, elektrot ile redoks probu arasındaki elektron transferine yönelik aktivasyon bariyerini yanısıtır. Bu değer, ferri-ferro redoks prob çözeltisinin elektron transfer kinetiği ile doğrudan ilişkili olarak, probun etkinliğini ve kinetiğini, elektrot yüzeyinin modifikasyonunda meydana gelen moleküler tabakaların redoks reaksiyonlarını engelleyici etkisini yansıtır. Elektrot yüzeyindeki bu engeller genellikle yüzeydeki molekülerin oluşturduğu fiziksel bariyerler başka bir deyişle sterik engeller ve elektron transferini zorlaştıran elektrostatik itme gibi kuvvetler nedeniyle oluşur.

Şekil 4.1.a'da görülen İmpedans spektrumlarının Nyquist eğrileri Bölüm 2.4.2.1'de anlatılan eşdeğer devre modeliyle eşleştirilerek yük transfer dirençleri hesaplanmıştır. GDF-15 biyosensör tasarımının her bir adımı için hesaplanan bu Rct değerleri Çizelge 4.1'de ve bu değerlerle oluşturulmuş sütun grafiği Şekil 4.1c'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerleri

Elektrot Yüzeyi	**Rct (Ohm Ω)**
Yalın Au Elektrot	16.71
Au-6MHL	141.5
Au-6MHL-TMOHES	701.2
Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15	3660
Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15-BSA	7845



Şekil 4.1c. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinin sütun grafiği

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, temizlenmiş yalın katı altın elektrotun EİS ölçümünden alınan 16.71 Ω'luk Rct değeri oldukça düşüktür, bu değer altın gibi iletken bir yüzey için beklenen bir sonuçtur. Şekil 4.1a ve b'de verilen impedans spektrumundaki en küçük Nyquist eğrisi ve döngüsel voltamogramdaki en yüksek ve en geniş karakteristik pik, yalın Au elektrot yüzeyinin temizliğini ve yüksek iletkenliğini desteklemektedir.

GDF-15 biyosensörü üretimi sürecinde, 6-MHL çözeltisiyle gece boyu inkübasyona bırakılarak altın elektrot yüzeyi ile 6-MHL moleküllerinin aktif tiyol fonksiyonel grupları arasında güçlü kovalent bağlar oluşması sağlanır. Çözeltiden yüzeye adsorbe olan 6-MHL moleküllerinin tiyol grupları yüzeydeki altın bileşenlerine bağlanırken, hidrokarbon zincirlerindeki metilen gruplarının van der Waals ve hidrofobik kuvvetler sayesinde birbirleriyle etkileşime girmelerinin katkısıyla yüzeyde kendiliğinden düzenli bir şekilde organize olarak SAM tabaka oluşturur. Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere altın yüzeye SAM'ler oluşturmak amacıyla bir tiyol bağlayıcı kolu olan 6-MHL immobilize edildiğinde Rct değerinde bir artış (141.5 Ω) meydana gelmiştir. Bu artış yüzey iletkenliğinin bir miktar azalmaya başladığını, 6-MHL moleküllerinin SAM tabakası ile sterik engellerin de etkisiyle hücrede gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyona

bir direnç sağlayarak elektron transferini bir miktar engelleyebildiğini göstermektedir. Şekil 4.1a ve b'de Nyquist eğrisi yarıçapındaki artış ve voltamogram pikindeki azalış da yine bu yüzey modifikasyonun gerçekleştiğinin bir göstergesidir.

Elektrot yüzeyinde, tiyol-SAM tabakanın üzerine TMOHES immobilizasyonuyla silan-SAM'ler oluşturularak yüzeyin modifiye edilmesi için, modifiye Au elektrot TMOHES çözeltisi ile 55 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Yüzeydeki 6-MHL SAM tabakanın açıktaki hidroksil (-OH) uçları ile TMOHES moleküllerinin metoksi grupları ($-OCH_3$) arasında oluşan siloksan (Si-O-Si) bağları oluşturur. TMOHES immobilizasyonuyla Rct değerinin (701.2 Ω) artışı redoks probunun elektrot yüzeyine difüzyonunun daha fazla engellendiğini ve TMOHES ile oluşturulan silan-SAM tabakasının etkin bir bariyer görevi görerek elektrot yüzeyini daha yalıtkan bir hale getirdiğini göstermektedir. Bu artış, EİS spektrumunda Nyquist eğrisinin yarım daire çapındaki artışla (Şekil 4.1a) ve ölçülen akımın azalması nedeniyle döngüsel voltamogramdaki pikin daralması ve yüksekliğininin azalması (Şekil 4.1b) ile de net bir şekilde görülmektedir.

Anti-GDF15 antikorunun immobilizasyonu sonucunda elektrot yüzeyinde artan impedans Rct değerinde (3660 Ω) belirgin bir artış olarak ortaya çıkmaktadır. Rct değerinin artışı, protein yapılı bu biyomolekülün nispeten yalıtkan özelliğinden ve kompleks yapısı nedeniyle immobilizasyon ajanlarına göre elektrot yüzeyinde daha büyük alan kaplamasından kaynaklanmaktadır. Bu durum ek bir sterik engel yaratır ve redoks probunun elektrot yüzeyine ulaşmasını, dolayısıyla yük transferini daha da zorlaştırır. Böylece EİS spektrumunda antikorun Nyquist eğrisinin yarım daire çapında belirgin bir artış ve döngüsel voltamogramda ölçülen akımın azalmasıyla pik yüksekliğinde belirgin bir azalış görülmektedir (Şekil 4.1a ve b). Bu veriler Anti-GDF15 immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

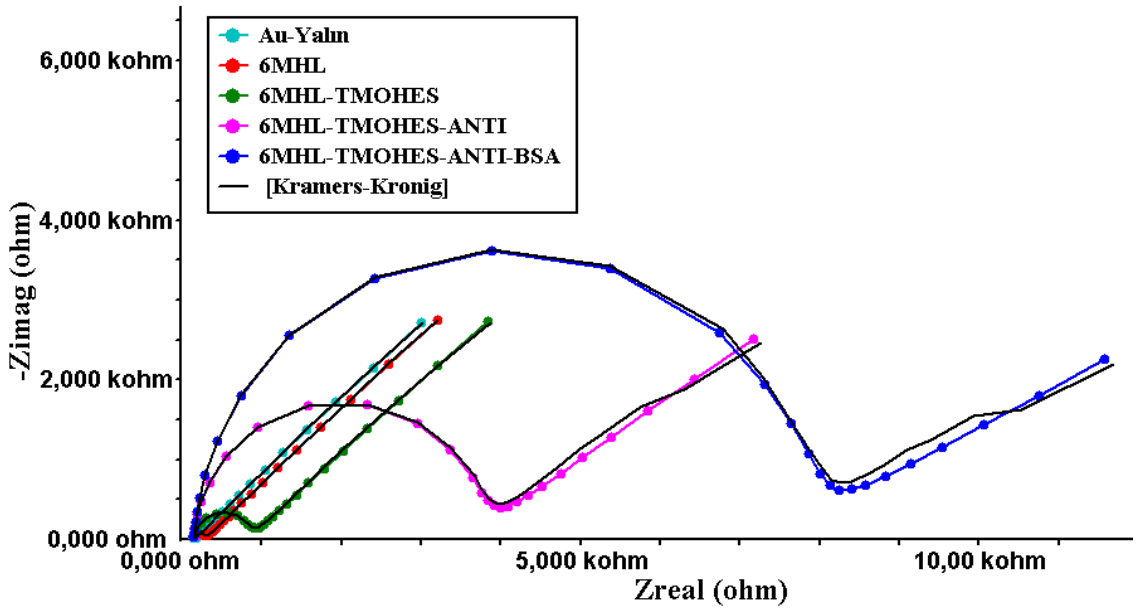
Bloklama ajanı olarak kullanılan BSA proteininin immobilizasyonuyla Rct değerinde (7845 Ω) büyük bir artış meydana gelmiştir. TMOHES molekülünün antikor ile bağ yapmamış açık epoksi uçlarını bloklamak amacıyla kullanılan BSA molekülleri difüzyonu büyük miktarda engelleyerek elektron transfer kinetiğini daha da yavaşlatır. Döngüsel voltamogramdaki pik yüksekliğinin daha da azaldığı ve anodik ve katodik piklerin birbirine yaklaşarak yayvanlaştığı görülmektedir (Şekil 4.1a ve b).

Sonuçta, EİS spektrumları ve döngüsel voltamogramlardan elde edilen tüm bu veriler KAE yüzeyinde immobilizasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve üretilen biyosensörün GDF-15 biyobelirtecinin analizine hazır olduğunu göstermektedir.

EİS spektrumlarının değerlendirilmesi amacıyla ayrıca Kramers Kroning dönüşümü tekniğinden yararlanılmıştır. Kramer's-Kronig dönüşümü, EİS spektrumundaki sapmalar hakkında fikir verir. Bu teknik impedans spektrumlarının karmaşık bileşenlerinin birbirine uyumlu olup olmadığını ve elde edilen sonuçların cihazdan kaynaklanabilecek hatalar gibi dış etkenlerden etkilenip etkilenmediğini test etmek için kullanılan matematiksel bir yöntemdir. Kramers Kroning dönüşümü tekniği ile yapılan hesaplamalar iki şekilde gerçekleştirilebilir: İmpedans verilerinin gerçek bölümünün hayali bölümü kullanılarak ya da tam tersi şekilde hesaplanır (Altay vd., 2023).

Bu amaçla biyosensör immobilizasyon basamaklarının EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerine EChem Analsyt programının Kramers Kronig dönüşüm hesaplaması uygulanmıştır. Biyosensöre ait gerçek impedans değerleri için çizilen Nyquist eğrilerine bu program ile uygulanan Kramers Kronig dönüşüm hesaplamalarından Şekil 4.2'de görülen Kramers Kronig dönüşüm eğrileri ve Çizelge 4.2'de verilen Kramers Kronig dönüşüm değerleri elde edilmiştir. Şekildeki siyah renkli eğriler Kramers Kronig dönüşüm eğrilerini, renkli olanlar ise Nyquist eğrilerini göstermektedir. Çizelge 4.2'deki Kramers Kronig dönüşüm değerleri (μ) gerçek Nyquist eğrileri ile Kramers Kronig dönüşüm hesaplamasından elde edilen eğriler arasındaki farkı göstermektedir. Hesaplanan μ değerinin düşük olması impedans ölçümlerinin dış etkenlerden etkilenmediğini, biyosensörün kararlı ve stabil olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere, GDF-15 biyosensörüne ait deneysel verilerle çizilen Nyquist eğrisileri ile Kramers Kronig Dönüşüm eğrileri çok iyi örtüşmektedir. Bu da GDF-15 biyosensör üretiminin her bir adımında elde edilen EİS spektrumlarının dış etkenlerden etkilenmediğini ve kararlı olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca oldukça düşük olarak hesaplanan Kramers Kronig Dönüşüm değerleri (μ) de bu lineerliği ve stabiliteyi desteklemektedir.



Şekil 4.2. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm eğrileri

Çizelge 4.2. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

İmmobilizasyon Adımı	Kramers Kronig Dönüşüm Değeri (µ)
Yalın Au Elektrot	5.074
6-MHL	4.090
TMOHES	32.35
Anti-GDF15	146.2
BSA	106.4

4.1.2. GDF-15 Biyosensörünün Optimizasyon Adımlarına İlişkin Bulgular

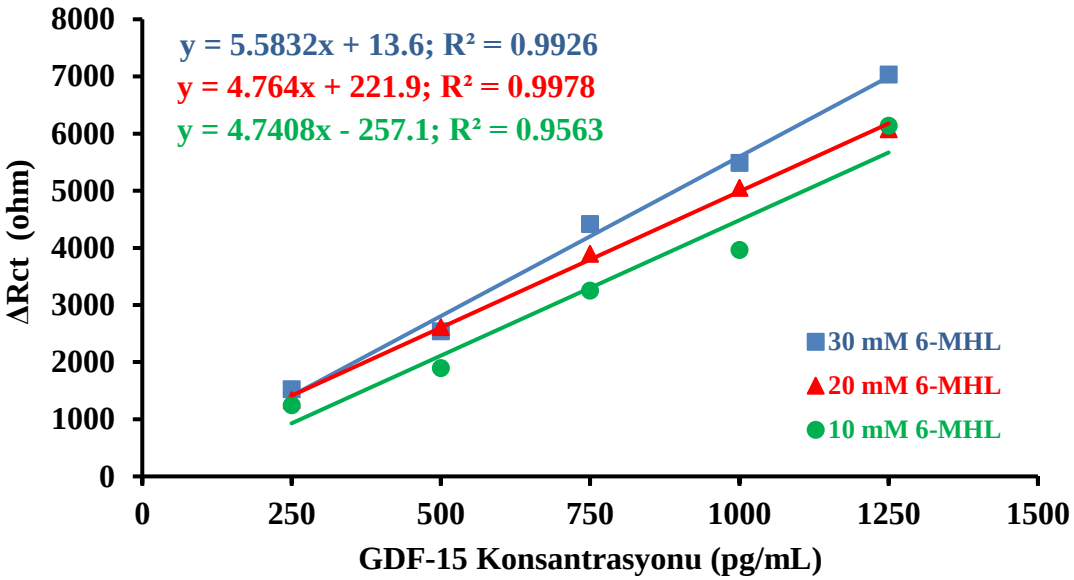
4.1.2.1. 6-MHL Molekülünün Optimum Konsantrasyonu

Tasarlanan GDF-15 biyosensöründe 6-MHL moleküllerinin yalın altın yüzeye, altının tiyollere yüksek afinitesinden yararlanarak bağlanması olan ilk modifikasyon adımında kullanılacak 6-MHL çözeltisinin konsantrasyonun belirlenmesi yüzeyde düzgün, stabil ve homojen bir SAMs tabakasının oluşturulabilmesi açısından önem arz etmektedir. Ayrıca bu tabakanın yoğunluğu ve etkinliği diğer immobilizasyonların

düzgün bir şekilde hazırlanabilmesine zemin sağlayacak ve biyosensör performansını etkileyecek ilk adım oluşu nedeniyle son derece önemlidir.

Bölüm 3.2.1.2.1'de anlatıldığı şekilde diğer parametreler sabit tutularak (%1 TMOHES, 1 µg/mL Anti-GDF15 ve 60 dk'lık Anti-GDF15 inkübasyonu) GDF-15 biyosensörünün üretiminin ilk adımı olan 6-MHL immobilizasyonu **30 mM, 20 mM, 10 mM** konsantrasyonlarda hazırlanan 6-MHL çözeltileri ile gerçekleştirilerek, en yüksek biyosensör yanıtının alındığı optimum 6-MHL konsantrasyonu belirlendi.

6-MHL çözeltisinin 3 farklı konsantrasyonunda hazırlanan biyosensörler, GDF-15'in 250-1250 pg/mL konsantrasyon aralığındaki artan 5 farklı konsantrasyonunu için 60 dk süresince inkübasyon sonrası alınan EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinin ΔRct değerleri hesaplandı. Her bir biyosensör için hesaplanan ΔRct değerleri ve GDF-15 konsantrasyonları arasında çizilen standart grafiklerden optimum 6-MHL konsantrasyonu belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı 6-MHL konsantrasyonlarının GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi

Standart grafiklerden elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3. 6-MHL konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

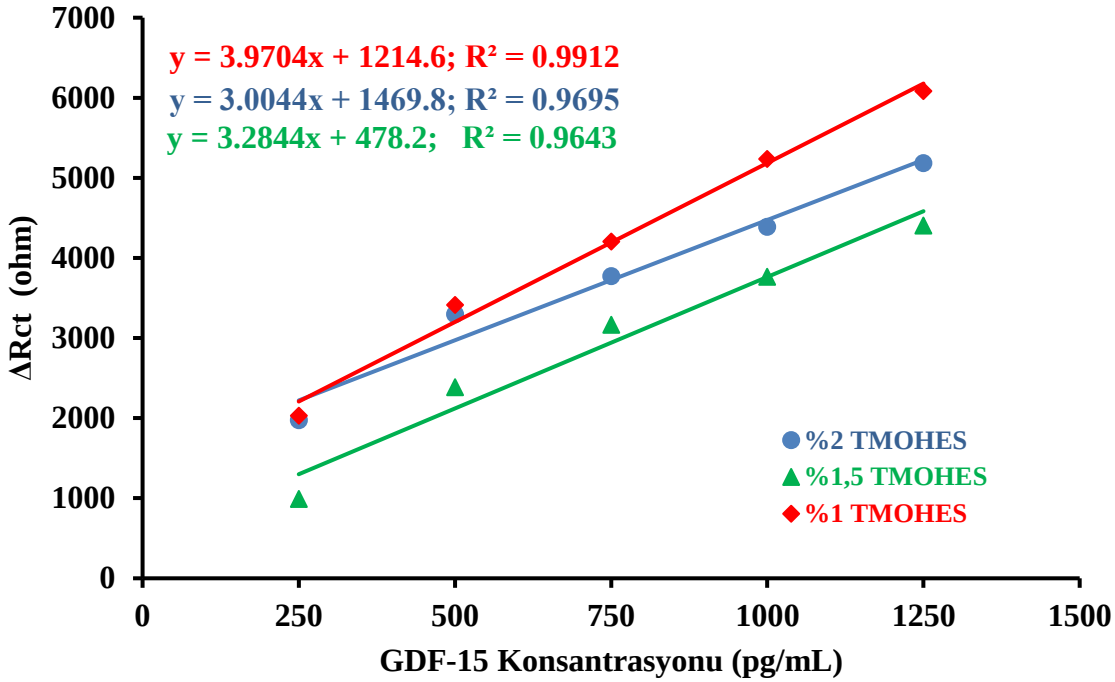
6-MHL Konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
30 mM	y = 5.5832x + 13.6	0.9926
20 mM	**y = 4.764x + 221.9**	**0.9978**
10 mM	y = 4.7408x – 257.1	0.9563

Optimum 6-MHL konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmasının standart grafikleri incelendiğinde, tüm konsantrasyonlarda hazırlanan biyosensörlerle elde edilen cevapların ve R^2 değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. 10 mM konsantrasyondaki 6-MHL çözeltisi ile hazırlanan biyosensörün dahi doğrusallık katsayısı (R^2=0.9563) kabul edilebilir bir değerdedir. Artan 6-MHL konsantrasyonlarında biyosensör cevabının bir miktar yükseldiği görülmektedir. 20 mM ve 30 mM'lık konsantrasyonlarda elde edilen R^2 değeri ve biyosensör yanıtları karşılaştırıldığında 20 mM'da daha yüksek bir doğrusallık görülürken, 30 mM'da doğrusallık katsayında bir miktar düşüş olması ile birlikte biyosensör cevabı ve doğru denkleminin eğimi nispeten daha yüksektir. Ancak daha az kimyasal madde sarfiyatı ve daha iyi çözünürlük gibi nedenlerle, pratik kullanım açısından GDF-15 biyosensörünün fabrikasyonu için optimum 6-MHL konsantrasyonu 20 mM olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. TMOHES Molekülünün Optimum Konsantrasyonu

GDF-15 biyosensörünün üretim koşullarının optimizasyon çalışmalarına TMOHES konsantrasyonun optimizasyonu ile devam edilmiştir. Elektrot yüzeyinde optimum miktarda TMOHES molekülünün bulunması antikor immobilizasyonun etkinliğini ve antikor-analit kompleksinin verimini dolayısıyla biyosensör performansını arttırabilecek önemli bir parametredir. Bu amaçla diğer parametreler sabit tutularak (20 mM 6-MHL, 1 µg/mL Anti-GDF15 ve 60 dk'lık Anti-GDF15 inkübasyonu) absolut etanol içerisinde hazırlanan TMOHES çözeltisinin 3 farklı konsantrasyonunda (**%1, %1.5, %2)** gece boyu inkübasyonu ile hazırlanan GDF-15 biyosensörleri 250-1250 pg/mL konsantrasyon aralığında GDF-15 çözeltileri ile EİS ölçümleri yapıldı. Her bir biyosensör için hesaplanan ΔRct değerleri ile GDF-15 konsantrasyonları arasında

standart grafikler Şekil 4.4'te ve bu grafiklerden elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4. Farklı TMOHES konsantrasyonlarının GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi

Çizelge 4.4. TMOHES konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

TMOHES Konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
%1	**y = 3.9704x + 1214,6**	**0.9912**
%1.5	y = 3.2844x + 478,2	0.9643
%2	y = 3.0044x + 1469.8	0.9695

TMOHES konsantrasyonunun optimizasyonu deneylerinden elde edilen standart grafikler incelendiğinde, tüm TMOHES konsantrasyonlarında biyosensör cevaplarının ve R^2 değerlerinin biribirine oldukça yakın olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

En yüksek biyosensör cevabı ve regresyon katsayısı %1'lik TMOHES çözeltisi ile hazırlanan biyosensörlerden elde edilmiştir. Daha yüksek TMOHES konsantrasyonlarında çalışıldığında %1.5'luk konsantrasyonda biyosensör yanıtlarının düştüğü ve ayrıca doğrusallığın (R^2= 0.9643) da azaldığı görülmektedir. TMOHES konsantrasyonu (%2) biraz daha artırıldığında biyosensör yanıtının arttığı ancak yine de

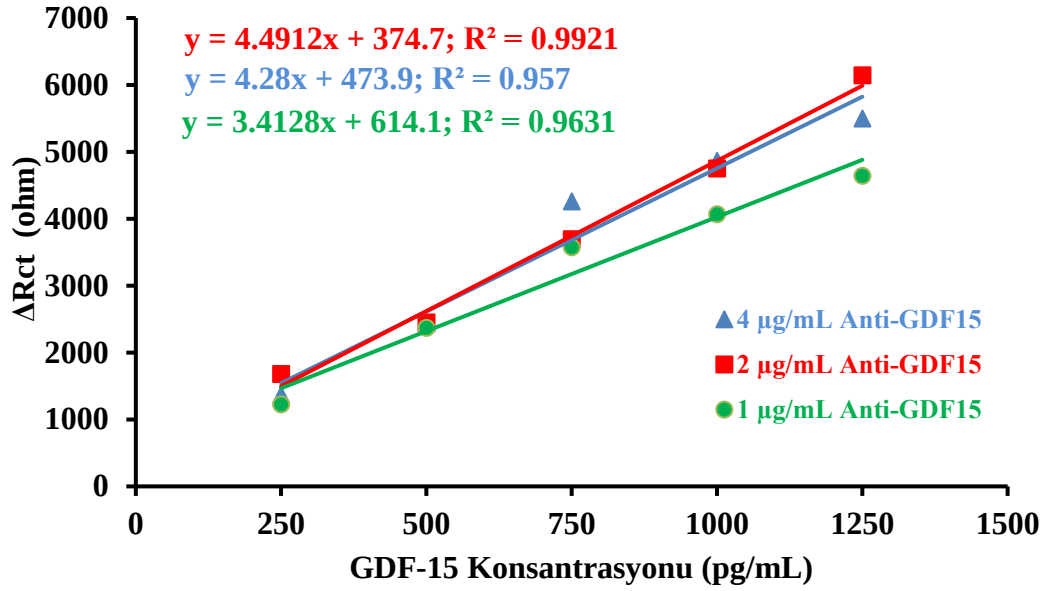
%1'lik TMOHES konsantrasyonuna göre daha düşük kaldığı ve ayrıca doğrusallığın da daha düşük olduğu görülmüştür (R^2=0.9695). %1.5 ve %2.0'lik TMOHES çözeltileri ile hazırlanan biyosensörlerde elde edilen bir miktar düşük Rct değerleri, artan TMOHES konsantrasyonun yüzey doygunluğuna ulaşılmış olabileceğini ve oluşan SAM tabakanın düzenliliğini olumsuz yönde etkiliyebileceğini gösteriyor olabilir. Bu veriler sonucunda optimum TMOHES konsantrasyonu %1 (R^2=0.9912) olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda GDF-15 biyosensörleri bu konsantrasyonda üretilmiştir.

4.1.2.3. Anti GDF-15 Optimum Konsantrasyonu

Bir immünosensörde biyotanıma elementi olarak görev yapan antikor molekülünün immobilizasyonunda kullanılacak optimum miktarının belirlenmesi, antijen-antikor arasındaki spesifik bağlanma verimini ve dolayısıyla biyosensör duyarlılığını arttırmada en önemli adımlardan biridir.

Bu amaçla farklı Anti-GDF15 konsantrasyonları **(4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL)** kullanılarak ve diğer üretim parametreleri (20 mM 6-MHL, %1 TMOHES, Anti-GDF15 ve 60 dk'lık Anti-GDF15 inkübasyonu) sabit tutularak biyosensörler hazırlandı. Her bir biyosensör 250-1250 pg/mL konsantrasyon aralığındaki GDF-15 çözeltileriyle inkübe edildi ve EİS analizleri gerçekleştirildi. Hesaplanan ΔRct değerleri ile GDF-15'in artan konsantrasyonlarında her bir biyosensör için Şekil 4.5'te verilen standart grafikler oluşturuldu. Standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.5'te görülmektedir.

Elde edilen standart grafikler incelendiğinde, 1 µg/mL Anti-GDF15 konsantrasyonunda hazırlanan biyosensör cevabının diğer iki antikor konsantrasyonuna göre nispeten düşük kaldığı ve R^2 değerinin de 0.9631 olduğu, 2 µg/mL'lik antikor konsantrasyonunda ise hazırlanan biyosensörler için çizilen standart grafiğin eğiminin (m=4.4912) ve doğrusallık katsayısının (R^2=0.9921) çalışılan konsantrasyonlar içinde en yüksek olduğu görülmektedir. 4 µg/mL antikor konsantrasyonunda alınan biyosensör cevapları değerlendirildiğinde, 1 µg/mL'lik konsantrasyonuna göre daha yüksek olduğu ancak 2 µg/mL'lık antikor konsantrasyonuna göre ise bir miktar daha düşük kaldığı görülmektedir. Ayrıca regresyon katsayıları açısından 4 µg/mL'lik antikor konsantrasyonu ile diğerlerine göre nispeten en düşük R^2 değeri (0.957) elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı Anti-GDF15 konsantrasyonlarının GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi

Çizelge 4.5. Anti-GDF15 konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

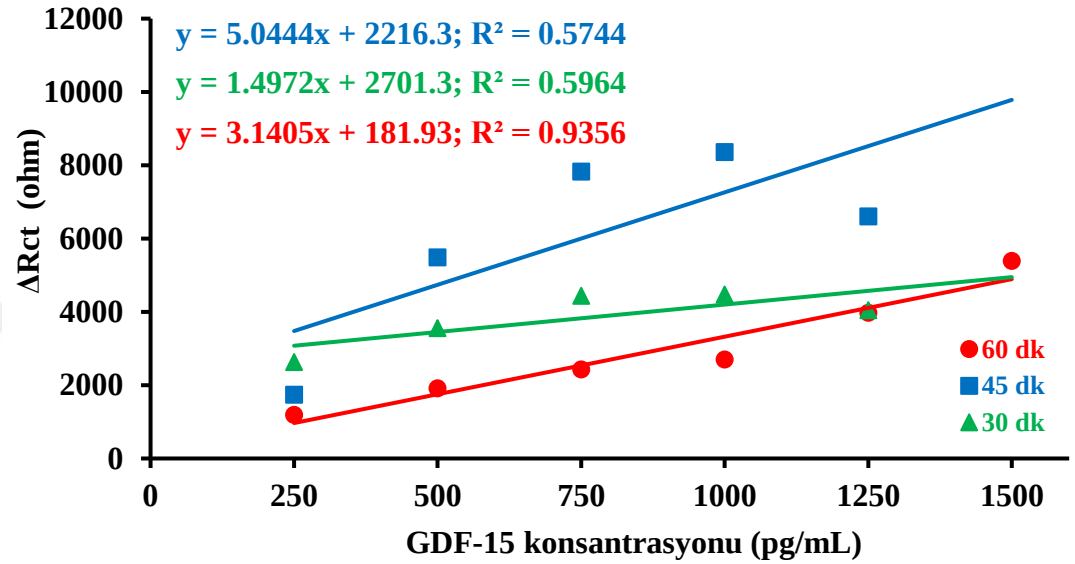
Anti-GDF15 konsantrasyonu	**Doğru Denklemi**	**Doğrusallık Katsayısı (R^2)**
4 µg/mL	y = 4.28x + 473.9	0.957
2 µg/mL	**y = 4.4912x + 374.7**	**0.9921**
1 µg/mL	y = 3.4128x + 614.1	0.9631

Sonuç olarak 2 µg/mL konsantrasyonda 4 µg/mL'ye göre daha az antikor proteini ile benzer biyosensör yanıtlarının elde edilmesi ve doğrusallığın daha ideal oluşu nedeniyle, 2 µg/mL optimum Anti-GDF15 konsantrasyonu olarak belirlenmiştir ve sonraki çalışmalarda biyosensör üretimine Anti-GDF15'in bu konsantrasyonunda devam edilmiştir.

4.1.2.4. Optimum Anti-GDF15 İnkübasyon Süresi

Biyosensör yüzeyinde düzgün ve kararlı bir antikor tabakasının oluşabilmesi için diğer bir parametre Anti-GDF15 inkübasyon süresinin optimizasyonudur. Bu amaçla önceki çalışmalarda belirlenmiş optimum parametreler (20 mM 6-MHL, %1 TMOHES, 2 µg/mL Anti-GDF15) sabit tutularak, **30, 45 ve 60 dakikalık** antikor inkübasyon

sürelerinde hazırlanan biyosensörlerin 250-1500 pg/mL GDF-15 konsantrasyon aralığında EİS ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir inkübasyon süresi için çizilen standart grafikler Şekil 4.6'da verildi. Standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları ise Çizelge 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Farklı Anti-GDF15 inkübasyon sürelerinin GDF-15 biyosensör yanıtına etkisi

Çizelge 4.6. Anti-GDF15 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Anti-GDF15. İnkübasyon Süresi	**Doğru Denklemi**	**Doğrusallık Katsayısı (R^2)**
30 dakika	y = 1.4972x + 2701.3	0.5964
45 dakika	y = 5.0444x + 2216.3	0.5744
60 dakika	**y = 3.1405x + 181.93**	**0.9356**

Biyosensörün hazırlık aşamasının mümkün olduğunca kısa tutulması istenen bir durum olsa da antikor immobilizasyonunda yeterince beklenmediği durumda, biyosensör yüzeyine yeterince antikor bağlanamadığı ve bununla birlikte biyosensör performansının düştüğü Şekil 4.6'daki standart grafiklerde açık bir şekilde görülmektedir.

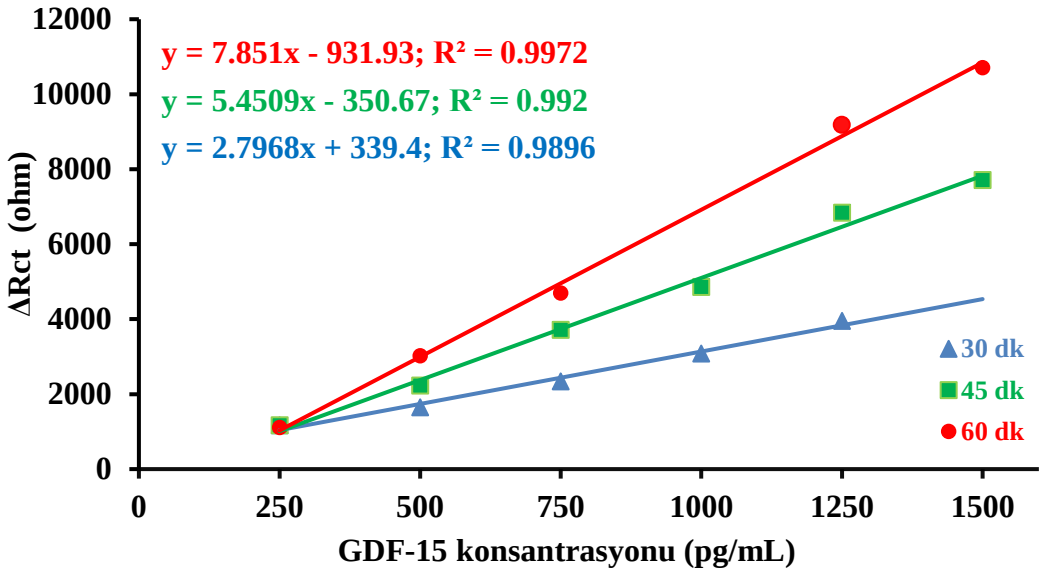
30 ve 45 dakikalık inkübasyon sürelerinde çizilen standart grafiklerden, alınan biyosensör yanıtları düşük analit konsantrasyonlarında bile yüksek olmalarına rağmen analit konsantrasyonu arttıkça biyosensör yüzeyinde büyük olasılıkla analitle

etkileşebilecek yeterince antikor bulunamadığından biyosensör cevabında düşüş ortaya çıkmıştır. İnkübasyon süresinin kısa tutulması nedeniyle daha az antikor molekülünün elektrot yüzeyine bağlanmış olması bu kararsızlığın nedeni olabilir. 30 ve 45 dakikalık inkübasyon sürelerinde doğrusal yanıtların elde edilememesi R^2 değerlerinin de 0.6'nın da altında kalması ile sonuçlanmıştır. Buna karşılık Anti-GDF15 inkübasyon süresi 60 dakikaya çıkarılarak gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar biyosensörün doğrusal yanıt verdiğini (R^2=0.9356) göstermektedir. Bu sonuç, antikor moleküllerinin biyosensör yüzeyi ile yeterince inkübe edildiğinde stabil bir şekilde bağlandığını ortaya koymaktadır. Elde edilen tüm veriler doğrultusunda optimum Anti-GDF15 inkübasyon süresi 60 dakika olarak seçilmiştir.

Ayrıca 60 dakikalık antikor inkübasyon süresinin uygulandığı çalışmada yüzey kararlılığını değerlendirmek amacıyla bir üst analit konsantrasyonunda da (1500 pg/mL) analiz gerçekleştirilmiştir. Grafikten görüldüğü üzere bu konsantrasyonda da biyosensör cevabı doğrusal olarak artmıştır. Bu sonuç da Anti-GDF immobilizasyonu için 60 dakikalık inkübasyon süresinin kullanılmasını pekiştirir niteliktedir. Bundan sonraki çalışmalara GDF-15 analit proteininin çalışma aralığının üst konsantrasyonu olarak 1500 pg/mL devam edilmiştir.

4.1.2.5. GDF-15 Optimum İnkübasyon Süresi

Optimizasyon çalışmalarında son olarak GDF-15 kantitatif analizi sırasında GDF-15 biyobelirtecinin inkübasyon süresi değerlendirilmiştir. Bu amaçla önceki çalışmalarda belirlenen optimum parametreler kullanılarak üretilen biyosensörler, 250 pg/mL-1500 pg/mL konsantrasyon aralığında GDF-15 analit proteininin çözeltileriyle **30-45 ve 60 dakika** sürelerinde inkübe edilmiştir. EİS ölçümleri gerçekleştirilen biyosensörlerin impedans spektrumlarından elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleri ile GDF-15 konsantrasyonları arasında standart grafikleri oluşturulmuştur. Çizilen standart grafikler Şekil 4.7'de ve bu grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayılarının karşılaştırıldığı tablo Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. GDF-15'in farklı inkübasyon sürelerinde bekletilmesinin biyosensör yanıtına etkisi

Çizelge 4.7. GDF-15 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

GDF-15 İnkübasyon Süresi	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
30 dakika	y = 2.7968x + 339.4	0.9896
45 dakika	y = 5.4509x – 350.67	0.992
60 dakika	**y = 7.851x – 931.93**	**0.9972**

Şekil 4.7'de verilen standart grafiklerinden GDF-15 analit proteininin elektrot yüzeyine immobilize edilmiş olan antikor molekülleri ile artan inkübasyon süresinin biyosensör cevaplarını ve aynı zamanda doğrusallığı da artırdığı görülmektedir. 30 dakikalık inkübasyon süresinde dahi elde edilen standart grafiğin lineerliği (R^2=0.9896) yüksek olsa da 45 ve 60 dakikalık inkübasyon sürelerine göre biyosensör yanıtın daha düşük olduğu görülmüştür. İnkübasyon süresinin daha uzun tutulması, antikor-antijen immünokompleksinin daha fazla oluşmasında etkili olduğunu düşündürmektedir. Analit GDF-15'in 60 dakikalık inkübasyon süresinde en yüksek biyosensör cevabının ve R^2 değerinin (R^2=0.9972) elde edilmesi nedeni ile maksimum verimlilik için optimum GDF-15 inkübasyon süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen GDF-15 biyosensörünün üretiminin ve çalışma koşullarının optimizasyonu ile belirlenen tüm değerler Çizelge 4.8'de listelenmiştir.

Çizelge 4.8. GDF-15 biyosensörünün optimum çalışma koşulları

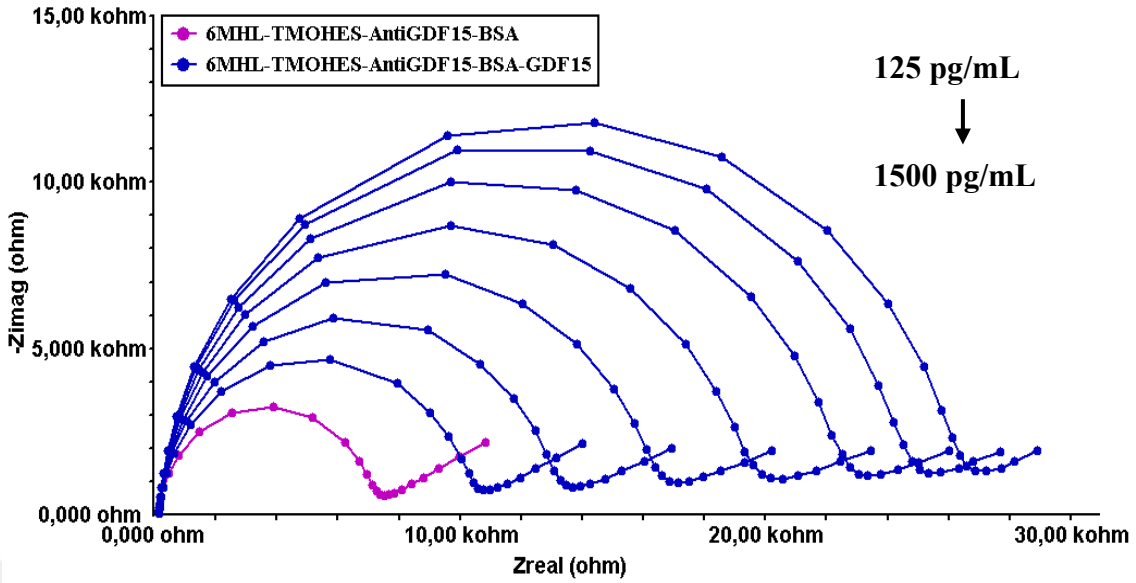
Optimizasyon Parametreleri	Optimum Değerler
6-MHL Konsantrasyonu	20 mM
TMOHES Konsantrasyonu	%1
Anti-GDF15 Konsantrasyonu	2 µg/mL
Anti-GDF15 İnkübasyon Süresi	60 dk
GDF-15 İnkübasyon Süresi	60 dk

4.1.3. GDF-15 Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

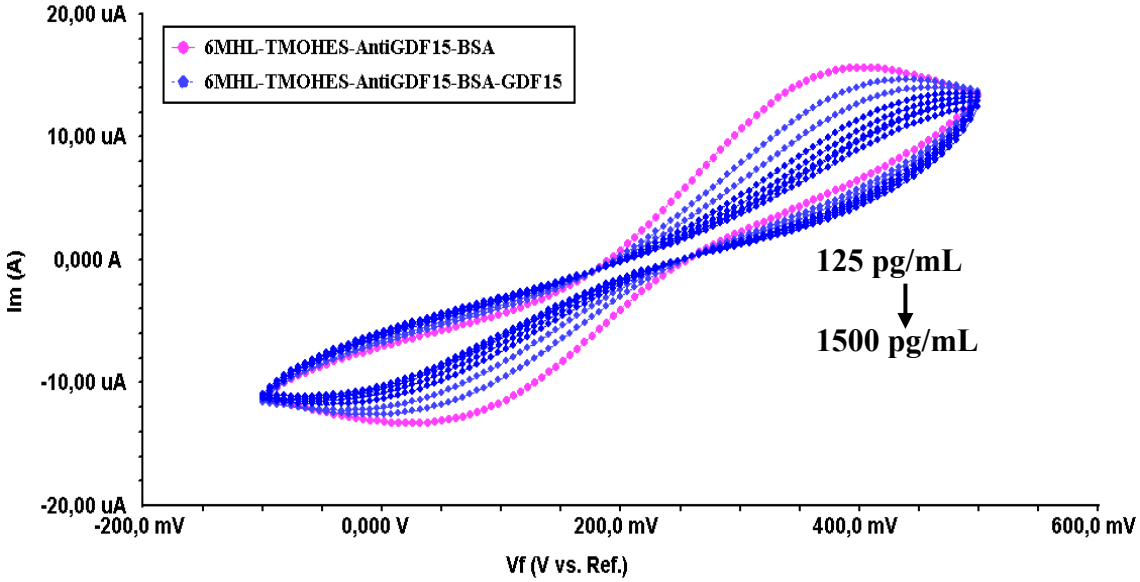
GDF-15 biyosensörünün optimum çalışma koşullarının belirlenmesinin ardından Çizelge 4.8'de belirtilen optimum koşullarda ve Bölüm 3.2.1.1'de belirtildiği gibi hazırlanan biyosensörlerin analitik ve yüzey karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu karakterizasyon çalışmaları, geliştirilen GDF-15 biyosensörünün hassasiyeti, tekrarlanabilirliği, tekrar üretilebilirliği, pratik uygulamalardaki potansiyeli gibi özelliklerini ortaya koymaktadır.

4.1.3.1. GDF-15 Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı

Doğrusal tayin aralığı biyosensörün analite verdiği yanıtın doğrusal olduğu konsantrasyon aralığını tanımlamaktadır. Biyosensör, analitin tanımlanan bu konsantrasyon aralığında hassas, tekrarlanabilir ve doğru sonuçlar verir. GDF-15 biyosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemek üzere hazırlanan biyosensörler ile, GDF-15 biyobelirtecinin artan 7 farklı konsantrasyonunda EİS ve CV ölçümlerinden elde edilen impedans spektrumları Şekil 4.8'de ve döngüsel voltamogramlar ise Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8. GDF-15 biyosensörünün 125-1500 pg/mL tayin aralığındaki Nyquist eğrileri

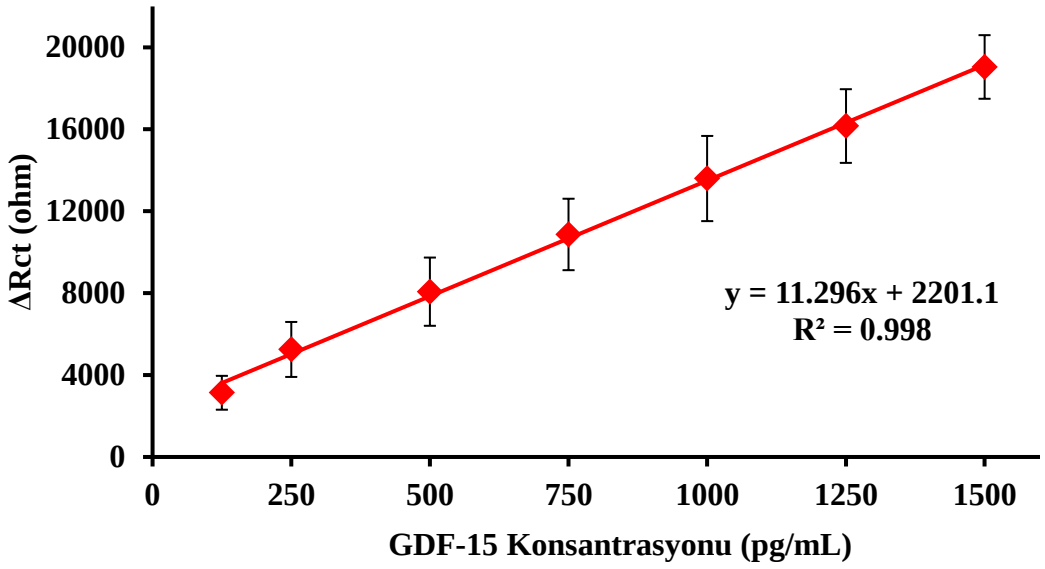


Şekil 4.9. GDF-15 biyosensörünün 125-1500 pg/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları

Şekil 4.8'de mor renk ile verilen Nyquist eğrisi, üretilen GDF-15 biyosensörünün son üretim basamağı olan BSA immobilizasyonu sonrası alınan EİS ölçümünü gösterirken, mavi renk ile verilen Nyquist eğrileri 125 pg/mL-1500 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan GDF-15 analit protein çözeltilerinin 1 saatlik inkübasyonu sonrası alınan EİS ölçümlerini göstermektedir. Şekil 4.9'da da aynı adımların döngüsel

voltammogramları verilmiştir. EİS spektrumlarında görüldüğü üzere, her bir analit konsantrasyonu artışıyla Nyquist eğri yarıçaplarının düzenli artması, yük transfer direncindeki kademeli artışı net bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu, elektrot yüzeyinde artan GDF-15 konsantrasyonu ile daha fazla antikor-antijen afinite kompleksinin oluştuğunu, artan biyoafinite komplekslerinin yük transferini engelleyerek yüzeydeki direnci arttırdığını göstermektedir. Aynı şekilde Şekil 4.9'da verilen döngüsel voltamogramda pik akım yüksekliklerinin düzenli azalışı, yüzeyde daha fazla Anti-GDF15/GDF-15 immünokompleksi oluştuğunu ve bunun sonucu olarak elektron transferi zorlaşarak, elektrot yüzeyine ulaşan redoks aktif türlerin azaldığını göstermektedir. Bu difüzyon engeliyle elektrokimyasal tepkime kinetiğinin yavaşlaması, CV ölçümlerinde uygulanan potansiyel aralıkta akımdaki düzenli azalışı ifade etmektedir.

GDF-15 biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 125 pg/mL-1500 pg/mL olarak belirlenmiştir ve doğrusal tayin aralığı grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu kalibrasyon grafiği, hazırlanan 10 adet biyosensör için 125-1500 pg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen ΔRct değerlerinin aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.10. GDF-15 biyosensörünün kalibrasyon grafiği

GDF-15 biyosensörünün Şekil 4.10'da verilen kalibrasyon grafiğinde artan GDF-15 konsantrasyonlarının ΔRct değerlerinde lineer bir artışa yol açtığı görülmektedir.10

ayrı GDF-15 biyosensörüne ait ΔRct değerlerinin ortalamalarıyla oluşturulan kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi y = 11.296x + 2201.1 olarak belirlenmiş olup, R^2 değeri ise 0.998 gibi oldukça yüksek bir değer olarak tespit edilmiştir. GDF-15 biyosensörünün LOD değeri 83.8 pg/mL olarak ve LOQ değeri 254.2 pg/mL olarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar, GDF-15 biyosensörünün analit proteinine olan duyarlılığının yüksek olduğunu, biyosensörün geniş bir aralıkta, lineer ve güvenilir yanıtlar verdiğini ortaya koymaktadır.

4.1.3.2. GDF-15 Biyosensörünün Tekrar Üretilebilirliği

GDF-15 biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini belirlemek amacıyla optimum koşullarda farklı zamanlarda hazırlanan 10 adet biyosensörün doğrusal tayin aralığında gerçekleştirilen EİS ölçümleri sonucunda elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle GDF-15 analit konsantrasyonları arasında standart grafikleri çizildi. Bu grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. GDF-15 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Biyosensör Numarası	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Tayin Aralığı (pg/mL)
1	y = 11.873x + 160.48	R^2 = 0.9756	125-1500
2	y = 9.8869x + 1868.5	R^2 = 0.9928	125-1500
3	y = 10.65x + 1037.1	R^2 = 0.9994	125-1500
4	y = 12.547x + 290.5	R^2 = 0.9939	125-1500
5	y = 9.8997x + 2936.3	R^2 = 0.9894	125-1500
6	y = 11.443x + 2158.8	R^2 = 0.9907	125-1500
7	y = 11.829x + 4271	R^2 = 0.971	125-1500
8	y = 11.851x + 2961.5	R^2 = 0.9951	125-1500
9	y = 11.31x + 2991.,4	R^2 = 0.9789	125-1500
10	y = 11.671x + 3335.8	R^2 = 0.9824	125-1500

Çizelgede gösterilen doğru denklemlerinin eğimleri incelendiğinde, eğimlerin birbirine yakınlığı ve R^2 değerlerinin benzer ve yüksek oluşu, farklı zamanlarda hazırlanan biyosensörlerin benzer biyosensör cevapları verdiğini, yani benzer duyarlılık

gösterdiğini, GDF-15 analit konsantrasyonuna verdiği cevabın benzer ve tutarlı olduğunu ve dolayısıyla tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

4.1.3.3. GDF-15 Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği

Biyosensörün tekrarlanabilirliği optimize edilmiş koşullarda farklı zamanlarda hazırlanan biyosensörler ile tek bir analit konsantrasyonunda EİS ölçümleri alınarak belirlenir. Bu amaçla GDF-15 analit proteininin 750 pg/mL ve 1000 pg/mL sabit konsantrasyonları ile 8'er adet, 1250 pg/mL sabit konsantrasyonu ile 10 adet GDF-15 biyosensörleri kullanılarak EİS ölçümleri yapıldı.

Aynı konsantrasyondaki GDF-15 proteinleriyle her bir biyosensör için yapılan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan ΔRct değerleri Şekil 4.10'da verilen kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde yerine konarak GDF-15 analit konsantrasyonları hesaplandı. Bu konsantrasyonların aritmetik ortalama, standart sapma, relatif standart sapma ve % geri kazanım değerleri belirlendi. 750, 1000 ve 1250 pg/mL GDF-15 konsantrasyonları için tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 4.10'da görülmektedir.

Çizelge 4.10. GDF-15 Biyosensörünün tekrarlanabilirlik sonuçları

Ortama eklenen GDF-15 miktarı (pg/mL)	Biyosensör ile ölçülen GDF-15 miktarı (pg/mL)*	Standart Sapma	Relatif Standart Sapma %	Geri Kazanım
750	757.16	122.63	16.19	100.95%
1000	1005.81	149.61	14.87	100.58%
1250	1235.73	159.26	12.88	98.86%

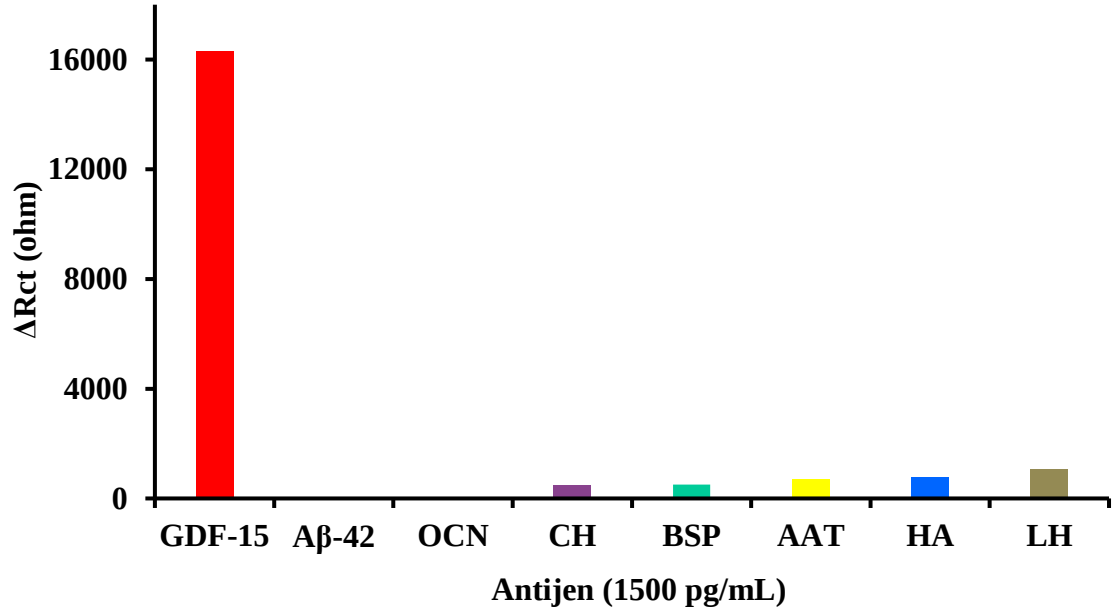
*GDF-15 miktarları kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi y = 11.296x + 2201.1 kullanılarak hesaplanmıştır ve ölçümlerin ortalama değeri verilmiştir.

Çizelge 4.10'da verilen tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçlarına göre, her bir sabit konsantrasyon için GDF-15 biyosensörü ile yapılan ölçümden belirlenen ΔRct değerlerinin kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde yerine koymayla hesaplanan konsantrasyonların yakın değerlerde ve kendi içlerinde uyumlu olduğu, oldukça başarılı % geri kazanım performansına ve kabul edilebilir düzeyde sapma değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu yüksek geri kazanım yüzdeleri ve hesaplanan konsantrasyon

ortalamaları, nispeten yüksek relatif standart sapma değerlerine rağmen, GDF-15 biyosensörünün hedef analiti olan GDF-15'i ölçüm doğruluğunun yüksek olduğuna işaret etmektedir.

4.1.3.4. GDF-15 Biyosensörünün Seçiciliği

Seçicilik çalışmalarında, GDF-15 biyosensörünün hedef analit protein dışındaki farklı proteinlerle aynı konsantrasyonda (1500 pg/mL) gerçekleştirilen impedans ölçümlerinden elde edilen biyosensör yanıtları yine aynı konsantrasyondaki (1500 pg/mL) GDF-15 analit proteini ile alınan yanıtlarla karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan proteinler, osteokalsin (OCN), kemik siyaloprotein (BSP), kemerin (CH), alfa-1-antitripsin (A1AT), amiloid beta 42 ($A\beta_{42}$), luteinleştirici hormon (LH) ve insan serum albümini (HSA)'dır. Spesifik olmayan etkileşimlerin biyosensör yanıtlarına etkisi EİS ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrileri üzerinden hesaplanan ΔRct değerlerindeki değişimlerin incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Bu karşılaştırmaların sonuçları Şekil 4.11'deki grafikte gösterilmektedir.



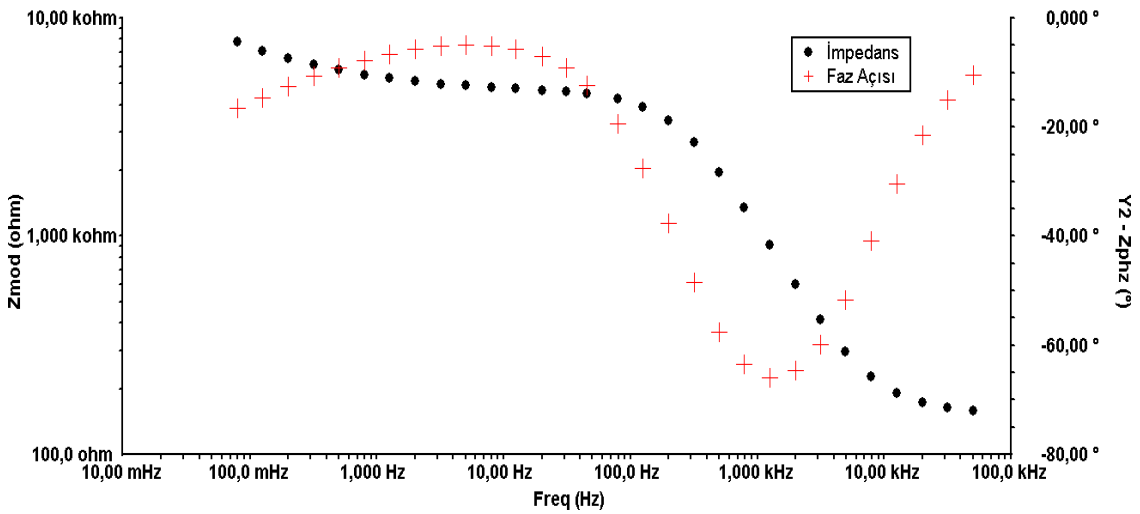
Şekil 4.11. GDF-15 biyosensörünün seçicilik çalışmaları grafiği

Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, GDF-15 biyosensörünün analit proteini için verdiği biyosensör cevabının yanında diğer proteinlere verdiği cevabın düşük olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar GDF-15 biyosensörünün GDF-15 analit proteinine

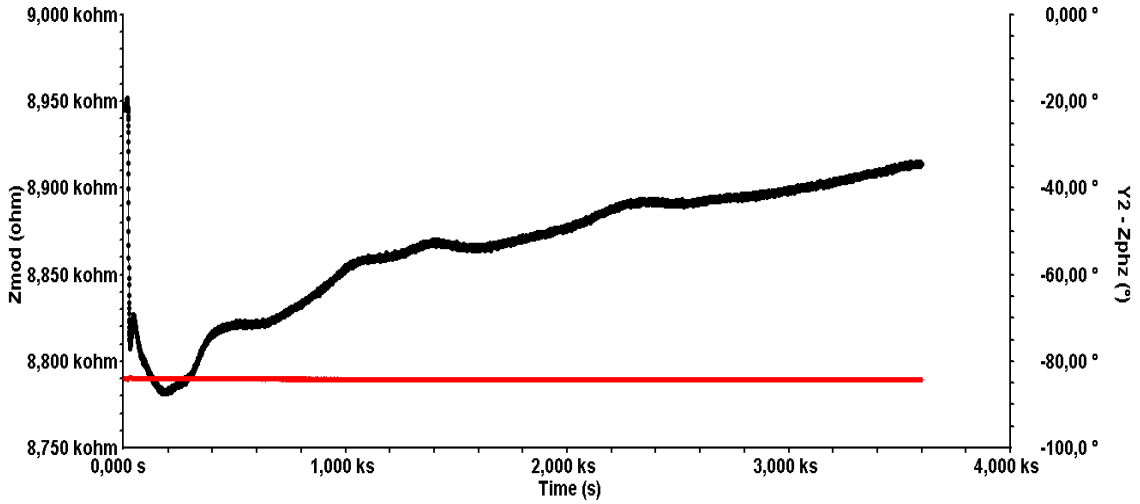
karşı yüksek seçiciliğe sahip olduğunu ve farklı proteinler varlığında spesifik olmayan etkileşimlerden sadece minimun düzeyde etkilendiğini göstermiştir. Bu sonuçlar biyosensörün gerçek kan örneklerinde ve klinik uygulamalardaki seçiciliğinin, güvenilir ve doğru sonuçlar verme potansiyelinin yüksek olabileceğini göstermektedir.

4.1.3.5. GDF-15 Biyosensörünün Sabit Frekanstaki İmpedans (SFI) Analizi

SFI analizinde, sabit frekansta Anti-GDF15/GDF15 arasındaki spesifik bağlanmanın eş zamanlı olarak izlenmesi, zamana karşı impedans ölçümü yapılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle optimize koşullarda hazırlanmış GDF-15 biyosensörünün impedans verilerinden elde edilen Bode grafiğinden yararlanarak sabit frekans **125 Hz** olarak belirlendi. Belirlenen bu sabit frekansta, 5.0 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içerisine daldırılmış 3'lü elektrot sisteminde, tampon çözeltisi içerisine GDF-15 çözeltisi eklenerek SFI ölçümleri gerçekleştirildi. Zamanın ve faz açısının bir fonksiyonu olarak elde edilen SFI ölçüm sonuçları Şekil 4.13'de gösterilmektedir. Şekil 4.12'de ve Şekil 4.13'de siyah renk ile gösterilen noktalar zamana karşı impedans değişimini, kırmızı renk ile gösterilenler ise zamana karşı faz açısındaki değişimi ifade etmektedir.



Şekil 4.12. GDF-15 biyosensörünün BSA inkübasyonu sonrası Bode grafiği



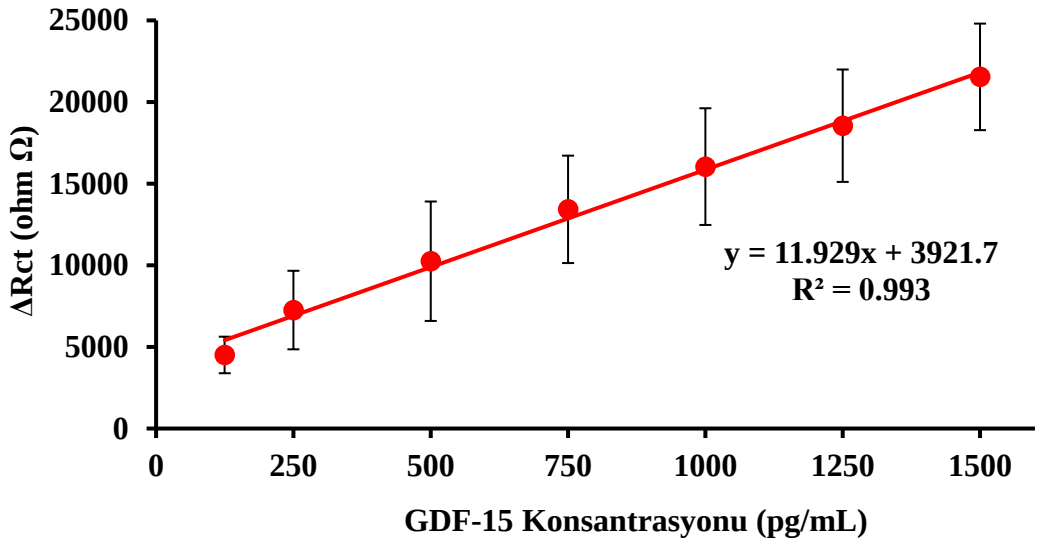
Şekil 4.13. GDF-15 biyosensörünün SFI analizine ait grafik (siyah renkli eğri impedansı, kırmızı renkli eğri faz açısını göstermektedir)

Şekil 4.13'deki SFI grafiği, elektrot yüzeyinde meydana gelen antikor-antijen arasındaki etkileşimin sabit frekansta zamana bağlı olarak impedansı artırdığını net bir şekilde göstermektedir. Bu artış, Anti-GDF15 ile GDF-15 arasındaki biyokompleksin başarılı bir şekilde oluştuğunu ortaya koymaktadır. İmpedanstaki artış hızının bir süre sonra yavaşlaması, elektrot yüzeyinde antikor-antijen etkileşiminde zamanla ortaya çıkan bir doygunluk eğiliminin etkisini gösteriyor olabilir. Ayrıca, bu sonuç GDF-15 analit proteininin optimum inkübasyon süresinin 60 dakika olarak seçilmesini de doğrular niteliktedir.

4.1.3.6. GDF-15 Biyosensörünün İnsan Serumunda Uygulaması

GDF-15 biyosensörünün geliştirilmesinin nihai hedefi, gerçek biyolojik örneklerde GDF-15'in miktarının yüksek hassasiyetle belirlenmesi ve bu analizin klinik uygulamalarda yer bulmasıdır. Klasik bir tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan analit proteini ile yapılacak bir analize göre insan serumu içerisinde hazırlanan analit proteinin analizinin bazı avantajları vardır. İnsan serumu daha gerçekçi bir matris olduğundan gerçek biyolojik örneklerle yapılacak analizlere daha benzer bir ortam sağlar. Serumda yapılan analizler ileriki çalışmalarda gerçek örneklerle elde edilecek sonuçlar hakkında fikir vererek, biyosensörün klinik uygulamalarda gösterebileceği performansın değerlendirilmesini sağlayabilir.

GDF-15 biyosensörünün gerçek biyolojik örneklerdeki etkisini anlamlandırabilmek amacıyla ticari olarak satın alınan insan serumunda GDF-15 protein analizleri gerçekleştirildi. İnsan serumu 10^6 kat seyreltilerek 125-1500 pg/mL doğrusal tayin aralığındaki GDF-15 çözeltileri bu serum çözeltisinde hazırlandı ve 5 ayrı GDF-15 biyosensörü analizleri aynı koşullarda gerçekleştirildi. Artan GDF-15 konsantrasyonlarında alınan impedans ölçümlerinden elde edilen ΔRct değerlerinin ortalamasıyla Şekil 4.14'te verilen standart grafiği oluşturuldu.



Şekil 4.14. GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulamasının kalibrasyon grafiği

Şekil 4.14'te görülen ticari olarak satın alınan insan serumunda doğrusal tayin aralığında hazırlanan GDF-15 çözeltileri için çizilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi, fosfat tamponunda aynı konsantrasyonlarda hazırlanan GDF-15 protein çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi y = 11.296x + 2201.1 (R^2=0.998) ile çok benzerlik göstermektedir (Şekil 4.10). Bu sonuçlar üretilmiş olan GDF-15 biyosensörünün klinik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

İnsan serumunda doğrusal tayin aralığında hazırlanmış her GDF-15 konsantrasyonu için üretilen biyosensör ile ölçümün sonuçları ve % geri kazanım performansı Çizelge 4.11'de görülmektedir.

Çizelge 4.11. GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulaması sonuçları

Kullanılan GDF-15 miktarı (pg/mL)	Biyosensör ile ölçülen GDF-15 miktarı (pg/mL)	Geri Kazanım
125	141	112.8
250	312	124.8
500	522	104.4
750	821	109.5
1000	1119	111.8
1250	1344	107.5
1500	1585	105.6

GDF-15 biyosensörünün insan serumunda uygulamasından elde edilen ölçüm değerlerinden % geri kazanım performansının nispeten başarılı olduğu söylenebilir. Tampon çözeltide hazırlanan analit proteinleriyle elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçlarına göre, beklendiği üzere, insan serumunda hazırlanan analit çözeltileriyle elde edilen ölçüm sonuçlarında, GDF-15 biyosensörüyle analit konsantrasyonlarının daha yüksek ölçülmesi ve nispeten yüksek % geri kazanım performansının görülmesi serum içerisindeki matris proteinleri ve bileşenlerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

4.1.3.7. GDF-15 Biyosensörünün Yüzey Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.3.7. 1. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı hesaplamaları

Bir elektrodun kaplanan yüzey alanının hesaplanmasında Laviron eşitliği kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında KAE yüzeyinin Anti-GDF-15 immobilizasyonu sonrası antikor protein ile ne kadar kaplandığını belirlemek amacıyla Au-yalın elektrot ve Anti-GDF-15 immobilizasyonuyla kaplanmış (Au / 6-MHL / TMOHES / Anti GDF-15) elektrotlar için 10-100 mV potansiyel aralığında 10 farklı potansiyelde CV ölçümleri alındı. CV ölçümlerinden elde edilen voltamogramların katodik pik eğrilerinden 10 farklı potansiyeldeki katodik akımları hesaplandı. Uygulanan potansiyel değerlerine karşılık katodik akım değerleri arasında bir grafik çizilerek eğimi belirlendi. Elde edilen veriler

Bölüm 3.2.1.1.4'de verilen Laviron eşitliğinde yerine konularak Çizelge 4.12'de verilen yalın elektrot ve Anti-GDF-15 immobilizasyonu sonrası elektrot yüzey alanları hesaplandı.

Çizelge 4.12. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı değerleri

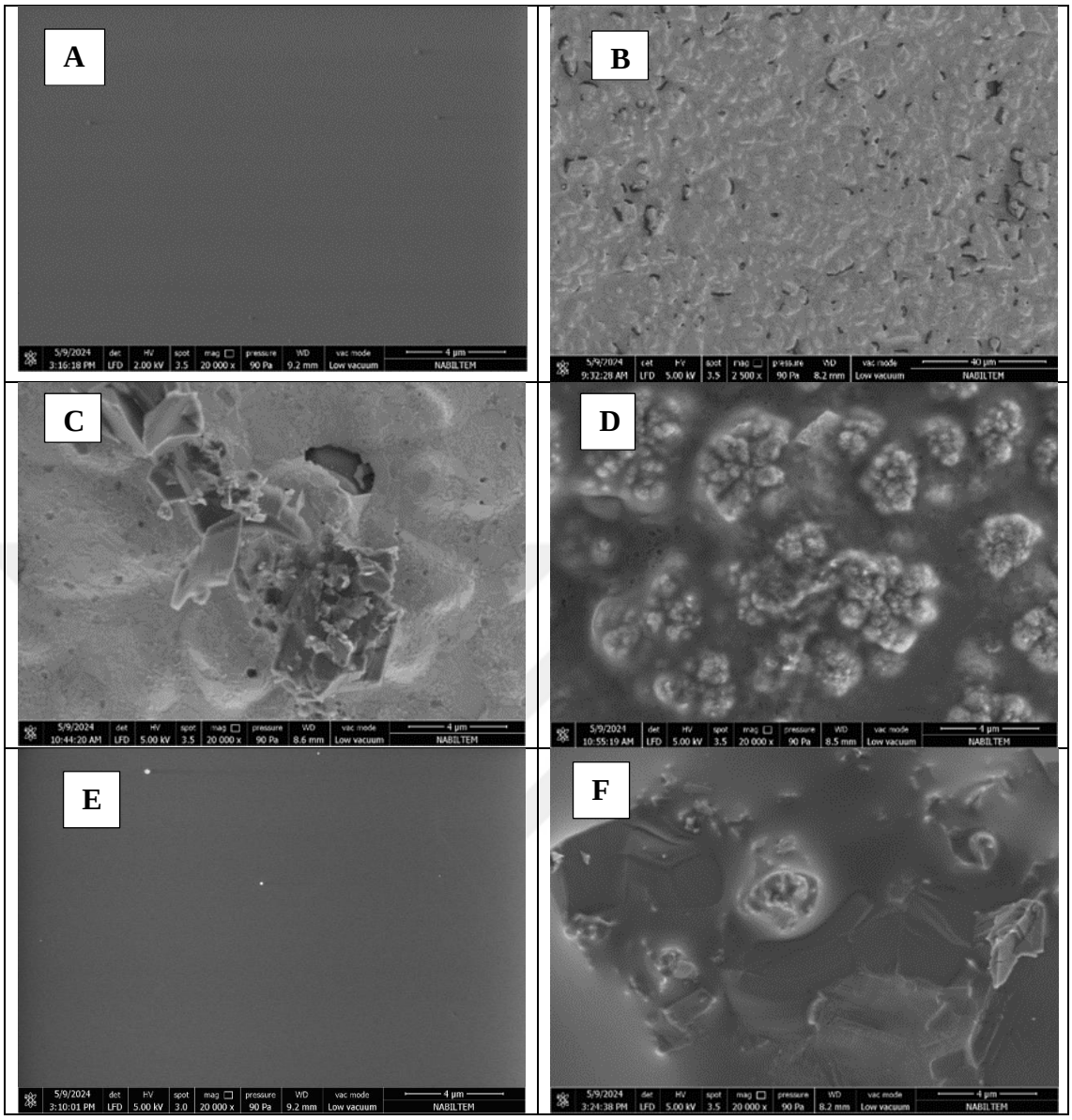
Anti GDF-15	0.891484359 mol/cm^2
Yalın Elektrot	0.438749087 mol/cm^2
Yüzey Alanı (Γ)	**0.452735272 mol/cm^2**

Hesaplanan yüzey alanı değerlerinden Anti-GDF-15 immobilize edilmiş elektrot alanı değerinin yalın elektrot yüzey alanı değerinden belirgin bir şekilde farklandığı tespit edilmiştir. Bu fark değeri (0.452735272 mol/cm2) katı altın elektrot yüzeyinde kimyasal modifikasyonun ve Anti-GDF15 immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Tüm bu sonuçlar GDF-15 biyosensörünün etkin bir algılama platformu olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir.

4.1.3.7.2. GDF-15 biyosensörünün taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

GDF-15 biyosensörünün yüzey modifikasyonlarının (Yalın Au elektrot ve Au-Elektrot-6-MHL) ardından immobilizasyon basamaklarında (Au-Elektrot-6-MHL/TMOHES, Au-Elektrot-6-MHL/TMOHES/Anti-GDF15, Au-Elektrot-6-MHL/TMOHES/Anti-GDF15/BSA ve Au-Elektrot-6-MHL/TMOHES/Anti-GDF15/BSA/GDF15) biyosensör yüzey morfolojisindeki değişimlerin incelenmesi amacıyla, yüksek çözünürlüklü görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak alınmıştır. SEM görüntüleme analizleri düşük vakum altında gerçekleştirilmiştir ve görüntüleme sırasında 5kV hızlandırma potansiyeli kullanılmıştır. Her bir immobilizasyon adımı için ayrı ayrı elektrotlar hazırlandı ve her bir elektrot için SEM görüntüleme analizi gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.15'de verildi.

Bu teknik biyosensörün modifikasyonuyla yüzeyde oluşan değişimlerin görüntülenmesini sağlamıştır. Biyosensör yüzeyindeki detayların net bir şekilde gözlemlenmesine olanak tanımış ve anti-GDF15 antikorlarının immobilizasyonu sonrası oluşan değişiklikleri ayrıntılı bir şekilde ortaya koymuştur.



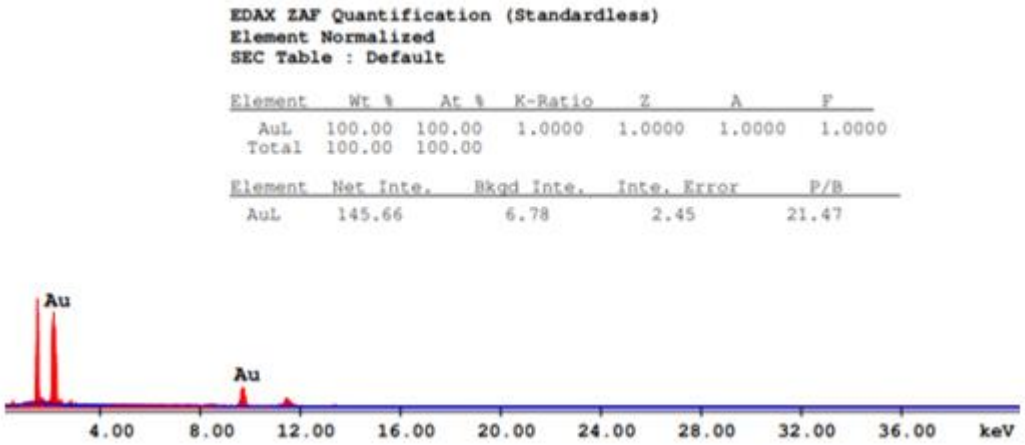
Şekil 4.15. GDF-15 biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ve analite ait SEM görüntüleri (A) Yalın Au, (B)Au-Elektrot/6-MHL (C) Au-Elektrot/6-MHL6/TMOHES (D) Au-Elektrot/6-MHL6/TMOHES/Anti-GDF15, (E) Au-Elektrot/6-MHL6/TMOHES/Anti-GDF15/BSA (F) Au-Elektrot/6-MHL6/TMOHES/Anti-GDF15/BSA/GDF15

SEM görüntüleme analizinde, Şekil 4.15A'da temiz KAE yüzeyi homojen olarak görülürken, Şekil 4.15B'de 6-MHL ile tiyol-SAM oluşturulması adımından sonra elektrot yüzeyinin temiz KAE yüzeyine göre farklılaştığı ve küçük küreciklerle homojen olarak kaplandığı görülmektedir. Şekil 4.15C'de görüldüğü gibi, TMOHES modifikasyonu ile silan-SAM oluşturulması adımı sonrasında ise elektrot yüzeyinde daha dolgun parçacıklar oluşmuştur. Şekil 4.15D'de Anti-GDF-15 immobilizasyonu

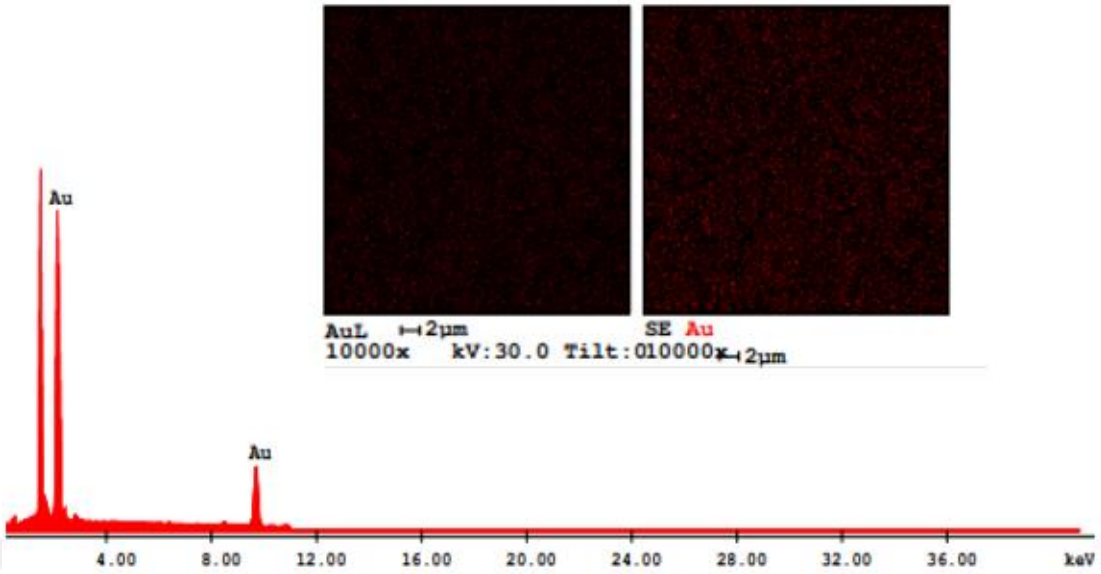
sonrasında yüzey morfolojisinin değiştiği, yüzeydeki kaplama kalınlığının arttığı ve parçacık boyutunun büyüdüğü gözlenmiştir. Şekil 4.15E'de verilen BSA immobilizasyonundan sonra elde edilen SEM görüntüsünde, bir öncekinden farklı olarak, yüzeyde kümelenmiş protein yapıları göze çarpmaktadır. Son olarak, Anti-GDF15/GDF-15 immün kompleksinin SEM görüntüsünde BSA amorf kümelenmiş proteinlerinin daha düzgün şekilli proteinlerle yer değiştirdiği görülmektedir (Şekil 4.15F).

4.1.3.7.3. GDF-15 biyosensörünün enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDX) sonuçları

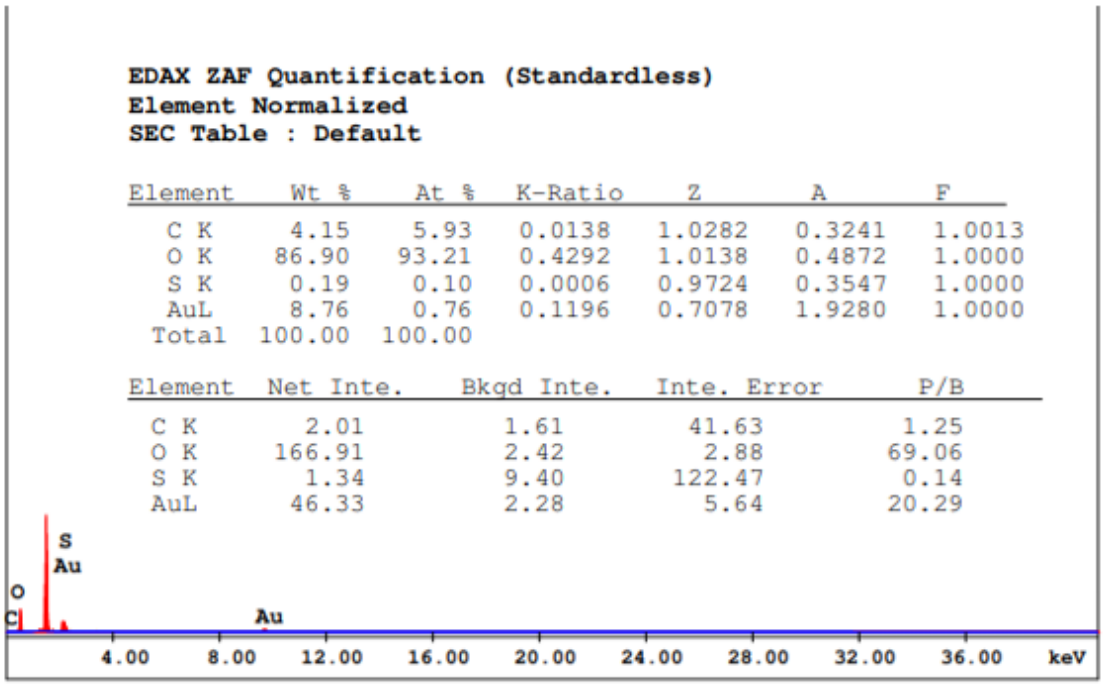
GDF-15 biyosensörünün tasarımında yüzey modifikasyonu öncesi yalın elektrot dahil olmak üzere tüm basamakları için EDX Haritalama ve Nokta Alan Analizleri gerçekleştirilmiştir.



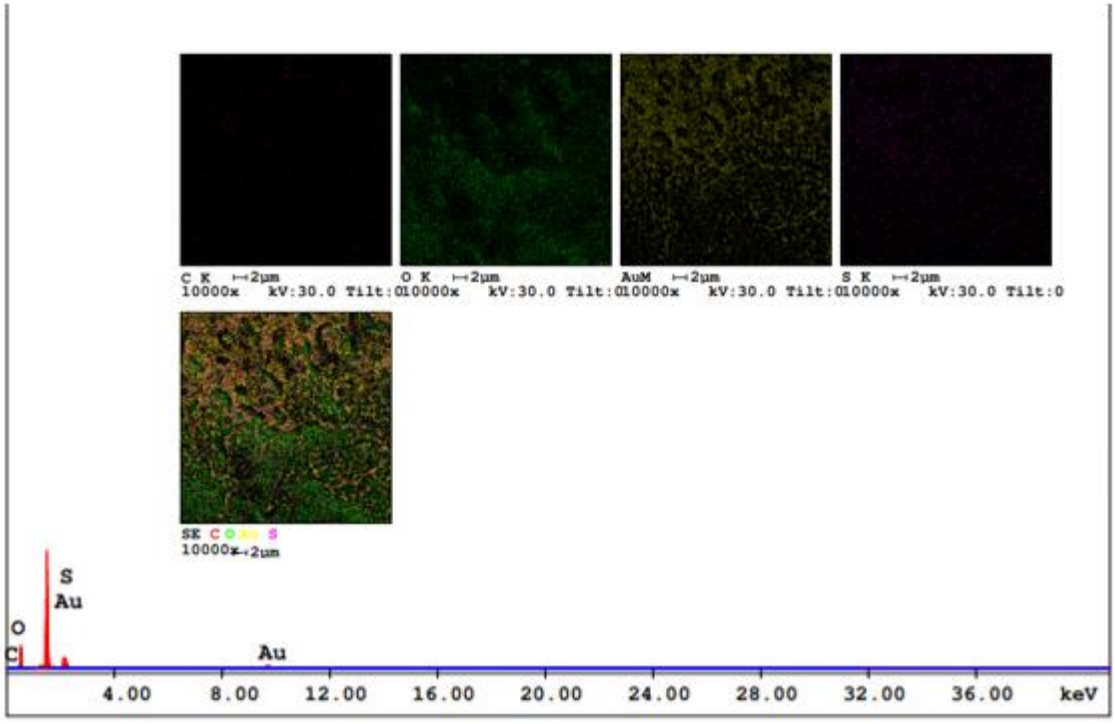
Şekil 4.16.a1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-Yalın Elektrot)



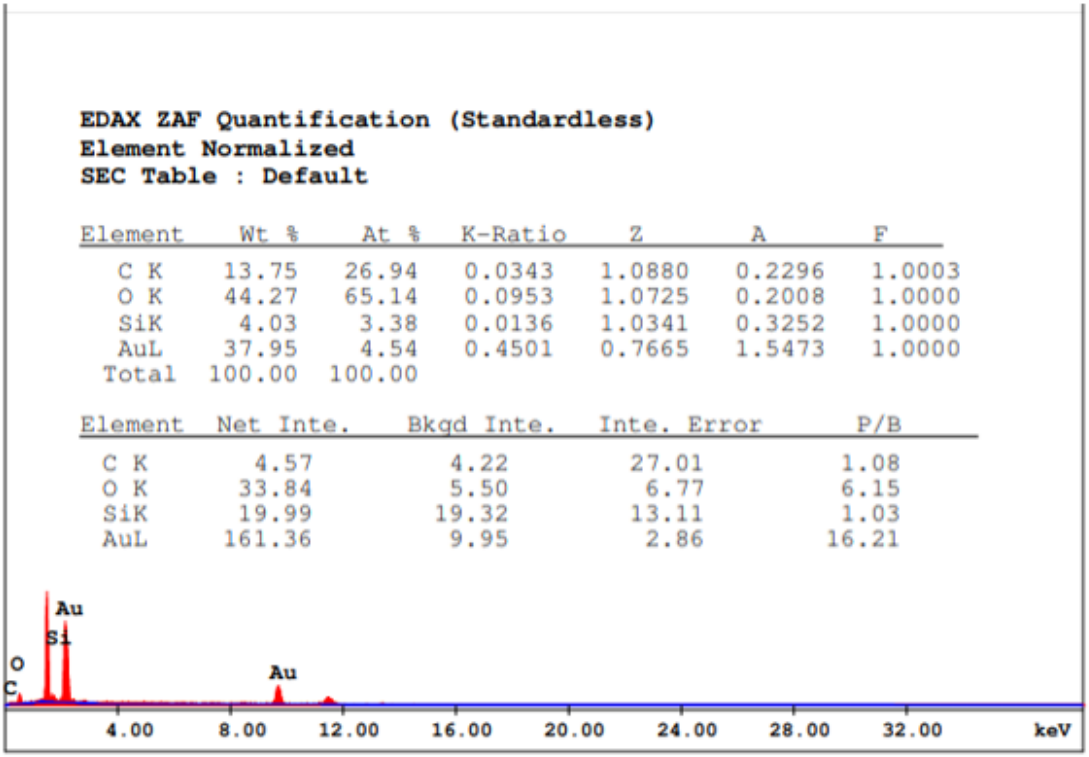
Şekil 4.16.a2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-Yalın Elektrot)



Şekil 4.16.b1 GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-6MHL)



Şekil 4.16.b2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL)

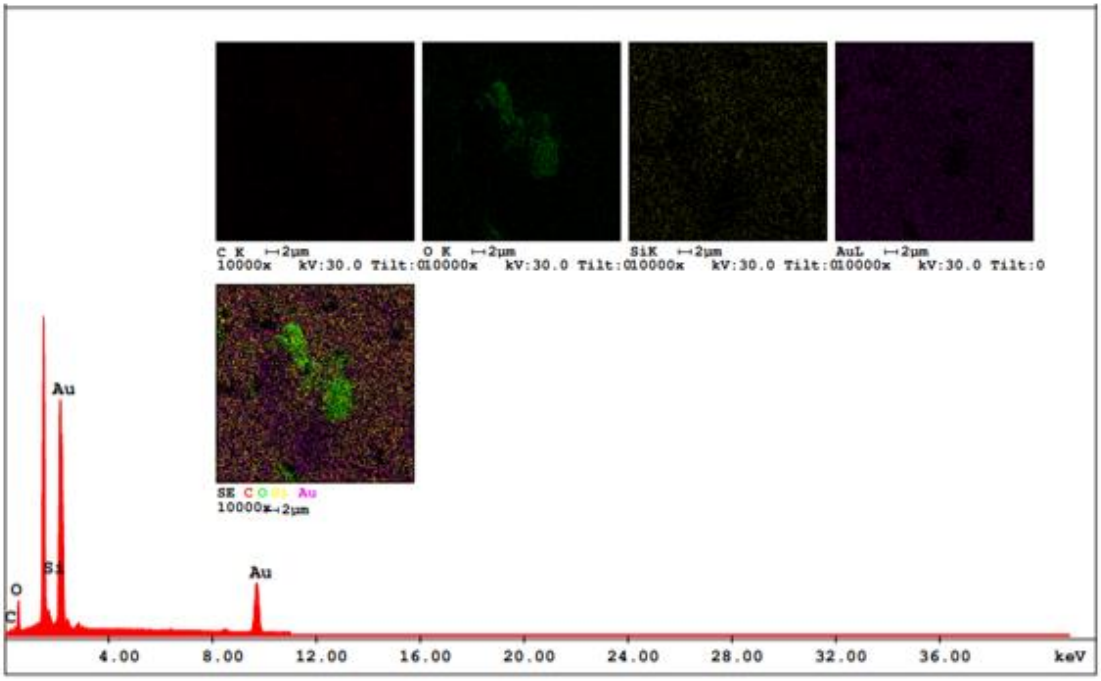


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

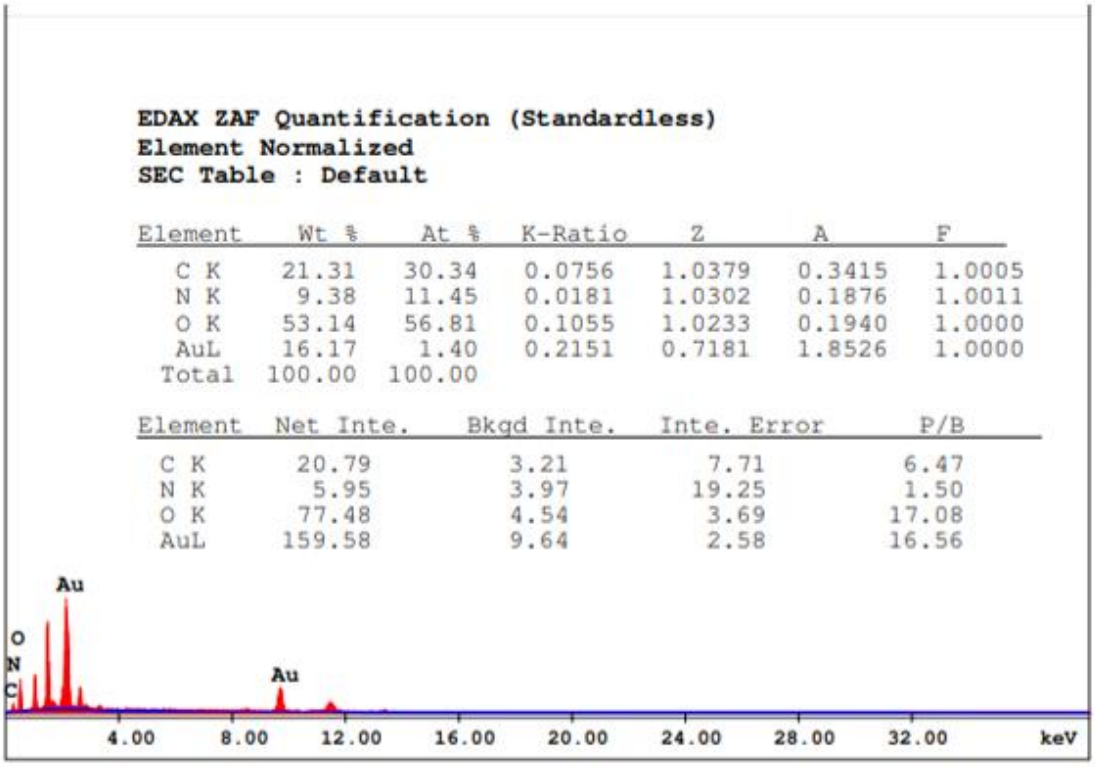
Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	13.75	26.94	0.0343	1.0880	0.2296	1.0003
O K	44.27	65.14	0.0953	1.0725	0.2008	1.0000
SiK	4.03	3.38	0.0136	1.0341	0.3252	1.0000
AuL	37.95	4.54	0.4501	0.7665	1.5473	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	4.57	4.22	27.01	1.08
O K	33.84	5.50	6.77	6.15
SiK	19.99	19.32	13.11	1.03
AuL	161.36	9.95	2.86	16.21

Şekil 4.16.c1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan Spektrumları (Au-6MHL-TMOHES)



Şekil 4.16.c2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL-TMOHES)

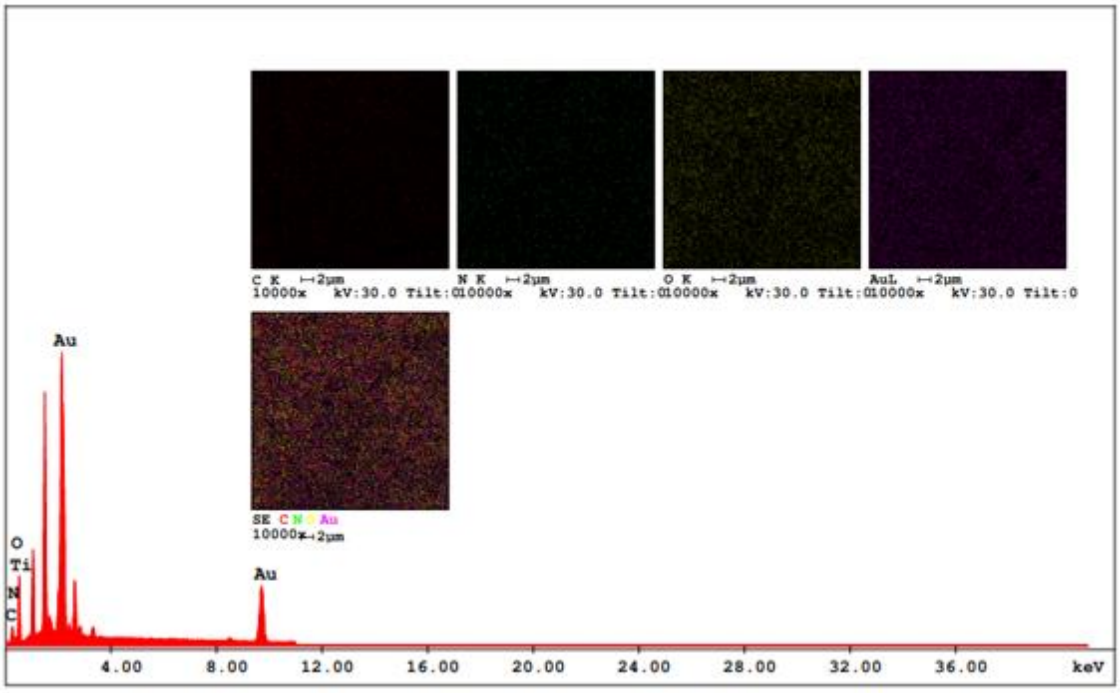


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

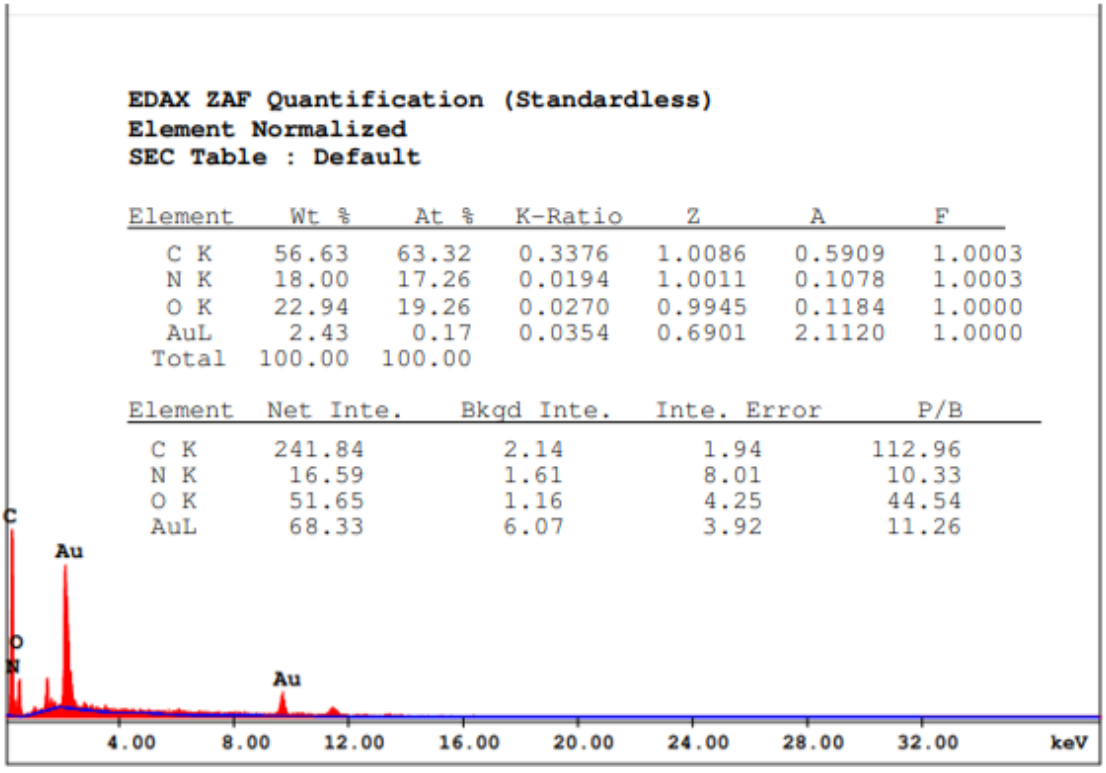
Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	21.31	30.34	0.0756	1.0379	0.3415	1.0005
N K	9.38	11.45	0.0181	1.0302	0.1876	1.0011
O K	53.14	56.81	0.1055	1.0233	0.1940	1.0000
AuL	16.17	1.40	0.2151	0.7181	1.8526	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	20.79	3.21	7.71	6.47
N K	5.95	3.97	19.25	1.50
O K	77.48	4.54	3.69	17.08
AuL	159.58	9.64	2.58	16.56

Şekil 4.16.d1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15)



Şekil 4.16.d2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15)

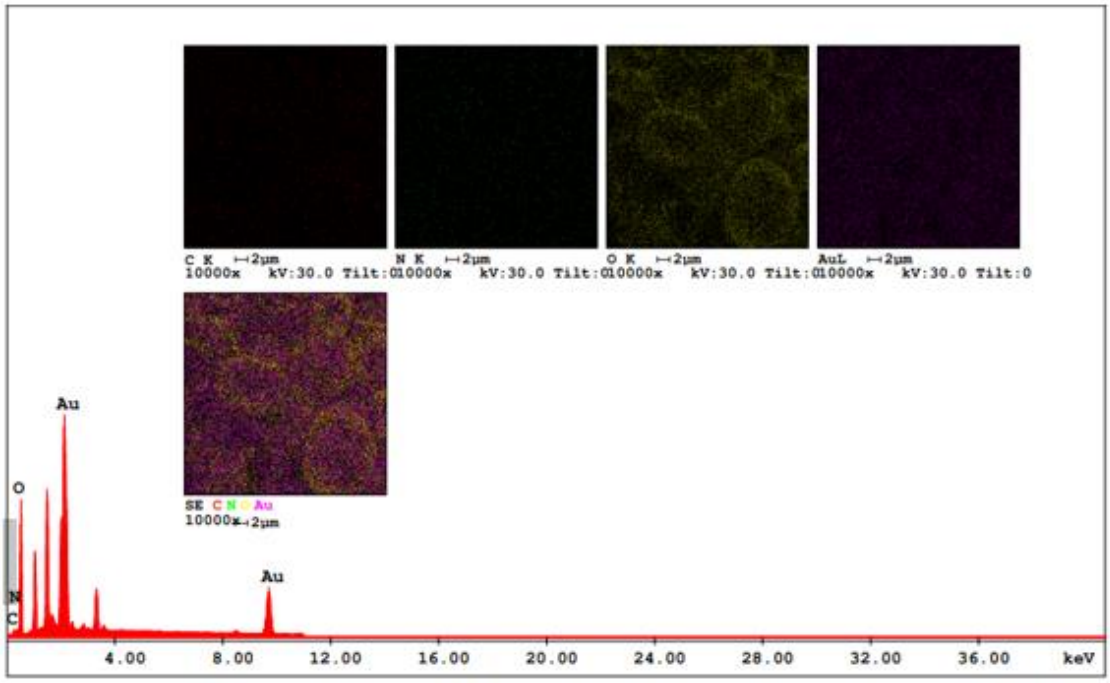


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	56.63	63.32	0.3376	1.0086	0.5909	1.0003
N K	18.00	17.26	0.0194	1.0011	0.1078	1.0003
O K	22.94	19.26	0.0270	0.9945	0.1184	1.0000
AuL	2.43	0.17	0.0354	0.6901	2.1120	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	241.84	2.14	1.94	112.96
N K	16.59	1.61	8.01	10.33
O K	51.65	1.16	4.25	44.54
AuL	68.33	6.07	3.92	11.26

Şekil 4.16.e1. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15-BSA)



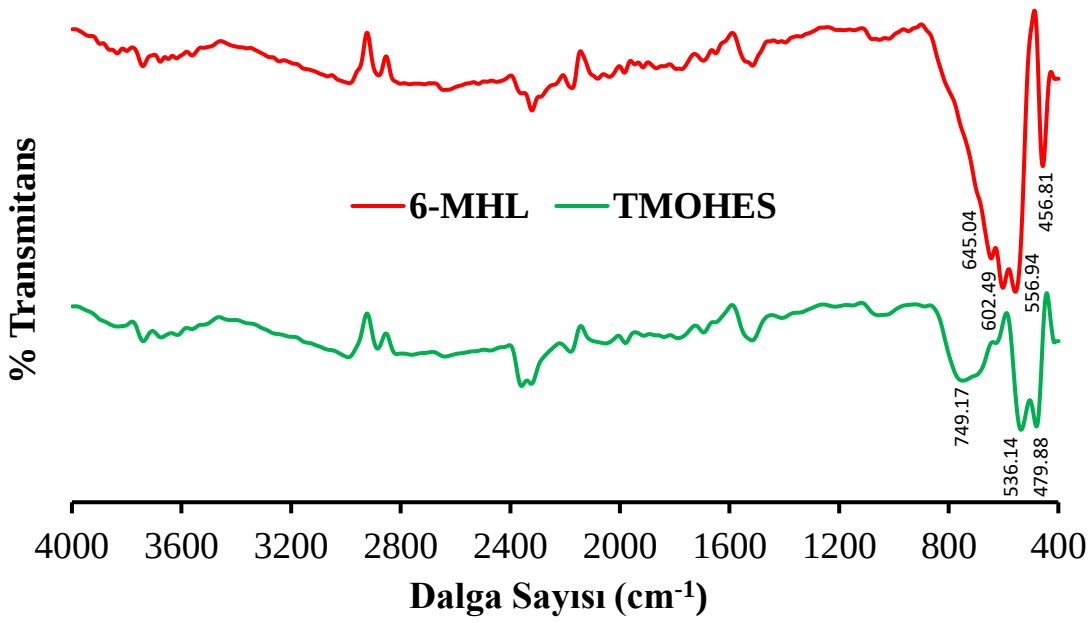
Şekil 4.16.e2. GDF-15 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Au-6MHL-TMOHES-AntiGDF15-BSA)

GDF-15 biyosensörünün tasarımında yüzey modifikasyonu öncesi yalın elektrot dahil olmak üzere tüm basamakları için EDX Nokta Alan ve Haritalama Spektrumları alınmıştır. Şekil 4.16a1 ve Şekil 4.16a2'de verilen yalın Au elektrot spektrumları modifikasyon öncesi temiz Au elektrot yüzeyinde sadece Au elementinin olduğunu göstermektedir. Şekil 4.16b1 ve Şekil 4.16b2'deki spektrumlarda 6-MHL immobilizasyonuyla kükürt, karbon ve oksijen elementlerine ait piklerin ve görüntülerin belirdiği, bunun da molekülün alkanotiyol yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.16c1 ve Şekil 4.16c2'de spektrumlarında beliren silisyum elementi piki silanlama ajanı olan TMOHES molekülü immobilizasyonunu işaret etmektedir. Şekil 4.16d1 ve Şekil 4.16d2'de spektrumlarında azot elementine ait pikin görülmesi Anti-GDF15 antikorunun elektrot yüzeyine immbolizasyonu ile antikorun amin grupları ve elektrot yüzey modifikasyonları ile yüzeyde oluşturulan SAM tabakası yaptığı amid bağındaki azot atomlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.16e1 ve Şekil 4.16e2'de'deki spektrumlarda azot elementi yüzdesinin artışı BSA immobilizasyonunu göstermektedir.

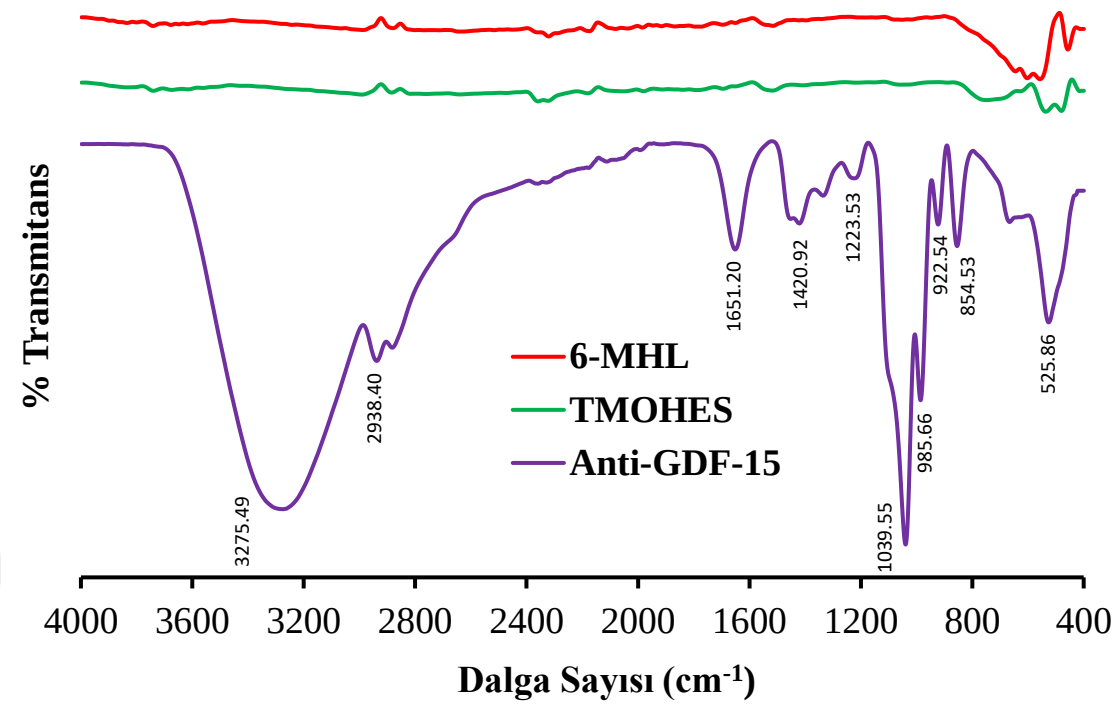
4.1.3.7.4. GDF-15 biyosensörünün fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) sonuçları

Tasarlanan GDF-15 biyosensörünün, yüzeyindeki kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların tanımlanmasında FTIR spektroskopisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla GDF-15 biyosensörü üretim sürecinin 6-MHL, TMOHES ve Anti-GDF15 modifikasyon adımlarının sonrasında elektrot yüzeyinde yapılan FTIR analizlerinin sonuçları Şekil 4.17a, Şekil 4.17b'de verilmiştir.

Şekil 4.17a'da verilen biyosensör yüzeyine 6-MHL immobilizasyonu sonrası elde edilen spektrumda (kırmızı ile gösterilen) 650-450 cm^{-1}'de gelen piklerin, 6-MHL ile modifiye edilmiş biyosensör yüzeyine TMOHES immobilizasyonu sonrası elde edilen spektrumda (yeşil ile gösterilen) kaybolarak farklandığı görülmektedir. Dolayısıyla Şekil 4.17a'da verilen 6-MHL spektrumunun ilgili pikleri C-S ve veya C-C bağlarıyla ilişkili olabilir. Şekil 4.17a'da TMOHES spektrumunda 749 cm^{-1}'de yeni bir pik oluştuğu görülmektedir, bu pikin TMOHES moleküllerinin uçlarındaki epoksi gruplarından- ve/veya Si-O-Si bağlarından ve Si-O bağlarından- kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu verilerin elektrot yüzeyindeki TMOHES moleküllerinin varlığını destekler nitelikte olduğu söylenebilir.



Şekil 4.17a. GDF-15 biyosensörünün 6-MHL ve TMOHES immobilizasyonu sonrası FTIR spektrumları



Şekil 4.17b. GDF-15 biyosensörünün 6-MHL, TMOHES ve Anti-GDF15 immobilizasyonu sonrası FTIR spektrumları

Şekil 4.17b'de Si-SAMs tabakası ile kaplı biyosensör yüzeyine Anti-GDF15 antikorunun immobilizasyonu sonrası elde edilen spektrum mor renk ile gösterilmiştir. Şekil 4.17b'de ayrıca Şekil 4.17a'da verilen 6-MHL immobilizasyonu sonrası elde edile spektrum (kırmızı), TMOHES immobilizasyonu sonrası elde edilen spektrum (yeşil) tekrar verilerek tüm spektrumların aynı şekilde karşılaştırılması sağlanmıştır. Şekil 4.17b'de 6-MHL ve TMOHES spektrumlarındaki piklerin farklılaşarak şiddetlerinin büyük oranda azalmasının yanı sıra, Anti-GDF15 spektrumunda 3275 cm^{-1}'de gelen yüksek band bu bölgedeki amid bağı gerilmesine ait karakteristik piklere işaret etmektedir. 1651 cm^{-1} (amid I) ve 1402 cm^{-1}'deki (amid II) piklerin de yine amid bağına ait karakteristik titreşim piklerine karşılık geldiği düşünülmektedir. Bu amid bağları Anti-GDF15 antikor moleküllerinin uçtaki amino grupları ile biyosensör yüzeyinde TMOHES moleküllerinin yine uçtaki epoksi gruplarından amid bağları yaparak immobilize edildiğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca 2938 cm^{-1}'deki kamburlu pikin disülfit bağlarından ve sistein kalıntılarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Gerçekleştirilen tüm bu yüzey karakterizasyon çalışmaları ile GDF-15 biyosensörünün tasarımının ve işlevselliğinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği

doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, biyosensörün GDF-15 proteinini yüksek hassasiyet ve güvenilirlik ile tespit edebilecek olan antikor proteininin modifiye elektrot yüzeyine başarıyla immobilize edildiğini ortaya koymaktadır.

4.2. Gal-3 Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensör ile Elde Edilen Bulgular

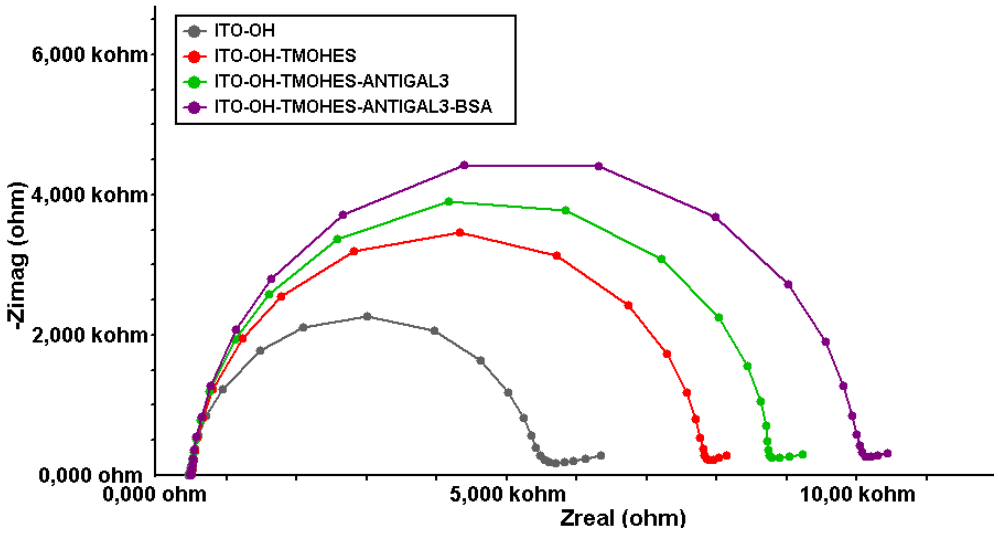
4.2.1. Gal-3 Biyosensörünün Üretim Sürecinde Elde Edilen Bulgular

İnflamasyon temelli kardiyak biyobelirteci olarak tanımlanan Gal-3 proteinine özgü geliştirilen Gal-3 biyosensörünün üretim süreci ITO-PET elektrotların hazırlanması, temizliği, elektrot yüzeyinin hidroksillenmesi, silan-SAM oluşumu, antikor immobilizasyonu ve açık epoksi uçların BSA ile kapatılması adımlarından oluşmaktadır.

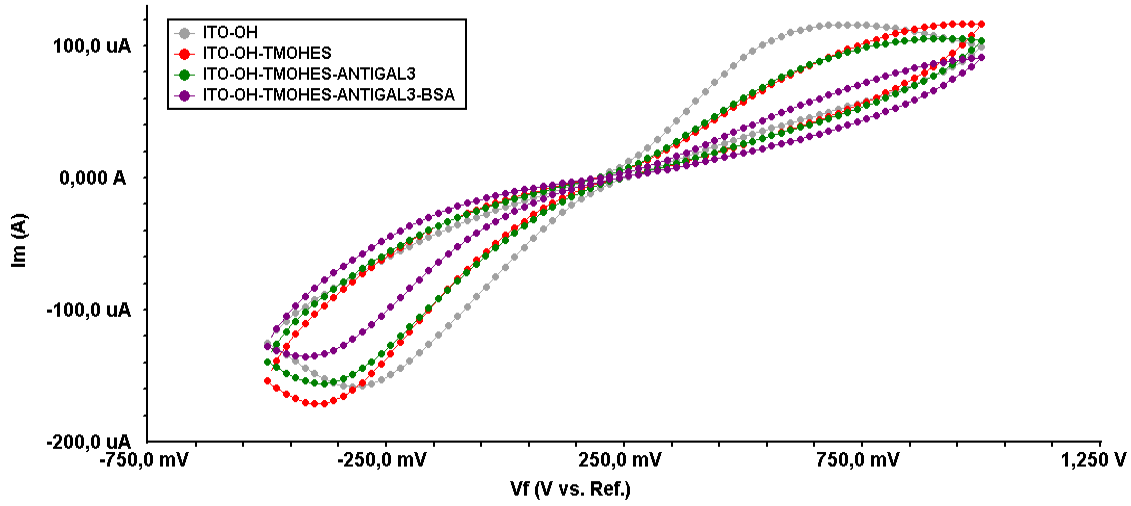
Gal-3 biyosensörünün fabrikasyonu esnasında yürütülen herbir üretim adımı aşağıda belirtilen kısaltmalarla ifade edildi:

1. **ITO-Yalın**: Temizlenmiş ITO/PET elektrot yüzeyi
2. **ITO-OH**: Hidroksillenmiş ITO/PET elektrot yüzeyi
3. **ITO-OH-TMOHES**: TMOHES modifikasyonu ile oksit üzerinde oluşan siloksan bağlarıyla düzenlenmiş SAMs tabakalı ITO/PET elektrot yüzeyi
4. **ITO-OH-TMOHES-ANTIGAL3:** Antikor immobilize edilmiş elektrot yüzeyi
5. **ITO-OH-TMOHES-ANTIGAL3-BSA:** BSA ile antikor bağlanmamış aktif grupların bloklanması sağlanan analit ölçümüne hazır ITO/PET elektrot yüzeyi

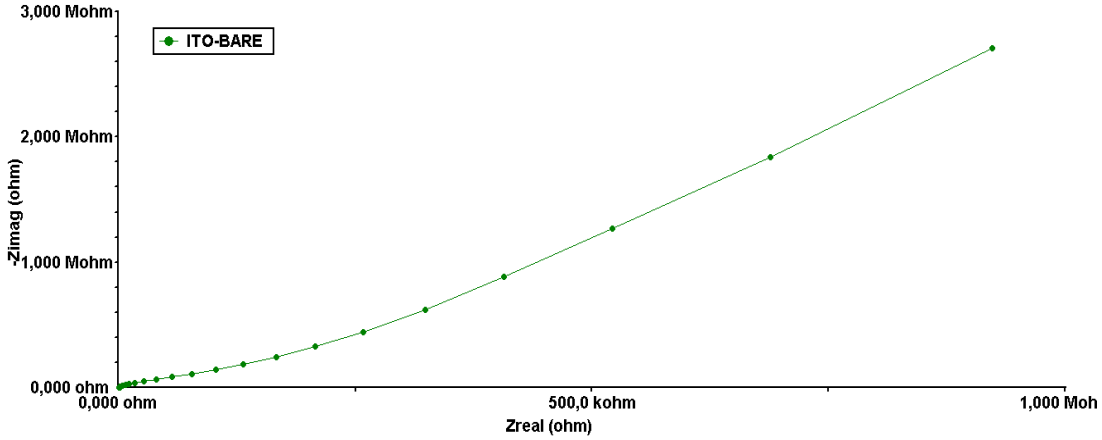
Bölüm 3.2.2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan Gal-3 biyosensörünün, yüzey modifikasyonlarından önce elektrot temizliği ile başlayan biyosensör fabrikasyonu sürecinde yalın ITO-PET elektrot ve her bir immobilizasyon adımı sonrasında EİS ve CV ölçümleri gerçekleştirildi. Bu ölçümlerden elde edilen immobilizasyon adımlarına ait EİS spekturmları Şekil 4.18a'da ve CV voltamogramları Şekil 4.18b'de; impedans değeri çok yüksek olan yalın elektrota ait EİS spektrumu ayrı olarak Şekil 4.18c'de ve CV voltamogramı ise Şekil 4.18d'de verilmiştir.



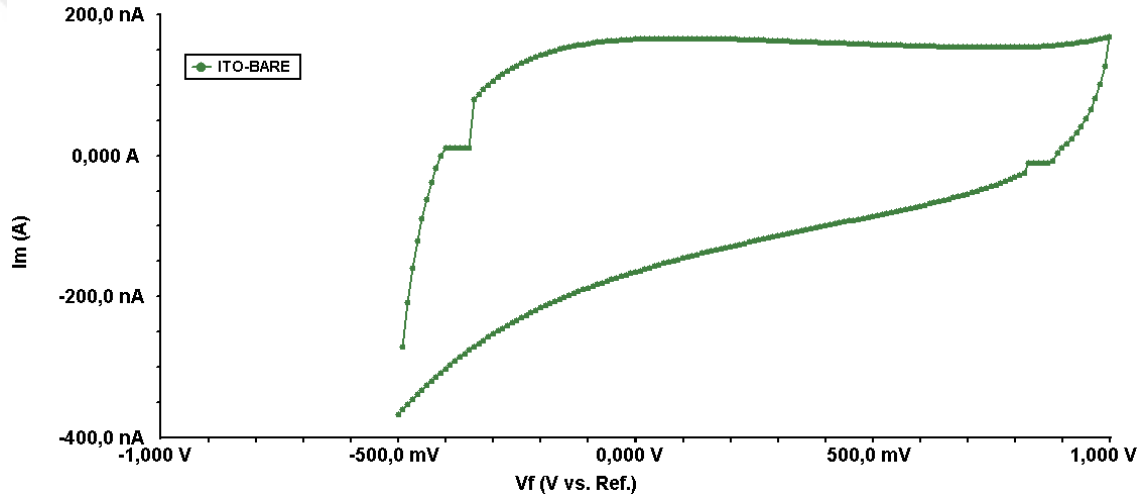
Şekil 4.18a. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



Şekil 4.18b. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları



Şekil 4.18c. Gal-3 biyosensörünün yalın elektrot impedans spektrumu



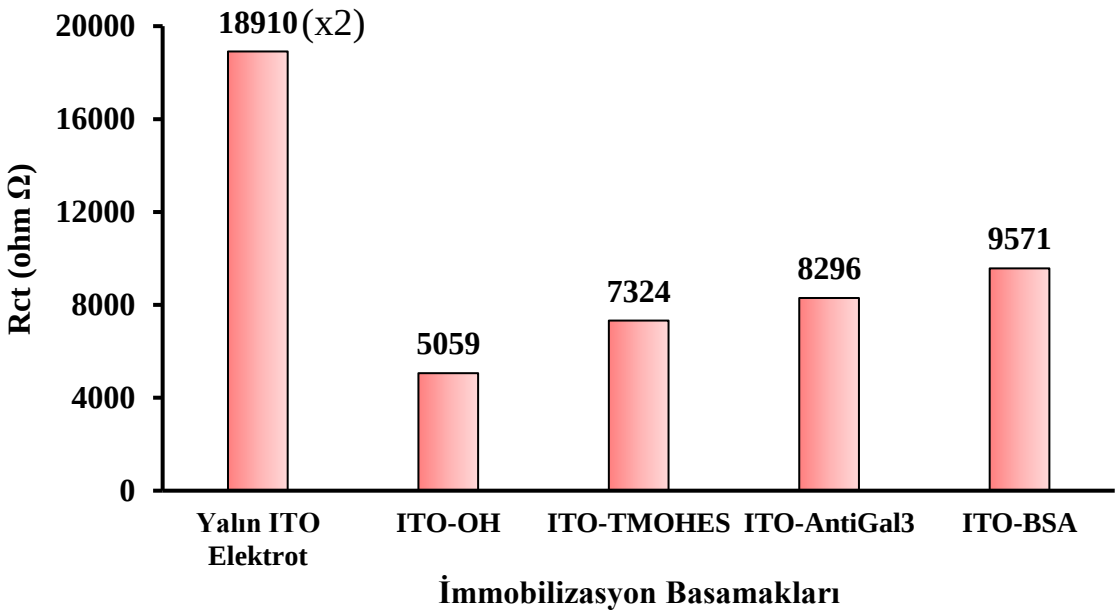
Şekil 4.18d Gal-3 biyosensörünün yalın elektrot döngüsel voltamogramı

Bu tez çalışmasında, Gal-3 biyosensörü fabrikasyonu sırasında immobilizasyon basamaklarının doğrulanması, Gal-3 analitinin kantitatif tayini, biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında elde edilen verilerin değerlendirilmesinde öncelikli olarak EİS spektrumlarından yararlanıldı.

Şekil 4.18a ve Şekil 4.18c'de gösterilmiş olan EİS spektrumlarının Nyquist eğrilerinin Bölüm 2.4.2.1'de anlatılan eşdeğer devre modeliyle eşleştirilmesi ile yük transfer dirençleri (Rct değerleri) hesaplanmıştır. Gal-3 biyosensörü üretiminin her bir adımı için hesaplanan bu Rct değerleri Çizelge 4.13'de ve bu değerlerle oluşturulmuş sütun grafiği Şekil 4.18e'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Gal-3 biyosensörünün immobilasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerleri

Elektrot Yüzeyi	Rct (Ohm Ω)
Yalın ITO Elektrot	37820
ITO-OH	5059
ITO-OH-TMOHES	7324
ITO-OH-TMOHES-AntiGal3	8296
ITO-OH-TMOHES-AntiGal3-BSA	9571



Şekil 4.18e. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EİS ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinin sütun grafiği

Gal-3 biyosensörü Rct değerleri incelendiğinde temizlenmiş Yalın-ITO/PET elektrot yüzeyinin ölçümünden elde edilen Rct değerinin (37820 Ω) yalın elektrot yüzeyinin yalıtkan özelliği sebebiyle çok yüksek olduğu görülmektedir. ITO/PET elektrot yüzeyinde aktif hidroksil grupları biriktirildikten sonra elde edilen Rct değerinin 5059 Ω'a düşüşü –OH gruplarının yüzeyde reaktif bir alan oluşturduğunu, elektron transferine olanak sağladığını ve yüzeyin iletken hale geldiğini göstermektedir.

TMOHES immobilizasyonu sonrası biyosensör cevabının artışı Şekil 4.18a'da verilen impedans spektrumundan ve Nyquist eğrisinin yarım daire çapından hesaplanan Rct değerinin (7324 Ω) artışından görülmektedir. Hidroksillenmiş ITO/PET elektrot

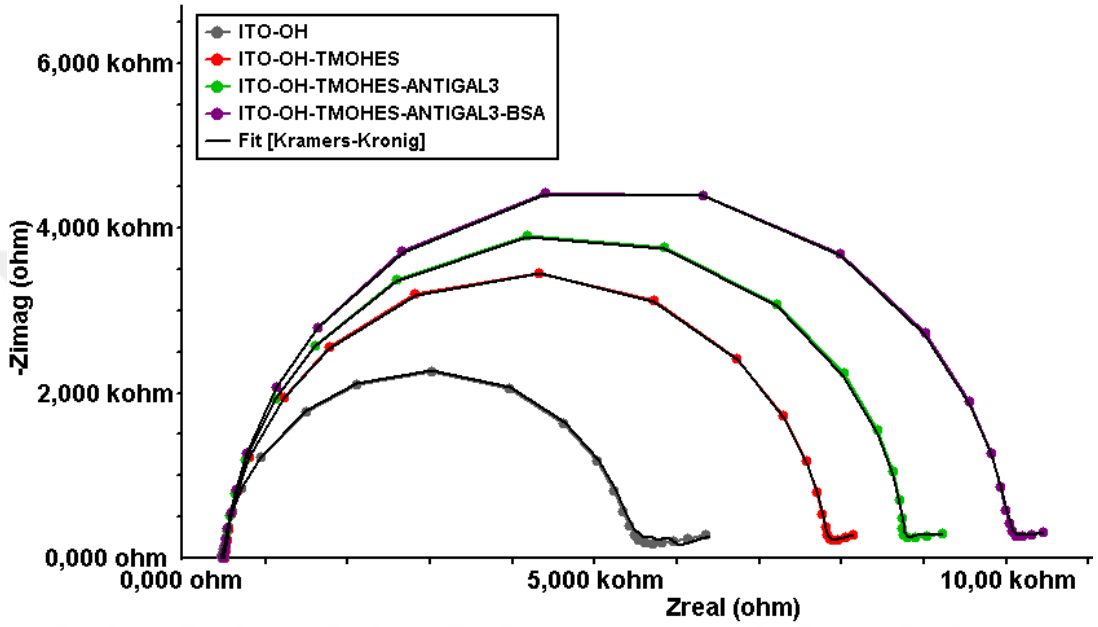
yüzeyindeki açık hidroksil gruplarına TMOHES moleküllerinin silana bağlı metoksi gruplarınından siloksan bağlarıyla kovalent immobilizasyonu sayesinde yüzeyde silan-SAM tabakasının oluşumu yük transferini zorlaştırarak Rct değerinde artışa sebep olur. Şekil 4.18b'de verilen CV voltamogramında da pik yüksekliğinin azalması ve pikin daralması, elektron transferinin azalarak ölçülen akımın düşüşüne, dolayısıyla iletkenliğin azalmasına neden olarak EİS spektrumundan elde edilen sonucu desteklemektedir.

Epoksi grupları biyomolekülün hidroksil, amin ve sülfhidril gruplarıyla kimyasal bağ yapabilir. Antikor immobilizasyonunda, stabil bir silan-SAM tabakası oluşturulmuş modifiye ITO-PET elektrodun yüzeyindeki TMOHES moleküllerinin uçta kalan epoksi bölgelerinden Anti-Gal3'ün kovalent immobilizasyonu, immobilizasyon sonrası alınan impedans ölçümünden hesaplanan Rct değerinin (8296 Ω) daha da artmasına sebep olmuştur. Bu durum elektrot yüzeyindeki biyomolekül varlığının diğer immobilizasyon moleküllerine göre daha büyük ve kompleks oluşundan kaynaklanarak, redoks probunun elektrot yüzeyine daha az difüze olmasıyla, yük transferini daha da zorlaştırdığını göstermektedir. Biyosensör yüzeyine BSA ile yapılan bloklama sonrasında alınan impedans ölçümlerinden hesaplanan Rct değerindeki (9571 Ω) artış, yüzey direncinin daha da arttığını dolayısıyla Anti-Gal3 moleküllerinin bağlanmadığı aktif bölgelerin BSA ile bloklandığını ve elektrot yüzeyinde istenmeyen bağlanmaların önüne geçilebildiğini göstermektedir. CV ölçümlerinden elde edilen anodik ve katodik piklerin her adımda iletkenlik azaldıkça birbirine daha da yaklaşması EIS ve CV sonuçlarının biribirine uyumlu olduğunu ve tutarlılığını göstermektedir.

Bu sonuçlar tasarlanan Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının başarısını ve yüzey modifikasyonlarının etkisini kanıtlamaktadır.

Biyosensörün stabilitesini test etmek ve dış etkenlerin etkisini değerlendirmek amacıyla Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının EİS ölçümlerine Kramers-Kroning dönüşümü Bölüm 4.1.1'de açıklandığı şekilde uygulanmıştır. Bu teknik impedans spektrumlarının karmaşık bileşenlerinin birbirine uyumlu olup olmadığını test etmek için kullanılan matematiksel bir yöntemdir. Bu amaçla Gal-3 biyosensörü immobilizasyon basamakları EİS spektrumlarına Kramers Kronig dönüşüm hesaplaması uygulandı. Elde edilen Kramers Kronig dönüşüm eğrileri Şekil 4.19'da ve

immobilizasyon basamaklarının Kramers Kroing dönüşüm değerleri Çizelge 4.14'de gösterilmektedir. Şekil 4.19'da görülen siyah renkli eğriler Kramers Kronig dönüşüm eğrilerini, renkli eğriler ise Nyquist eğrilerini göstermektedir. Çizelge 4.14'deki Kramers Kronig dönüşüm değerleri (μ) gerçek Nyquist eğrileri ile Kramers Kronig dönüşüm hesaplamasından elde edilen eğriler arasındaki farkı göstermektedir.



Şekil 4.19. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm eğrileri

Çizelge 4.14. İmmobilizasyon basamaklarına ait Kramers Kronig dönüşüm değerleri

İmmobilizasyon Adımı	**Kramers Kronig Dönüşüm Değeri (μ)**
ITO-OH	55.64
ITO-OH-TMOHES	2.671
ITO-OH-TMOHES-AntiGal3	9.284
ITO-OH-TMOHES-AntiGal3-BSA	1.345

Şekilde Gal-3 biyosensörü immobilizasyon basamakları ile Kramers Kroning eğrilerinin iyi bir şekilde örtüştüğü ve çizelgede verilen her immobilizasyon basamağı için hesaplanan μ değerlerinin de oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar biyosensörün immobilizasyonu tamamlanırken impedans ölçümlerinin dış etkenlerden

fazla etkilenmediğini, biyosensörün stabil olduğunu ve μ değerinin her bir immobilizasyon adımında daha da azalması biyosensörün bu kararlılığını desteklemektedir.

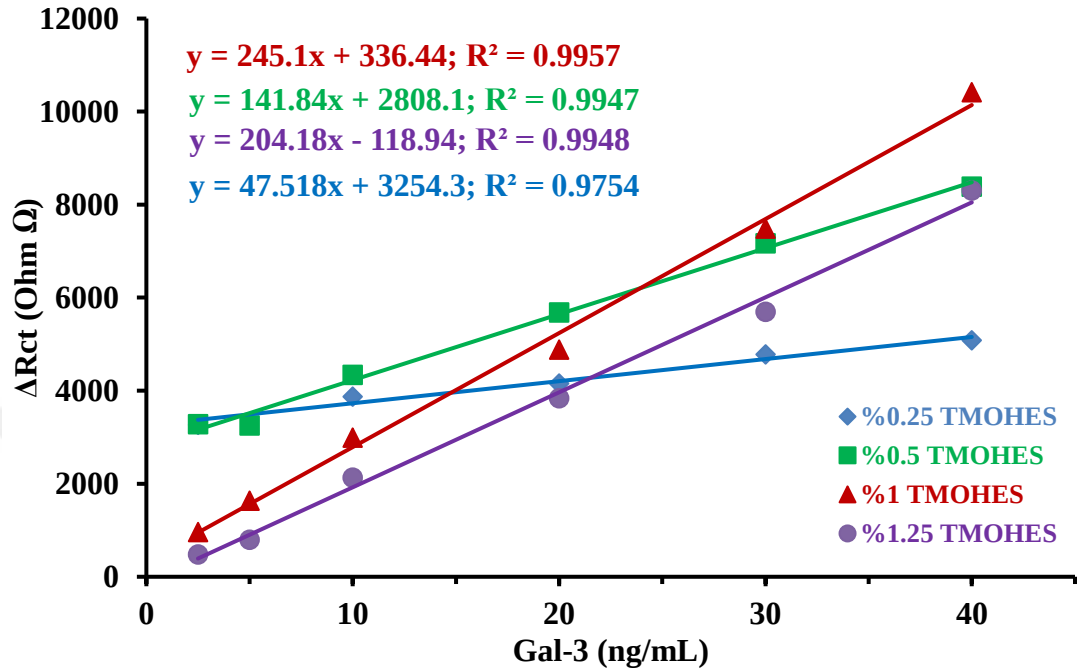
4.2.2. Gal-3 Biyosensörünün Optimizasyon Adımlarına İlişkin Bulgular

4.2.2.1. TMOHES Molekülünün Optimum Konsantrasyonu

TMOHES molekülleriyle düzenli ve kararlı bir silan-SAM tabakasının oluşturulması, antikorların aktif yüzeye güçlü bir şekilde bağlanabilmesini doğrudan etkileyen bir faktör olduğu için optimum TMOHES konsantrasyonunun belirlenmesi önemli bir adımdır. Bu amaçla diğer parametreler sabit tutularak absolut etanol içerisinde hazırlanan TMOHES çözeltilerinin dört farklı konsantrasyonuda **(%0.25, %0.5, %1, %1.25)** gece boyu inkübasyonda bırakılarak hazırlanan Gal-3 biyosensörlerinin, Gal-3 analit proteininin 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki çözeltileriyle EİS ölçümleri yapıldı. Her bir biyosensör için hesaplanan ΔRct değerleriyle Gal-3 konsantrasyonları arasında çizilen standart grafikleri Şekil 4.20'de ve bu standart grafiklerin doğru denklemleri ve R^2 değerleri Çizelge 4.15'de görülmektedir.

Şekil 4.20'deki grafikler incelendiğinde, en düşük TMOHES konsantrasyonu olan %0.25'lik konsantrasyon için elde eldilen biyosensör cevabının düşük olduğu standart grafiğin doğru denkleminden görülmektedir. Özellikle eğimin düşüklüğü ve nispeten düşük doğrusallık katsayısı (R^2= 0.9754) biyosensör yüzeyinde daha fazla silan-SAM tabakası oluşturulabileceğini düşündürerek daha yüksek konsantrasyonların değerlendirilmesinin yolunu açmıştır. TMOHES konsantrasyonu iki katına çıkarıldığında (%0.5), yüksek analit konsantrasyonlarında biyosensör cevabının belirgin bir şekilde artarak, grafiğin doğru denkleminde eğim değerinin ve doğrusallığının da oldukça yükseldiği (R^2= 0.9947), böylece biyosensör performansının iyileştiği görülmüştür. TMOHES konsantrasyon %1'e çıkarıldığında doğru denkleminin eğiminin daha da iyi artış gösterdiği (y = 245.1x + 336.44) ve doğrusallık katsayısının (R^2=0.9957) artışı grafikten ve çizelgeden açık bir şekilde görülmektedir. TMOHES konsantrasyonu %1'den %1.25'e çıkarıldığında ise standart grafiğin eğiminin düşerek biyosensörün analite duyarlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç %1 TMOHES konsantrasyonun

üzerindeki konsantrasyonların biyosensör performansını olumsuz etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.20. Farklı TMOHES konsantrasyonlarının Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi

Çizelge 4.15. TMOHES konsantrasyonu optimizasyonu çalışmasında elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

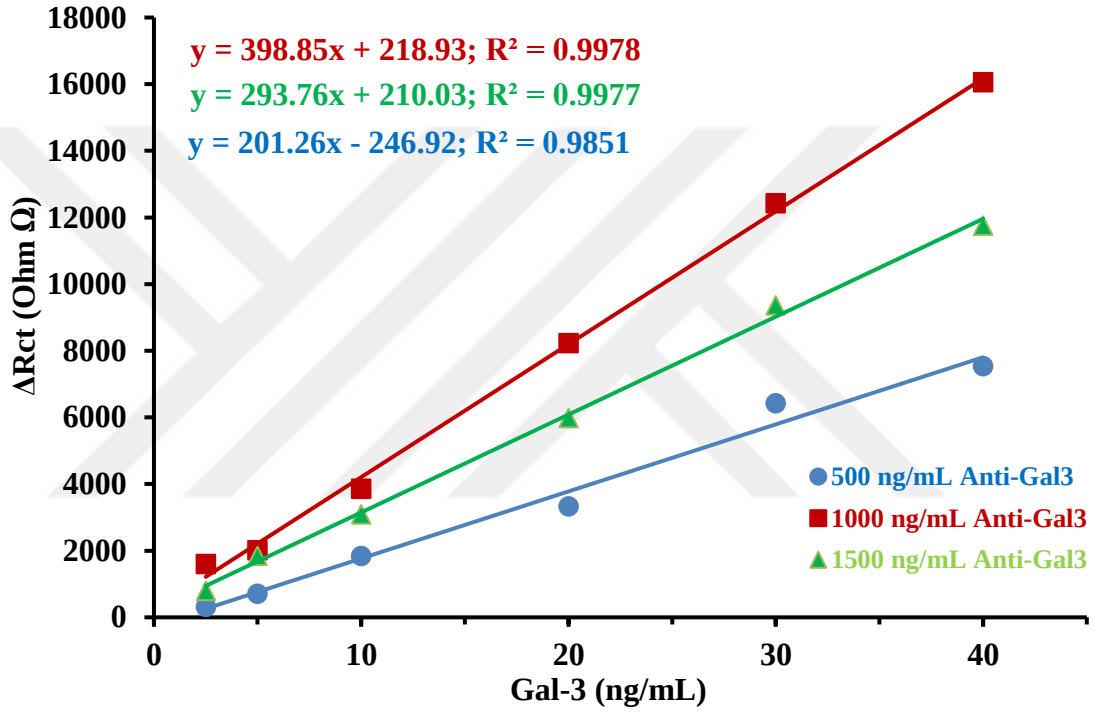
TMOHES Konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
%0.25	y = 47.518x + 3254.3	R^2 = 0.9754
%0.5	y = 141.84x + 2808.1	R^2 = 0.9947
%1	y = 245.1x + 336.44	R^2 = 0.9957
%1.25	y = 204.18x – 118.94	R^2 = 0.9948

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimum TMOHES konsantrasyonu %1 (R^2 = 0.9957) olarak belirlendi ve sonraki çalışmalarda Gal-3 biyosensörlerinin üretiminde kullanılan TMOHES çözeltileri bu konsantrasyonda hazırlandı.

4.2.2.2. Anti Gal-3 Optimum Konsantrasyonu

Biyosensör tasarımının antikor immobilizasyonu aşamasında, optimum antikor konsantrasyonunun belirlenmesi biyosensörün spesifik yanıtını arttıracak en önemli

adımlardan biridir. Farklı antikor konsantrasyonlarının Gal-3 biyosensörü yanıtına etkisinin değerlendirilmesinde diğer parametreler sabit tutularak Anti-Gal3'ün **500 ng/mL, 1000 ng/mL, 1500 ng/mL** konsantrasyonlarında hazırlanan Gal-3 biyosensörleriyle, Gal-3 analit proteininin 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığında inkübasyonu sonunda EİS ölçümleri yapıldı. Her bir biyosensör için hesaplanan ΔRct değerleriyle Gal-3 konsantrasyonları arasında çizilen standart grafikleri Şekil 4.21'de, bu standart grafiklerin doğru denklemleri ve R^2 değerleri Çizelge 4.16'da gösterilmektedir.



Şekil 4.21. Farklı Anti-Gal3 konsantrasyonlarının Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi

Çizelge 4.16. Anti-Gal3 konsantrasyonu optimizasyonu çalışmasından elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

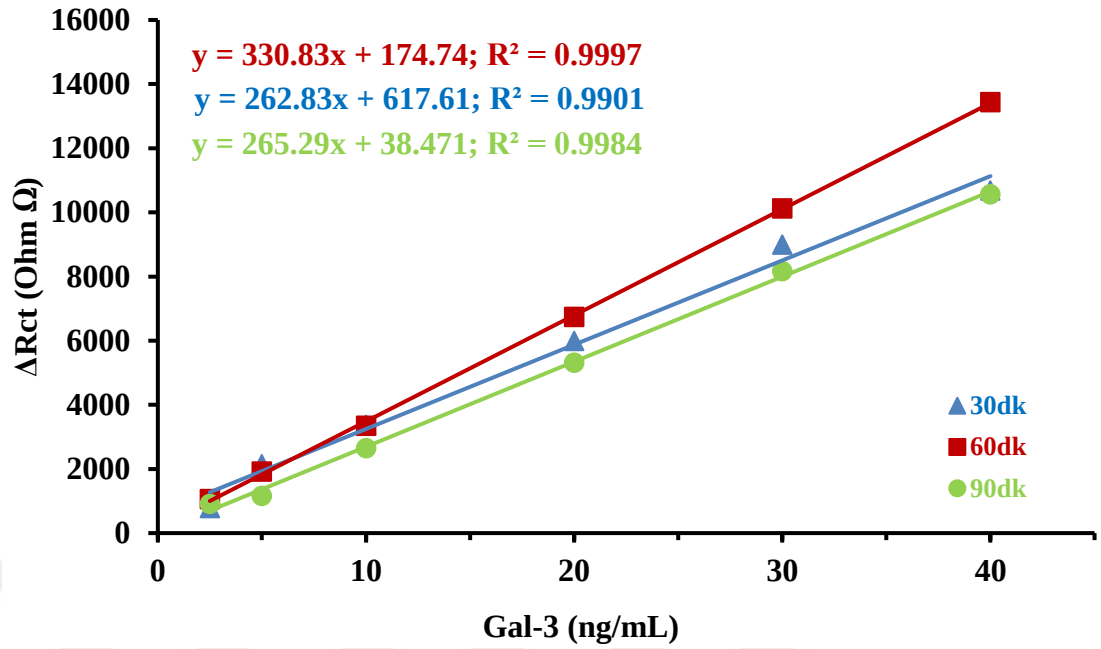
Anti-Gal3. Konsantrasyonu	**Doğru Denklemi**	**Doğrusallık Katsayısı (R^2)**
500 ng/mL	y = 201.26x – 246.92	R^2 = 0.9851
1000 ng/mL	**y = 398.85x + 218.93**	**R^2 = 0.9978**
1500 ng/mL	y = 293.76x + 210.03	R^2 = 0.9977

Şekil 4.21'deki standart grafikleri incelendiğinde, tüm Anti-Gal3 konsantrasyonlarında oldukça yüksek doğrusallık görülmektedir. Çizelge 4.16'daki

veriler karşılaştırıldığında 1000 ng/mL Anti-Gal3 kullanılarak hazırlanan biyosensörün en yüksek doğrusallık katsayısı ve eğim değeri (m=398.85) ile ayrıca Şekil 4.21'de görüldüğü üzere en yüksek ΔRct değerleri ile en iyi performansı gösterdiği görülmektedir. Antikor konsantrasyonu 500 ng/mL'den 1000 ng/mL'ye çıkarıldığında biyosensör cevabının yani ΔRct değerlerinin, özellikle artan analit konsantrasyonlarında belirgin şekilde arttığı ve ayrıca daha iyi bir doğrusal yanıt elde edildiği doğrusallık katsayısının 0.9851'den 0.9978'e artışıyla da görülmektedir. Antikor konsantrasyonu daha da arttırıldığında (1500 ng/mL) doğrusalıkta belirgin bir fark olmamasına rağmen ΔRct değerleri bir önceki konsantrasyona kıyasla azalmıştır. Genellikle artan antikor konsantrasyonlarında elektrtrot yüzeyinde büyük biyomoleküllerin sterik etki nedeniyle yüzeye daha fazla bağlanamaması sözkonusu olabilir. Biyosensör yanıtında bu, 1500 ng/mL antikor konsantrasyonundaki gibi bir düşüşle görülebilir. Bu düşük cevap yüzeyin doygunluğa eriştiğini de gösteriyor olabilir. Bu cevap analite spresifik olarak seçilen antikorun optimum konsantrasyonunun belirlenmesine katkı sağlamıştır ve bu veriler doğrultusunda 1000 ng/mL optimum Anti-Gal-3 konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda Gal-3 biyosensör üretilirken antikor konsantrasyonu 1000 ng/mL olarak kullanılmıştır.

4.2.2.3. Optimum Anti-Gal3 İnkübasyon Süresi

Etkili bir Anti-Gal3 immobilizasyonu için, antikor bağlanma verimliliğini doğrudan etkileyen bir diğer parametre optimum antikor inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla, önceki çalışmalarda belirlenen optimum parametreler sabit tutulup, antikor immobilizasyonu aşamasında farklı inkübasyon sürelerinde **30-60 ve 90 dakika** hazırlanan biyosensörlerin Gal-3'ün 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki çözeltileriyle inkübasyonu sonrası EİS ölçümlerinden ΔRct değerleri hesaplandı. Hesaplanan ΔRct değerleri ile artan Gal-3 konsantrasyonları arasında çizilen standart grafikleri Şekil 4.22'de ve bu grafiklerden elde edilen doğru denklemleri ile doğrusallık katsayıları Çizelge 4.17'da verilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı Anti-Gal3 inkübasyon sürelerinin Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi

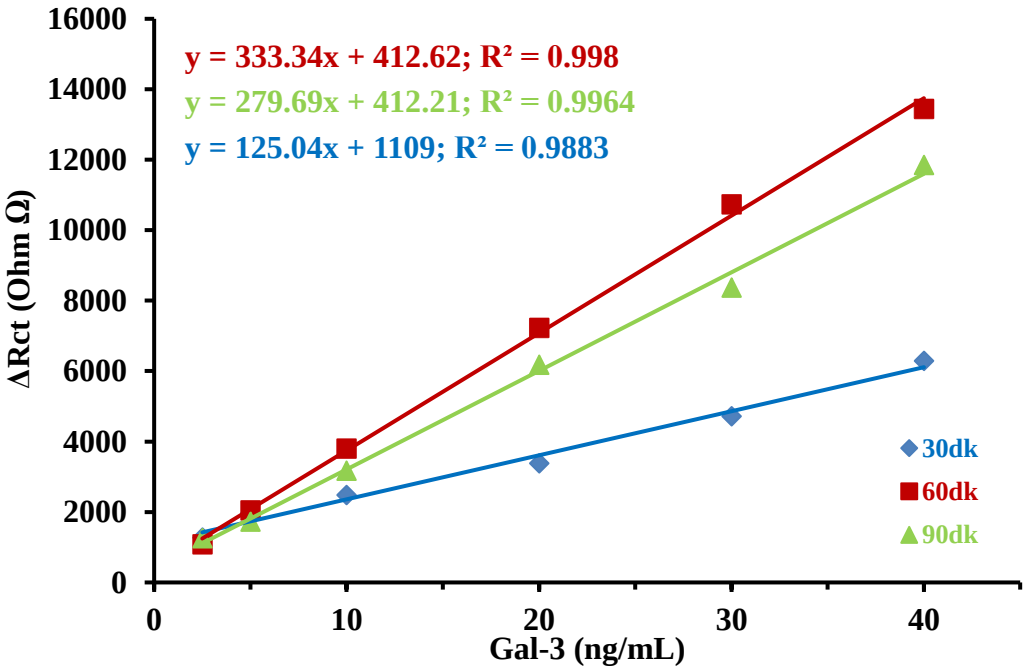
Çizelge 4.17. Anti-Gal3. inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Anti-Gal-3. İnkübasyon Süresi	**Doğru Denklemi**	**Doğrusallık Katsayısı (R^2)**
30 dakika	y = 262.83x + 617.61	R^2 = 0.9901
60 dakika	y = 330.83x + 174.74	R^2 = 0.9997
90 dakika	y = 265.29x + 38.471	R^2 = 0.9984

Çizelge 4.17'de görüldüğü üzere 3 farklı inkübasyon süresi için çizilen standart grafiklerde, doğrusallık katsayılarının 0.99'un üzerinde ve birbirine oldukça yakın olduğu doğru denklemleri elde edilmiştir. Şekil 4.22'deki standart grafiklerden Anti-Gal3 inkübasyon süresinin 60 dakika olarak tutulduğu çalışmanın çok iyi bir doğrusallık (R^2=0.9997) göstererek en yüksek ΔRct değerleriyle en iyi biyonsensör yanıtının alındığı çalışma olarak öne çıktığı görülmektedir. Bu nedenle Anti-Gal3'ün optimum inkübasyon süresi, 60 dakika olarak belirlenmiştir ve bundan sonraki çalışmalarda hazırlanan Gal-3 biyosensörlerinin üretimine bu antikor inkübasyon süresi ile devam edilmiştir.

4.2.2.4. Optimum Gal-3 Analit Proteininin İnkübasyon Süresi

Biyosensör performansını artırmak için gerçekleştirilen son optimizasyon çalışması, Gal-3 analit proteininin kantitatif analizinde biyosensör yüzeyine etkili bir şekilde bağlanması için optimum inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu optimizasyon çalışmasında optimum koşullarda hazırlanan Gal-3 biyosensörleri 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki Gal-3 çözeltileriyle **30-60-90 dakika** sürelerde inkübe edilerek biyosensörlerin bağlanma verimliliği EİS ölçümleri ile değerlendirilmiştir. EİS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleriyle oluşturulmuş standart grafikler Şekil 4.23'de ve bu grafiklere ait doğru denklemleri ile doğrusallık katsayıları Çizelge 4.18'de gösterilmektedir.



Şekil 4.23 Farklı Gal-3 inkübasyon sürelerinin Gal-3 biyosensörü yanıtlarına etkisi

Çizelge 4.18. Gal-3 inkübasyon süresi optimizasyonundan elde edilen standart grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Gal-3. İnkübasyon Süresi	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
30 dakika	y = 125.04x + 1109	R^2 = 0.9883
60 dakika	**y = 333.34x + 412.62**	**R^2 = 0.998**
90 dakika	y = 279.69x + 412.21	R^2 = 0.9964

Şekil 4.23'deki Gal-3 analit proteininin farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen standart grafikleri incelendiğinde 30 dakikalık analit inkübasyon süresinde alınan biyosenör cevabının, diğer inkübasyon sürelerindekilere göre özellikle artan analit konsantrasyonlarında belirgin bir şekilde düşük kaldığı görülmüktedir. Bu sonuç, 30 dakikalık inkübasyon süresinin Anti-Gal-3 ve Gal-3 arasında gerçekleşen spesifik bağlanma için yeterli olmadığını göstermektedir. 90 dakikalık Gal-3 inkübasyon süresi biyosensör cevaplarının da 60 dakikalık inkübasyon süresine göre nispeten düşük olması, 60 dakikalık inkübasyon süresinin spesifik bağlanmalar için ideal süre olduğunu, bu süreden uzun inkübasyon sürelerinde biyosensör performansınının olumsuz etkilenmeye başladığını göstermektedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda Gal-3 biyosensörünün optimum analit inkübasyon süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir ve sonraki çalışmalarda hazırlanan Gal-3 biyosensörlerinde Gal-3 analit proteini için bu inkübasyon süresi kullanılmıştır. Geliştirilen Gal-3 biyosensörünün tüm optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum parametreler Çizelge 4.19'de listelenmiştir.

Çizelge 4.19. Gal-3 biyosensörünün geliştirilmesinde belirlenen optimum çalışma koşulları

Optimizasyon Parametreleri	Optimum Değerler
TMOHES Konsantrasyonu	%1
Anti-Gal3 Konsantrasyonu	1000 ng/mL
Anti-Gal3 İnkübasyon Süresi	60 dk
Gal-3 İnkübasyon Süresi	60 dk

Belirlenen bu optimum koşullar Gal-3 analit proteinin kantitatif tayininde kullanılmak üzere üretilen Gal-3 biyosensörünün performans, hassasiyet ve tayin güvenilirliğini artırmıştır.

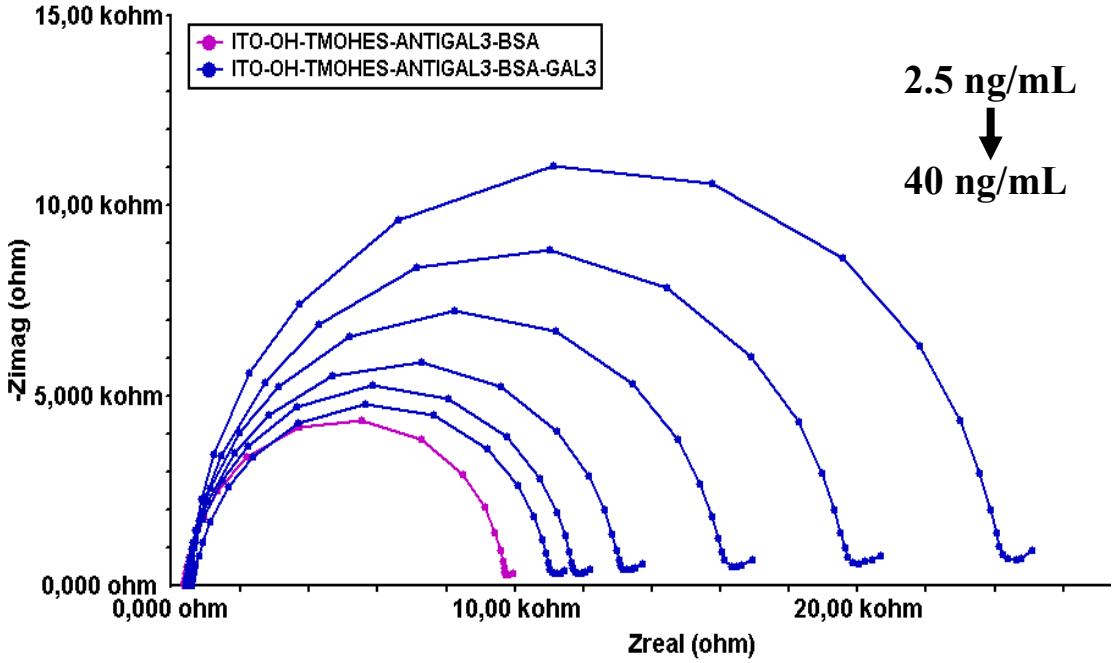
4.2.3. Gal-3 Biyosensörünün Karakterizasyonun İlişkin Bulgular

Gal-3 biyobelirteci tayini için üretilen biyosensörün optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra biyosensörün doğrusal tayin aralığı, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik, insan serumunda uygulanabilirlik, depolama süresinin tayini gibi analitik karakterizasyon özellikleri ve bunların yanı sıra;

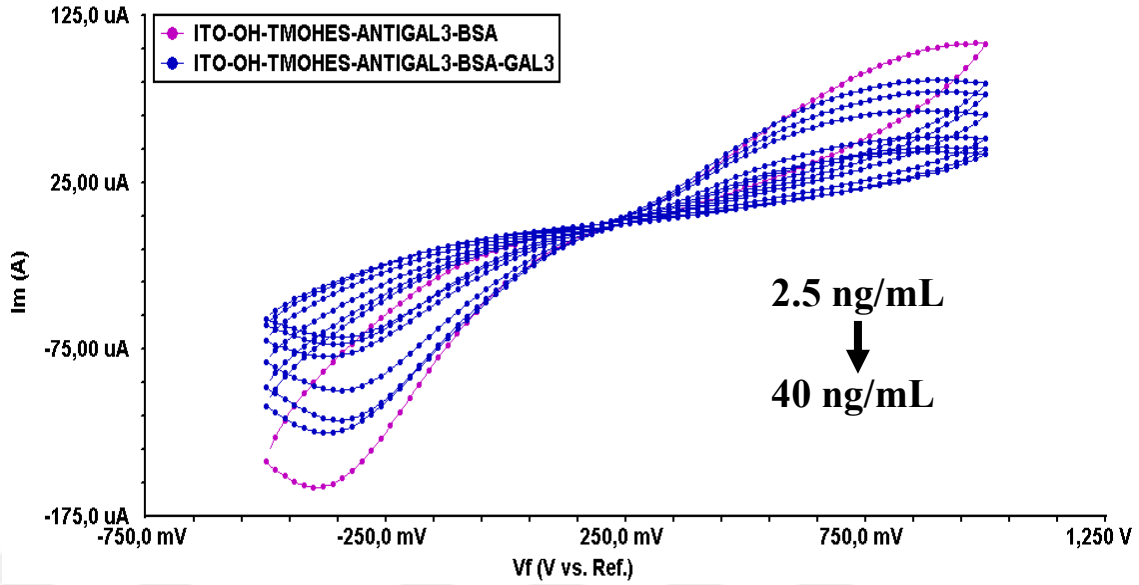
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleme, EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi-Nokta ve Alan Haritalama) ve FTIR analizleri gibi yüzey karakterizasyon özellikleri belirlendi. Tüm karakterizasyon çalışmalarında, biyosensörün hazırlığı Bölüm 4.2.2'de belirtilen optimum koşullar altında gerçekleştirildi.

4.2.3.1. Gal-3 Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı

Bölüm 3.2.2.1'de anlatılan yöntem ile ve Çizelge 4.18'de listelenen optimum koşullar kullanılarak üretilen Gal-3 biyosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemek amacıyla, belirtilen koşullarda hazırlanan Gal-3 biyosensörleri ile, Gal-3 biyobelirtecinin artan 6 farklı konsantrasyonlarında yapılan kantitatif analizleri ile elde edilen impedans spektrumları Şekil 4.24a'da ve CV ölçümlerinden elde edilen döngüsel voltamogramları ise Şekil 4.24b'de verilmiştir.



Şekil 4.24a. Gal-3 analitinin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki Nyquist eğrileri

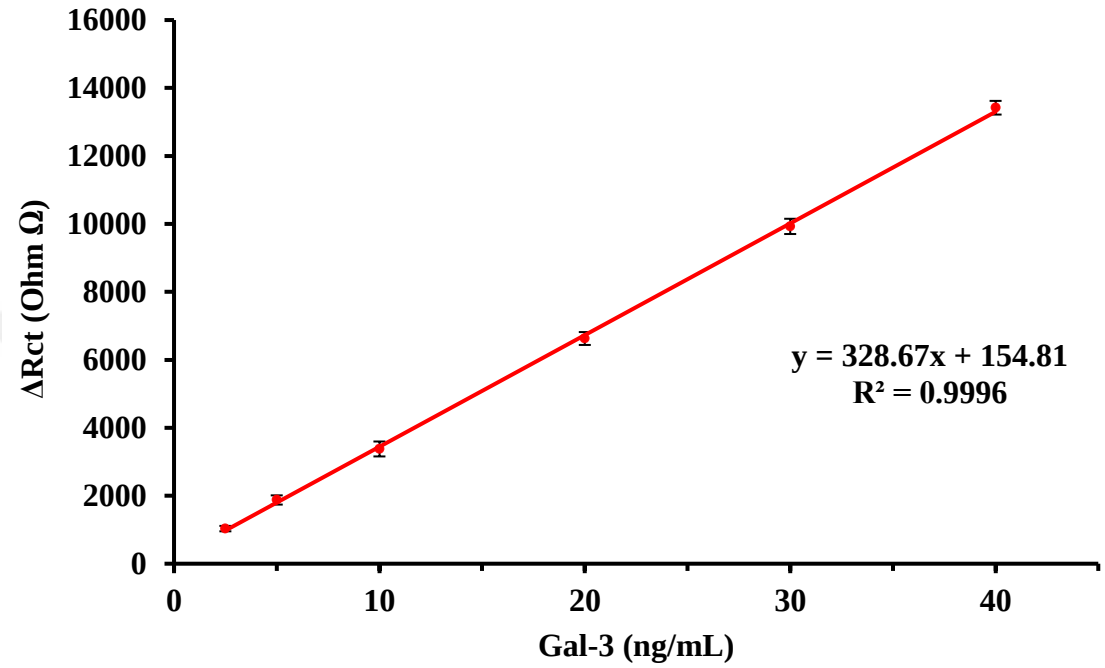


Şekil 4.24b. Gal-3 analitinin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki döngüsel voltamogramları

Şekil 4.24a'daki EİS spektrumlarında BSA adımı sonrası alınan EİS ölçümünden elde edilen Nyquist eğrisi mor renk ile ve Gal-3 analit proteininin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığında artan konsantrasyonlarında inkübasyonları sonrası elde edilen Nyquist eğrileri mavi renk ile gösterilmiştir. EİS spektrumları incelendiğinde Gal-3 analit proteini konsantrasyonu arttıkça Nyquist eğrilerinin yarım daire çapının doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Bu durum, ITO-PET elektrot yüzeyinde immobilize edilmiş Anti-Gal3 antikor molekülleriyle Gal-3 analit proteinlerinin spesifik bağlanması ile oluşan immünokomplekslerin artışıyla orantılı olarak elektrot yüzeyinin iletkenliğinin azalışını ifade etmektedir. Elektrot yüzeyinde artan her bir analit konsantrasyonunda artan antikor-antijen kompleksleri yük transferini kısıtlayarak direncin artışına neden olmaktadır.

Şekil 4.24b'de verilen döngüsel voltamogramlarda, BSA sonrası alınan CV piki mor renk ile 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığında Gal-3 analit proteinleri için alınan CV pikleri mavi renk ile gösterilmiştir. Aynı şekilde, döngüsel voltamogramlardaki pik akım yüksekliklerinin doğrusal olarak azalması elektrot yüzeyinde artan Gal-3 konsantrasyonuyla orantılı olarak oluşan Anti-Gal3/Gal3 immünokomplekslerinin elektron transferini engelleyerek redoks aktif türlerin elektrot yüzeyine ulaşmasının gittikçe zorlaştırdığına işaret etmektedir. Bu difüzyon engelinin bir sonucu olarak CV ölçümlerinde akımda düzenli bir azalış meydana gelmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonrası üretilen biyosensörün doğrusal tayin aralığı 2.5 ng/mL-40 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu aralıkta hazırlanan 10 adet biyosensörün ΔRct değerlerinin ortalaması alınarak çizilen tayin aralığına ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.25'te verilmiştir.



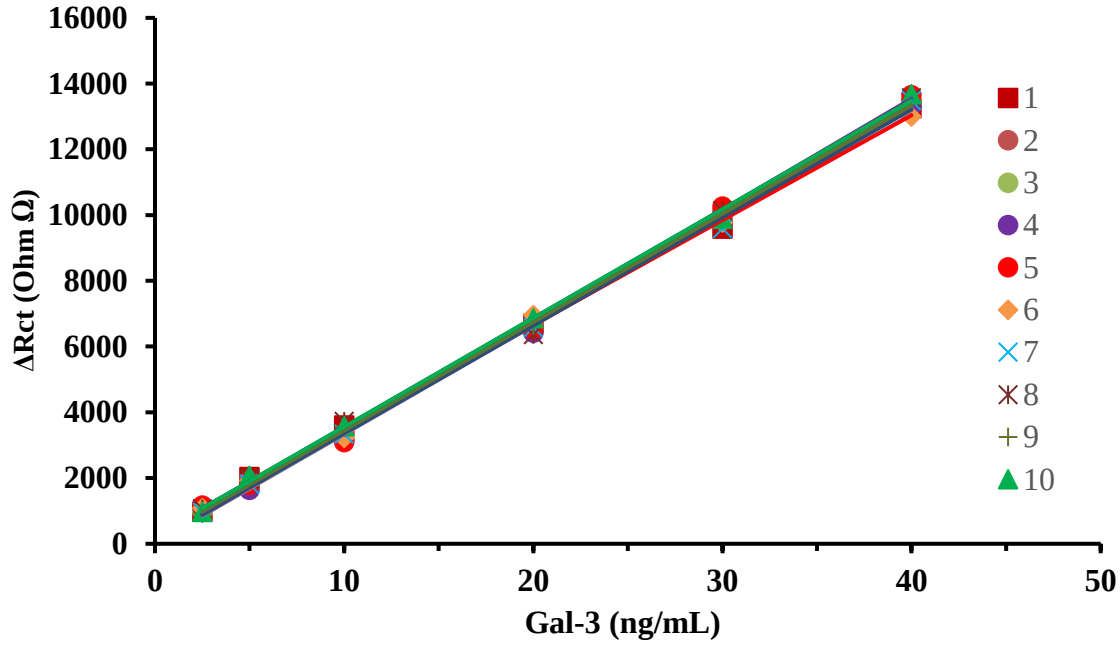
Şekil 4.25. Gal-3 biyosensörünün 2.5-40 ng/mL tayin aralığına ait standart grafik

Gal-3 biyosensörünün Şekil 4.25'te verilen kalibrasyon grafiği incelendiğinde 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığında artan Gal-3 analit proteini konsantrasyonun ΔRct değerinde meydana getirdiği artışın oldukça lineer olduğu görülmektedir. Farklı günlerde hazırlanmış 10 adet biyosensörün ΔRct değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak oluşturulan kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi y = 328.67x + 154.81 olarak belirlenmiş olup regresyon katsayısı ise R^2 = 0.9996 değeri ile oldukça yüksek bir doğrusallık sergilemiştir. Bu sonuçlar üretilen biyosensör ile Gal-3 konsantrasyonunun güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Gal-3 biyosensörünün en düşük Gal-3 konsantrasyonunun ölçümlerinden elde edilen standart sapmalarının ortalamasından hesaplanan LOD değeri 0.730483 ng/mL; LOQ değeri 2.43 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.2.3.2. Gal-3 Biyosensörünün Tekrar Üretilebilirliği

Bu tez kapsamında geliştirilen Gal-3 biyosensörlerinin tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, optimum koşullarda farklı zamanlarda hazırlanan 10 adet Gal-3 biyosensörü Gal-3 analit proteinin doğrusal tayin aralığındaki konsantrasyonlarında yapılan EİS ölçümlerinden ΔRct değerleri hesaplandı. Bu ΔRct değerleri ile Gal-3 konsantrasyonları arasında çizilen 10 adet standart grafik Şekil 4.26'da ve bu grafiklerin doğru denklemleri ile doğrusallık katsayıları Çizelge 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Gal-3 biyosensörünün 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki tekrar üretilebilirliği (n=10)

Aynı prosedürle hazırlanan 10 farklı biyosensörün Şekil 4.26'da üst üste çakışan standart grafikleri biyosensörlerin benzer biyosensör yanıtları verdiği, Çizelge 4.20'de tümünün doğrusallık katsayılarının oldukça yüksek olduğu ve doğru denklemlerinin eğim değerlerinin yüksek ve nispeten birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu benzerlik üretilen Gal-3 biyosensörün tekrar üretilebilirlik kabiliyetinin yüksek olduğunu göstermekte olup, biyosensör tasarımının ve optimizasyonlarının başarısını doğrular niteliktedir.

Çizelge 4.20. Gal-3 biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik çalışmalarının doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Biyosensör Numarası	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Tayin Aralığı
1	y = 319.08x + 307.88	R^2 = 0.9986	2.5-40 ng/mL
2	y = 330.83x + 174.74	R^2 = 0.9997	2.5-40 ng/mL
3	y = 331.64x + 0.7097	R^2 = 0.9992	2.5-40 ng/mL
4	y = 330.19x + 36.596	R^2 = 0.9987	2.5-40 ng/mL
5	y = 337.79x + 28.515	R^2 = 0.9978	2.5-40 ng/mL
6	y = 319.02x + 276,8	R^2 = 0.9986	2.5-40 ng/mL
7	y = 328.29x + 79.68	R^2 = 0.9982	2.5-40 ng/mL
8	y = 329.12x + 244.94	R^2 = 0.9977	2.5-40 ng/mL
9	y = 329.7x + 153	R^2 = 0.9997	2.5-40 ng/mL
10	y = 330.99x + 245.25	R^2 = 0.9987	2.5-40 ng/mL

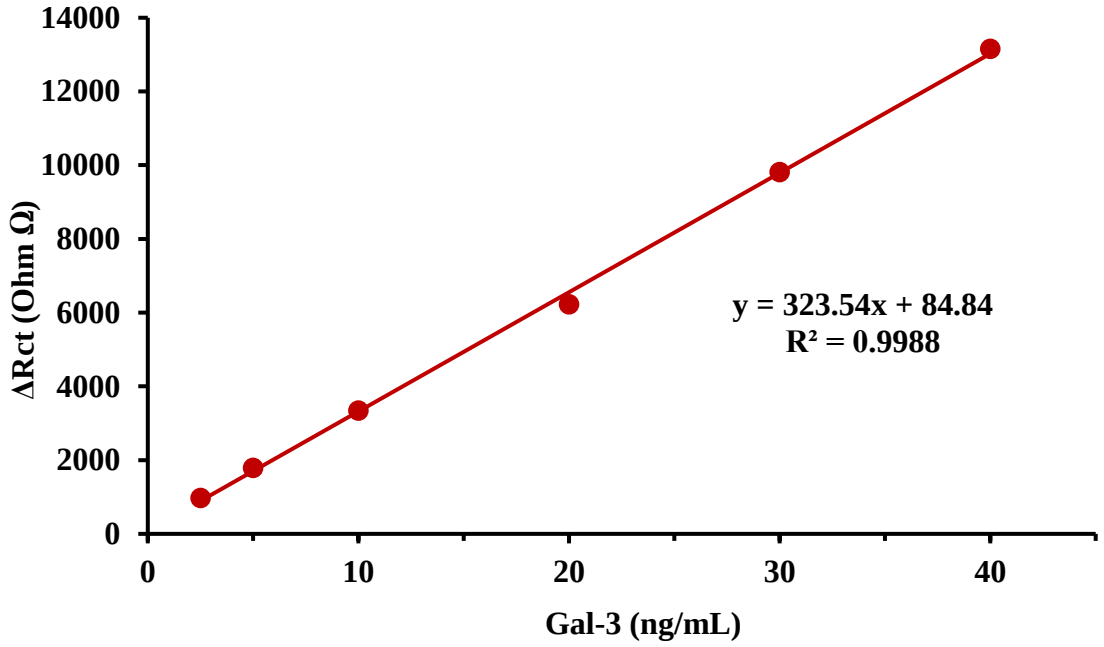
4.2.3.2.1 Farklı bir çalışmacı tarafından yapılan tekrar üretilebilirlik çalışması

Gal-3 biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin desteklenmesi için yapılan bir diğer çalışma aynı biyosensör çalışmasının farklı bir çalışmacı tarafından uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı aynı metodolojiyi takip ederek farklı bir araştırmacının elde ettiği sonuçlarla karşılaştırma yaparak sonuçların güvenilirliğini, tutarlılığını değerlendirmektir. Bu amaçla Gal-3 biyosensörü farklı bir çalışmacı tarafından, bu tez çalışmasında belirlenen optimum koşullarda hazırlanarak Gal-3 analit proteininin doğrusal tayin aralığındaki (2.5-40 ng/mL) artan konsantrasyonlarında ölçümleri aynı koşullarda ve aynı ölçüm cihazında gerçekleştirildi. Gal-3'un 6 farklı konsantrasyonunda EİS ölçümlerinden elde edilen ΔRct değerleri Çizelge 4.20'de ve bu ΔRct değerleriyle Gal-3 konsantrasyonları arasında çizilen standart grafik Şekil 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Gal-3 biyosensörünün farklı bir çalışmacı tarafından gerçekleştirilen Gal-3 ölçümlerinin 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki ΔRct değerleri

Gal-3 (ng/mL)	ΔRct (Ohm)*
2.5	971
5	1787
10	3340
20	6223
30	9812
40	13157

*Biyosensör hazırlığı ve ölçümleri Dilek Nur ALTAY tarafından gerçekleştirilmiştir



Şekil 4.27. Gal-3 biyosensörünün farklı bir çalışmacı tarafından gerçekleştirilen 2.5-40 ng/mL konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.21'de verilen ΔRct değerleri bu tez çalışmasının araştırmacısı tarafından elde edilen ve Çizelge 4.13'de gösterilen değerlerle uyumluluk göstermiştir. Bu uyumlu değerler Gal-3 biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin ve güvenilirliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.27'deki kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi (y = 323.54x + 84.84) ile bu tez kapsamında belirlenen doğrusal tayin aralığı çalışmasının kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi (y = 328.67x + 154.81) ile karşılaştırıldığında, benzer oldukları ve

grafiğin R^2=0.9988 regresyon değeriyle doğrusallığının da oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Farklı bir araştırmacı tarafından benzer sonuçların elde edilmesi biyosensör geliştirme sürecinin tutarlı olduğunu, yöntemin doğrulanabilirliğini ve ölçüm sonuçlarının öznelliğe dayalı olmadığını göstermektedir. Biyosensör performansının hem üretim aşamasında tekrar üretilebilirliğini hem de analiz aşamasında güvenilir bir şekilde tekrar edilebilirliğini doğrulamaktadır.

4.2.3.3. Gal-3 Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği

Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında, optimize edilmiş koşullarda hazırlanmış biyosensörler ile Gal-3 analit proteininin 4 farklı sabit konsantrasyonunda (30 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL ve 5 ng/mL) her bir sabit konsantrasyon için 8'er adet biyosensör ile alınan EİS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleri, Şekil 4.25'te verilen kalibrasyon grafiği doğru denkleminde yerine konmasıyla Gal-3 analit konsantrasyonları hesaplandı. Herbir konsantrasyon için aritmetik ortalama, standart sapma, relatif standart sapma ve % geri kazananım değerleri belirlendi. Belirtilen her bir sabit konsantrasyon için tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge.4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4.22. Gal-3 biyosensörünün tekrarlanabilirlik ölçümlerine ilişkin sonuçlar

Ortama eklenen Gal-3 miktarı (ng/mL)	Biyosensör ile ölçülen Gal-3 miktarı (ng/mL)*	Standart Sapma	rSTD (%)	Geri Kazanım (%)
30	29.9904	0.4730	1.5771	99.9680
20	19.8705	0.5004	2.5185	99.3523
10	9.9951	0.6009	6.0115	99.9506
5	5.1026	0.3437	6.7364	102.0522

*****Gal-3 miktarları kalibrasyon grafiğinin y = 328.67x + 154.81 denklemi kullanılarak hesaplanmıştır ve çizelgede 8'er ölçümün ortalama değeri verilmiştir.

Çizelge 4.22'de verilen sonuçlara göre, belirlenen konsantrasyonlardaki biyosensör cevapları ile EİS ölçümlerinden elde edilen ΔRct değerlerinin aritmetik

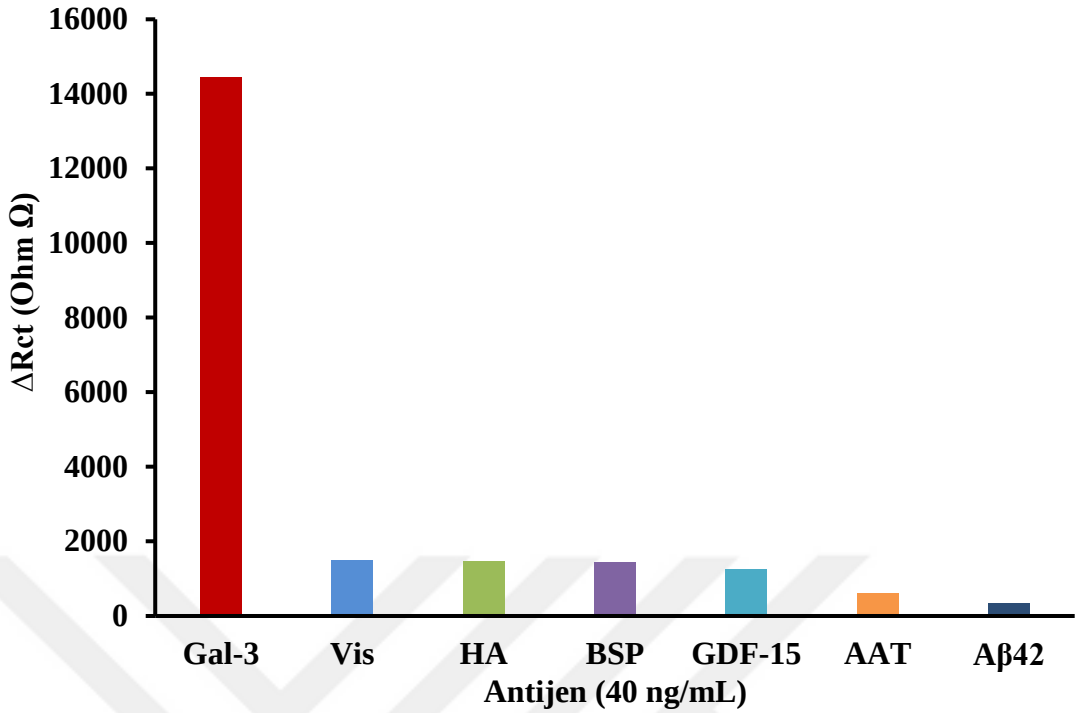
ortalamaları karşılaştırıldığında, sonuçların birbirine benzer olduğu, standart ve relatif sapma değerlerinin düşük ve kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar biyosensörün yüksek hassasiyetle, doğru ölçüm yaptığını göstermektedir. Düşük düzeyde belirlenen standart ve relatif standart sapma değerleri, Gal-3 biyosensörü analiz çalışmalarında hedef analiti olan Gal-3'ün tayininde minimum varyasyonla, güvenilir, tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebileceğine işaret eder. Geri kazanım yüzdeleri sonuçları da biyosensörün analit ölçümündeki başarısını desteklemektedir.

Sonuç olarak tekrarlanabilirlik verilerinin istatistiksel değerleri gerçek Gal-3 konsantrasyonlarının yüksek doğrulukta, güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini göstermektedir.

4.2.3.4. Gal-3 Biyosensörünün Seçiciliği

Gal-3 biyobelirtecinin tayini için üretilen biyosensörün seçiciliği çalışmaları biyosensörün farklı proteinlere afinitesinin ve non-spesifik etkileşimlerin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün visfatin (Vis), kemik siyaloprotein (BSP), büyüme farklılaşma faktörü-15 (GDF-15), alfa-1-antitripsin (A1AT), amiloid beta 42 ($A\beta_{42}$) ve insan serum albümini (HSA) proteinlerinin 40 ng/mL konsantrasyonundaki çözeltileri, ayrı ayrı hazırlanan Gal-3 biyosensörleriyle, Gal-3 analit proteini ölçüm prensibiyle analiz edildi. Belirtilen her bir protein için elde edilen ΔRct değerleri ve aynı konsantrasyondaki (40 ng/mL) Gal-3 analit proteini için elde edilen ΔRct değeri ile karşılaştırılarak oluşturulan sütun grafiği Şekil 4.28'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar biyosensörün hedef analiti olan Gal-3'e karşı yüksek duyarlılık ve özgüllük göstererek diğer proteinlerle kıyaslandığında biyosensör yüzeyine yüksek seçicilikle bağlandığını kanıtlamaktadır. Diğer proteinlerin ölçümünden elde edilen ΔRct değerlerinin oldukça düşük olması bu proteinlerle Anti-Gal3 arasında kararlı spesifik bağlanmaların gerçekleşmediğini ve olası non-spesifik bağlanmaların da düşük olduğunu göstermektedir. Bu düşük, olası spesifik olmayan etkileşimlerin nedeni antikor ve hedef dışı proteinlerin karşıt yüklü amino asitlerinden kaynaklı elektrostatik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler olabilir.



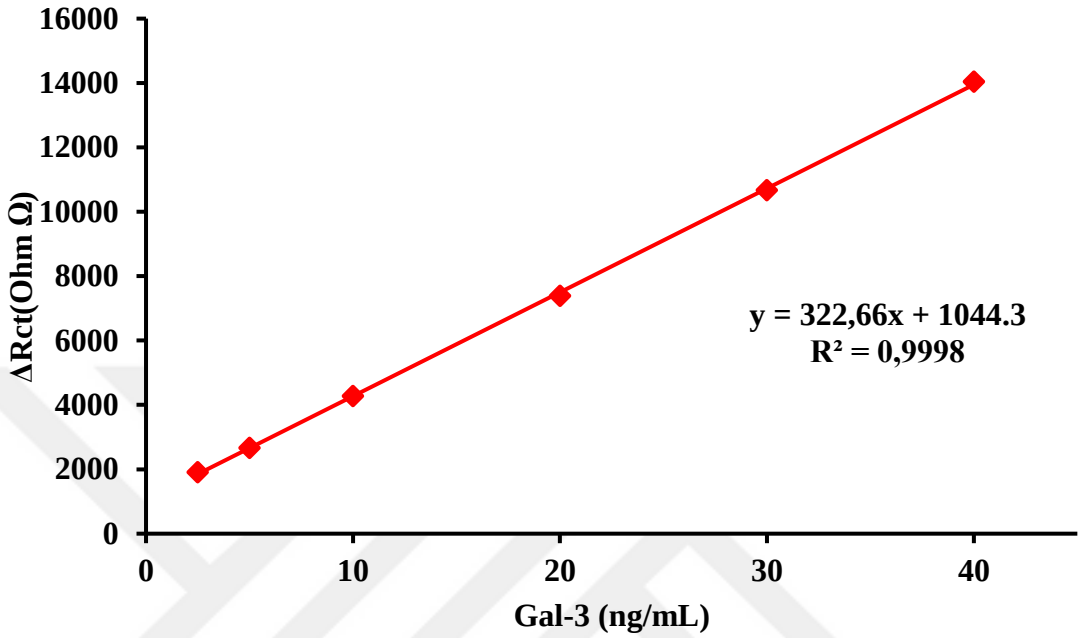
Şekil 4.28. Gal-3 biyosensörünün seçicilik çalışması

24.2.3.5. Gal-3 Biyosensörünün İnsan Serumunda Uygulaması

Bu çalışmada geliştirilen Gal-3 biyosensörünün gerçek biyolojik örneklerdeki etkisini değerlendirebilmek, serum içerisindeki bileşenlerin Anti-Gal3/Gal3 immünokompleksinin oluşumuna, dolayısıyla biyosensör cevabına etkisini belirlemek amacıyla, Gal-3 biyobelirtecinin analizi ticari olarak satın alınan insan serumu kullanılarak gerçekleştirildi. İnsan serumu örneği 10^6 kat seyreltilerek, bu serum çözeltisinin içerisinde doğrusal tayin aralığındaki konsantrasyonlarında hazırlanan Gal-3 çözeltilerinin kantitatif analizi 2 adet Gal-3 biyosensörü ile gerçekleştirildi. EİS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleri ile Gal-3 konsantrasyonları arasında çizilen standart grafiği Şekil 4.29'da verildi.

Şekil 4.29'da verilen Gal-3 protein çözeltisinin 1 X PBS yerine insan serum örneği içerisinde hazırlanmasıyla elde edilen biyosensör yanıtlarının yüksek doğrusallıkta (R^2= 0.9998) ve doğru denkleminin eğiminin Şekil 4.25'te verilen doğrusal tayin aralığı kalibrasyon grafiği doğru denkleminin eğimi ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Ancak intercept değerleri nispeten artış göstermiştir. Bu nedenle Çizelge 4.23'de hesaplanan

Gal-3 miktarları incelendiğinde, düşük konsantrasyonlarda sapma görülmektedir. Bunun nedeni insan serumu içerisindeki proteinler ve diğer bileşenlerin düşük analit konsantrasyonlarında ölçülen impedansa bir miktar etkisi olabilir.



Şekil 4.29. Gal-3 biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ait standart grafik

Çizelge 4.23. Gal-3 biyosensörünün insan serumunda uygulamasına ilişkin sonuçlar

Kullanılan Gal-3 miktarı (ng/mL)	ΔRct Değeri	Ölçülen Gal-3 miktarı*(ng/mL)	Geri Kazanım
2.5	1911	5.34	213.73
5	2666.5	7.64	152.84
10	4277	12.54	125.42
20	7387.5	22.01	110.03
30	10670	31.99	106.64
40	14040	42.25	105.62

*Gal-3 miktarları kalibrasyon grafiğinin y = 328.67x + 154.81 denklemi kullanılarak hesaplanmıştır ve 2 ölçüm için hesaplanan değerlerin ortalama değeri verilmiştir

4.2.3.6. Gal-3 Biyosensörünün Depolama Kararlılığı

Geliştirilen Gal-3 biyosensörünün depolanma kararlılığı, Bölüm 3.2.2.3.6'da belirtildiği üzere yaklaşık üç ay süresince +4 ºC'de buzdolabı koşullarında depolanan Gal-3 biyosensörleri 7 günlük periyotlarla 20 ng/mL konsantrasyonundaki Gal-3 çözeltilerinin kantitatif analizi yapılarak belirlendi. Depolama süresi boyunca elde edilen

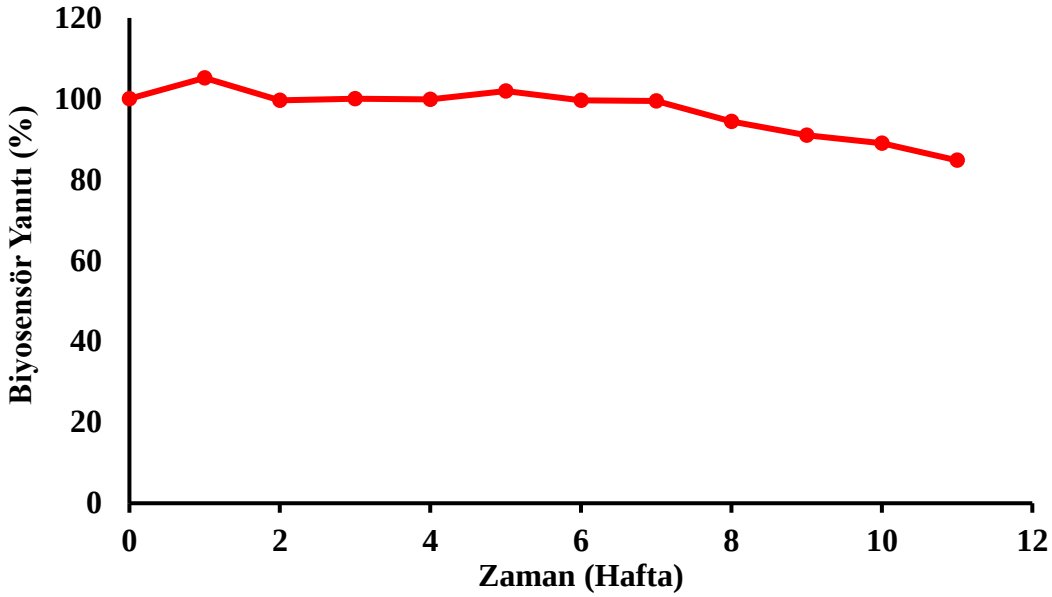
biyosensör cevapları ilk günkü biyosensör yanıtları %100 kabul edilerek karşılaştırıldı (Çizelge 4.24) ve zamana karşı değişen biyosensör cevapları arasında çizilen grafik Şekil 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.24. Gal-3 biyosensörünün depolama kararlılığı verileri

Ölçüm Sayısı	ΔRct	Biyosensör Yanıtı (%)
1	7360	100
2	7740	105.163
3	7330	99.5924
4	7360	100
5	7350	99.8641
6	7500	101.902
7	7330	99.5924
8	7320	99.4565
9	6950	94.4293
10	6700	91.0326
11	6550	88.9946
12	6240	84.783

Gal-3 konsantrasyonu 20 ng/mL

Şekil 4.30'da verilen grafikte Gal-3 biyosensörünün 12 haftalık bir süre boyunca aktivitesini büyük oranda koruduğu görülmektedir. Çizelge 4.24'deki verilerden de görüldüğü üzere biyosensörün 8. haftaya kadar aktivitesini neredeyse tamamen koruduğu, 12. haftaya kadar en fazla %12'lik bir performans kaybı yaşadığı anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar biyosensörün 3 ay gibi bir süreyle kullanılabilir durumda kalarak +4°C'de buzdolabı koşullarında depolanabileceğini, uzun bir raf ömrüne sahip, stabil bir biyosensör olduğunu göstermektedir.



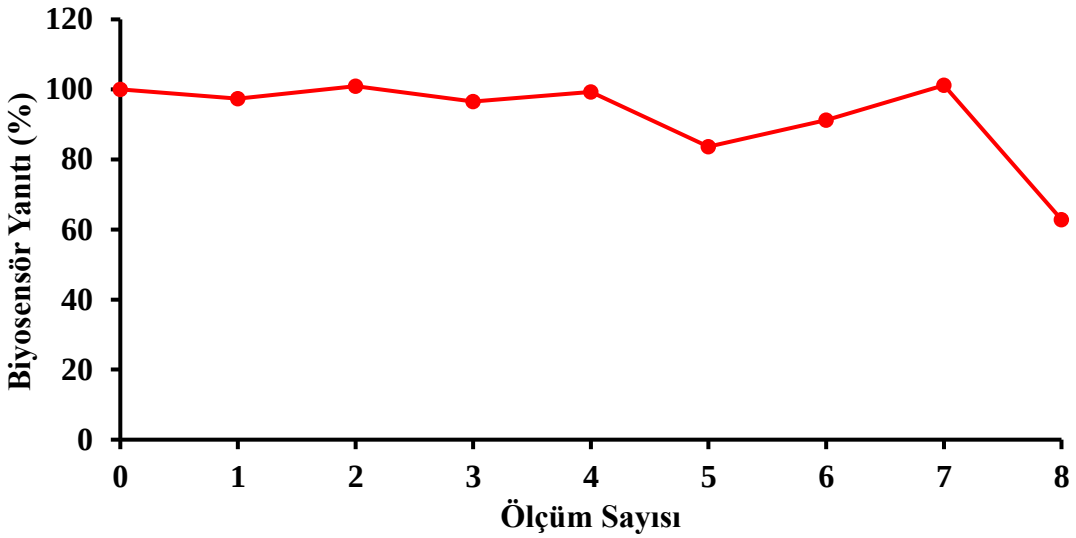
Şekil 4.30. Gal-3 biyosensörünün depolama kararlılığına ait grafik

4.2.3.7. Gal-3 Biyosensörünün Tekrar Kullanılabilirliği (Rejenerasyon)

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini sağlamak için rejenerasyon çalışmaları önem taşımaktadır. Biyosensörün dayanıklılığını (yüzey kararlılığını) belirlemek ve maliyet etkinliğini arttırmak amacıyla, biyosensörün ilk analit tayini sonrası biyosensör yüzeyinde oluşmuş biyoafinite kompleksi rejenere edilerek, birden fazla kez analiz için uygun olup olmadığının ve kaç tekrar kullanım ile kabul edilebilir sonuçlar elde edilebileceğinin tespiti yapılmıştır.

Optimize koşullarda hazırlanan Gal-3 biyosensörü, Gal-3 analit proteinin 40 ng/mL konsantrasyondaki çözeltisi ile inkübe edilerek alınan EİS ölçümünden ΔRct değeri hesaplandı. Ölçümün ardından ITO-PET elektrot Bölüm 3.2.2.3.7'de anlatıldığı şekilde rejenere edildi. Rejenere edilmiş elektrot yüzeyinin durumu ve yüzeydeki antikor-antijen kompleksinin ayrışması EİS ölçümleriyle takip edildi. Ölçümün ardından, biyosensör yüzeyi hala anti-Gal3 antikoru ile kaplı olduğundan, biyosensör tekrar Gal-3 analit proteini (40 ng/mL) ile inkübe edilip, antikor-analit bağlanmasının kontrolü ve biyosensör aktivitesinin tespiti için EİS ölçümleri alındıktan sonra tekrar rejenere edildi Bu işleme biyosensör aktivitesindeki kaybın anlamlı derecede azalarak, elektrot yüzeyinin bozulmasına kadar devam edildi. Her bir rejenerasyon döngüsünde Gal-3 inkübasyonu sonrası alınan EİS ölçümlerinden hesaplanan ΔRct değerleri, rejenerasyon

yapılmadan önce alınan EİS ölçümünün ΔRct değeri 100 kabul edilerek, bağıl (%) biyosensör yanıtı olarak hesaplandı. Rejenerasyon ölçümlerinin bağıl biyosensör yanıtı grafiği Şekil 4.31'de verilmiştir.



Şekil 4.31. Gal-3 biyosensörü tekrar kullanılabilirliğine ait grafik

Ölçümlerle belirlenen ΔRct değerleri ve hesaplanan bağıl biyosensör yanıtları Çizelge 4.25'de verilmiştir.

Çizelge 4.25. Gal-3 biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik verileri

Ölçüm Sayısı	ΔRct	Bağıl Biyosensör Yanıtı (%)	Gal-3 Konsantrasyonu
1	6858	100	40 ng/mL
2	6677	97.36	40 ng/mL
3	6920	100.90	40 ng/mL
4	6620	96.53	40 ng/mL
5	6810	99.30	40 ng/mL
6	5740	83.70	40 ng/mL
7	5240	91.29	40 ng/mL
8	6940	101.20	40 ng/mL
9	4310	62.85	40 ng/mL

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği biyosensör yüzeyinin kararlılığının ve dayanıklılığının bir göstergesi olmasının yanı sıra maliyet etkinliğini doğrudan etkileyen bir parametre olmasıyla da önem arz etmektedir. Tek kullanımlık ITO-PET elektrotlarla hazırlanan biyosensörler her ne kadar kullan-at olarak tasarlanmış ve kullanılan elektrotların maliyeti düşük olsa da rejenerasyon çalışmalarıyla tekrar kullanılabilirliğinin desteklenmesi ve zaten düşük olan maliyetin daha da azalması büyük bir avantaj sağlayabilir.

4.2.3.8. Gal-3 Biyosensörünün Yüzey Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.2.3.8.1. Gal-3 biyosensörünün taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

Gal-3 biyosensörünün yüzey modifikasyonlarının (Yalın ITO, ITO-OH ve ITO-OH/TMOHES) ve ardından immobilizasyon basamaklarında (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3, ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA ve ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA) biyosensör yüzey morfolojisindeki değişimlerin incelenmesi amacıyla, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak yüksek çözünürlüklü görüntüleri alınmıştır. SEM görüntüleme analizleri düşük vakum altında gerçekleştirilmiştir ve görüntüleme sırasında 5kV hızlandırma potansiyeli kullanılmıştır.

SEM yüzey görüntüleme tekniği ile Gal-3 biyosensör tasarımında yalın elektrot yüzeyinden başlayarak immobilizasyon aşamaları ve analit inkübasyonu sonrası elektrot yüzeyinde oluşan yapısal değişikliklerin görüntülenmesini sağlamıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.32'de verilmiştir.

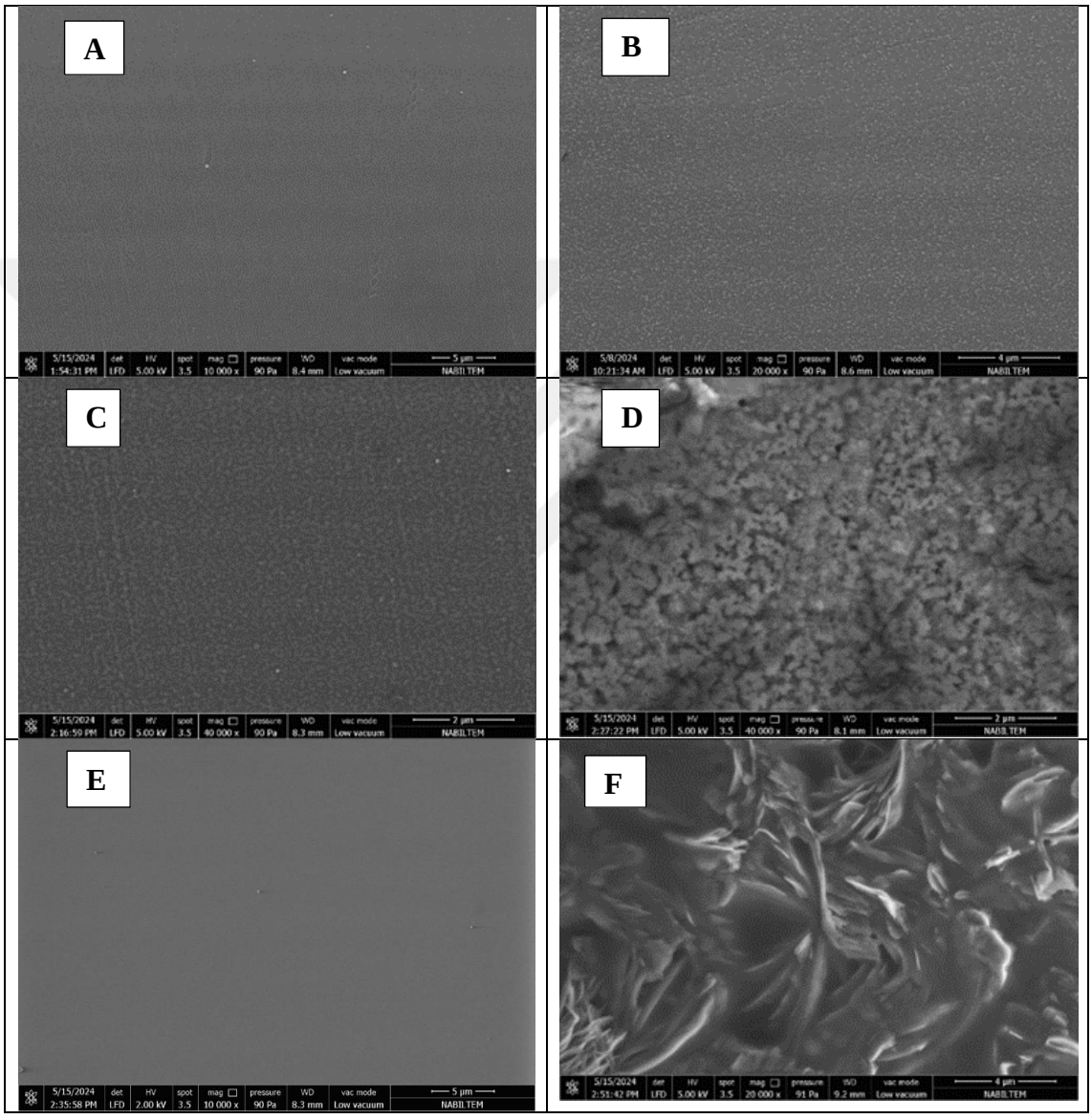
Şekil 4.32A'da temiz ITO yüzeyi homojen olarak görülürken, Şekil 4.32B'de hidroksilasyon adımından sonra elektrot yüzeyinin temiz ITO yüzeyine göre farklılaştığı ve küçük küreciklerle homojen olarak kaplandığı görülmektedir.

Şekil 4.32C ise, TMOHES modifikasyonu sonrasında elektrot yüzeyinin biraz daha dolduğunu göstermektedir. Anti-Gal3 immobilizasyonu sonrasında yüzey morfolojisinin oldukça değiştiği, yüzeydeki kaplama kalınlığının arttığı ve parçacık boyutunun büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.32D).

Şekil 4.32E'de verilen BSA immobilizasyonuyla elektrot yüzeyinde kümelenmiş protein yapıları dikkat çekmektedir. Kantitatif analiz esnasında oluşturulan AntiGal3-

Gal3 immün kompleksinin tüm elektrot yüzeyini kaplayan dolgun yapılı proteinleri görülmektedir (Şekil 4.32F).

Yüzeyde özellikle anti-Gal3 ve BSA immobilizasyonları sonrası ve Gal-3 analit proteini inkübasyonu sonucunda elde edilen görüntülerde fark edilir bir değişim görülmektedir.



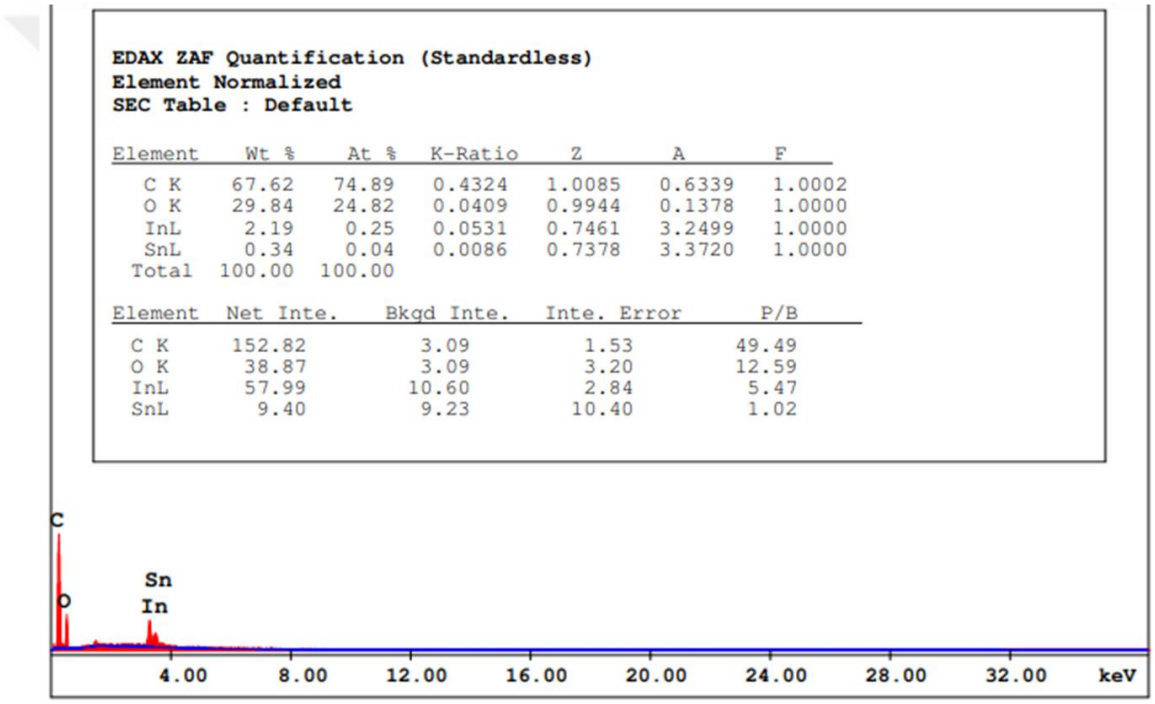
Şekil 4.32. Gal-3 biyosensörünün immobilizasyon adımlarına ve analite ait SEM görüntüleri (A) Yalın ITO, (B) OH, (C) OH/TMOHES (D) OH/TMOHES/Anti-Gal3, (E) OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA(F) OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA

Benzer farkın yalın elektrot ve antikor immbolizasyonu öncesi yüzey modifikasyonları arasında, antikor, BSA ve analit inkübasyonları sonrası elde edilen görüntüler arasındaki kadar belirgin olmaması elektrot yüzeyinin genişliği ve SAM

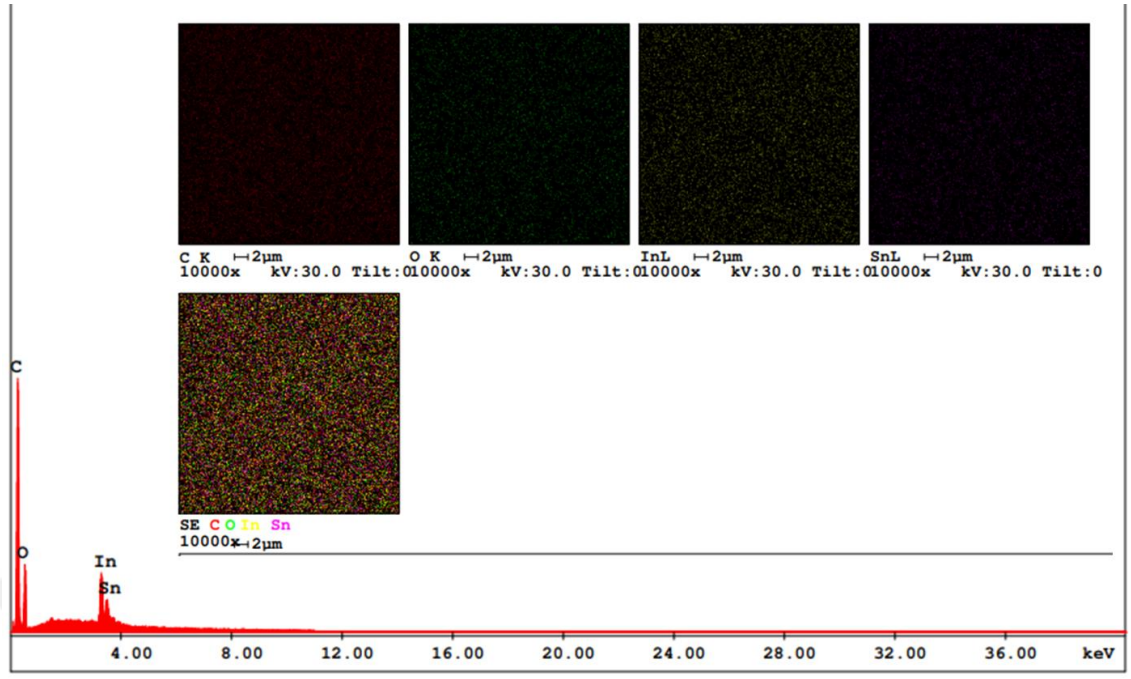
oluşturmak için kullanılan moleküllerin proteinlere kıyasla boyutunun küçük olması şeklinde açıklanabilir.

4.2.3.8.2. Gal-3 biyosensörünün enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi (EDX) sonuçları

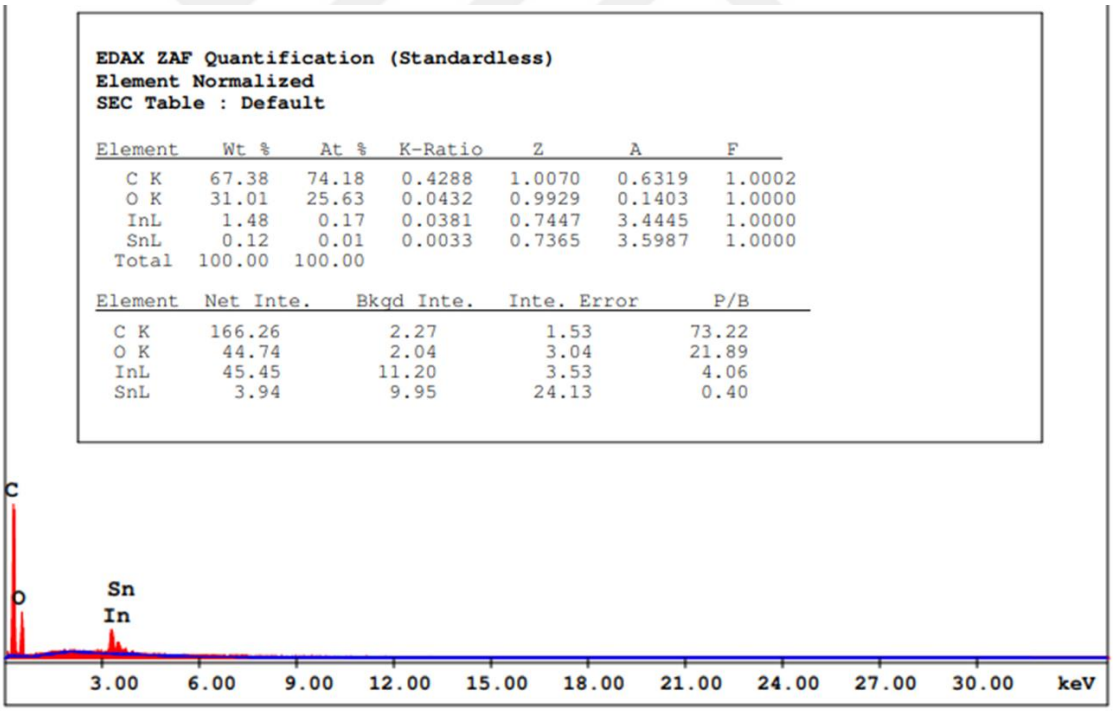
Gal-3 biyosensörünün tasarımında yüzey modifikasyonu öncesi yalın elektrot dahil olmak üzere tüm üretim basamakları için SEM-EDX Haritalama ve SEM-EDX Nokta Alan analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir immobilizasyon adımı için ayrı ayrı elektotlar hazırlanarak SEM-EDX nokta alan analizi ve SEM-EDX haritalama analizleri yapılarak elde edilen veriler Şekil 4.33'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33.a1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (Yalın ITO-PET)



Şekil 4.33a2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (Yalın ITO-PET)

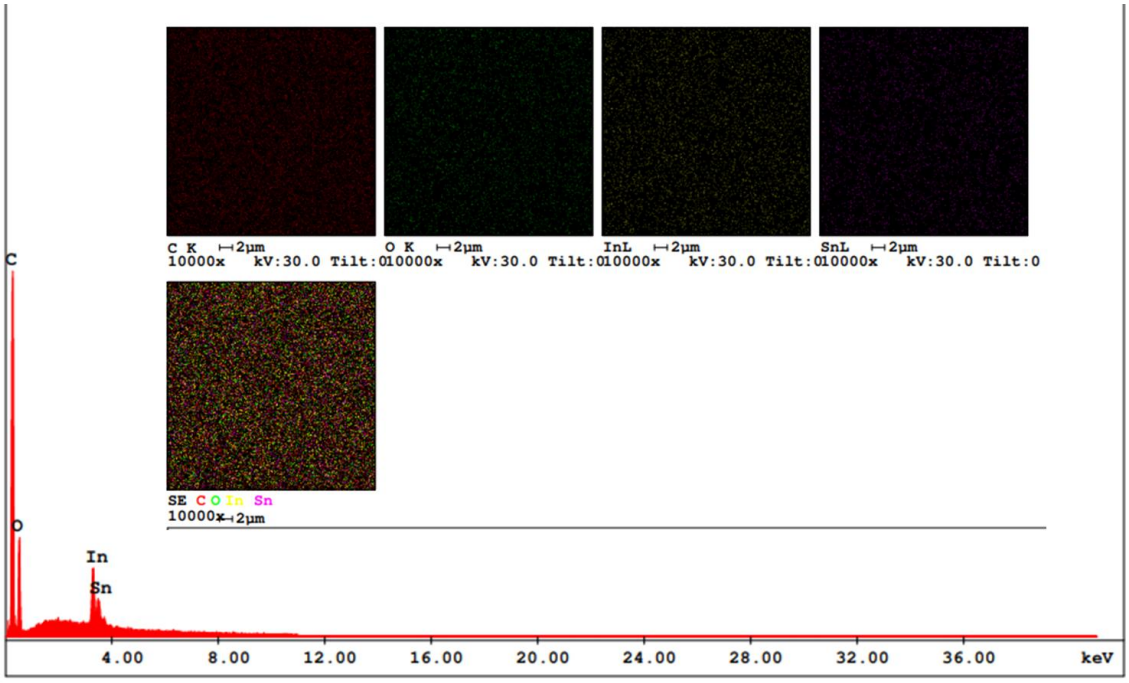


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

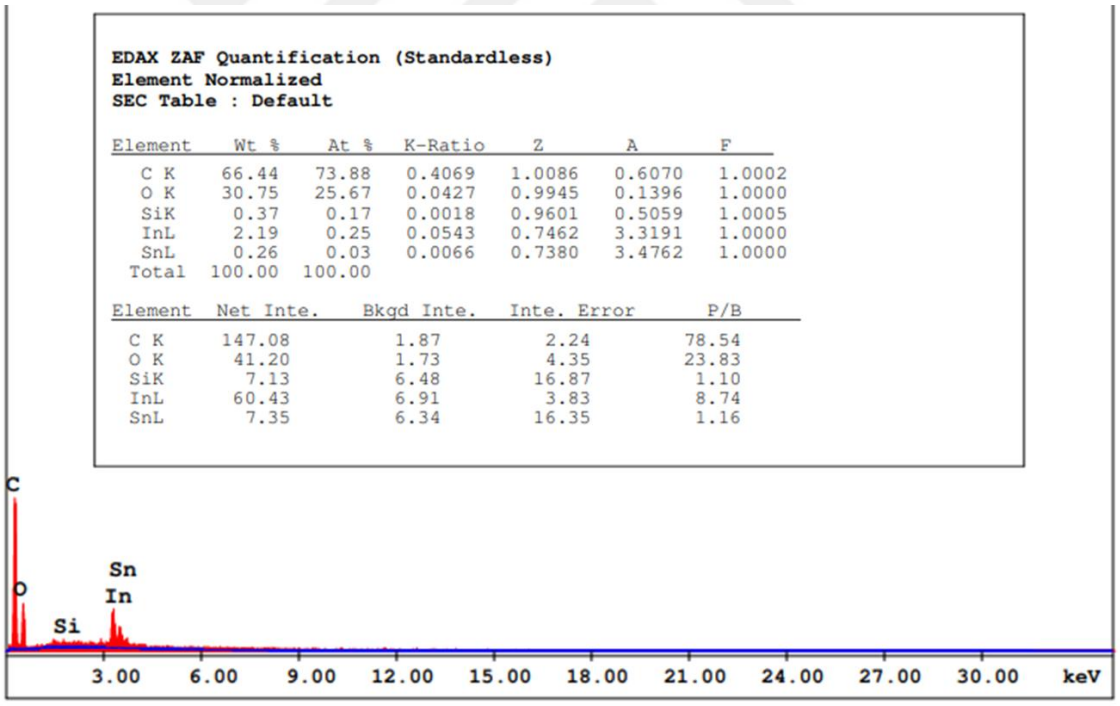
Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	67.38	74.18	0.4288	1.0070	0.6319	1.0002
O K	31.01	25.63	0.0432	0.9929	0.1403	1.0000
InL	1.48	0.17	0.0381	0.7447	3.4445	1.0000
SnL	0.12	0.01	0.0033	0.7365	3.5987	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	166.26	2.27	1.53	73.22
O K	44.74	2.04	3.04	21.89
InL	45.45	11.20	3.53	4.06
SnL	3.94	9.95	24.13	0.40

Şekil 4.33b1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH)



Şekil 4.33b2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH)

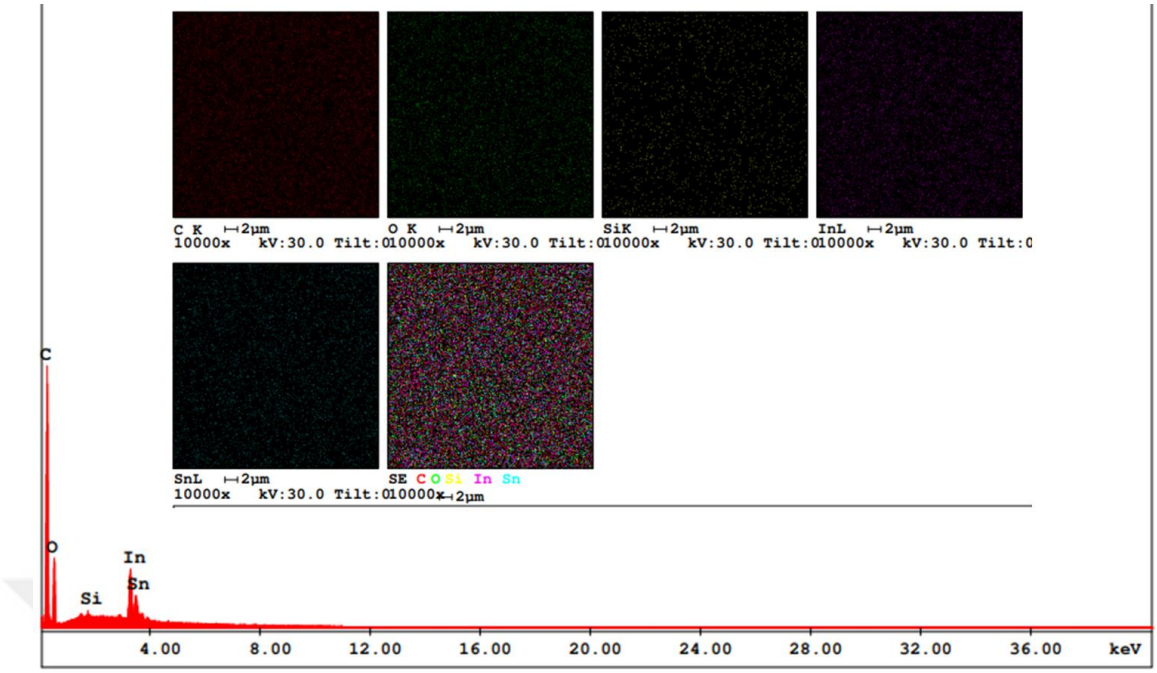


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

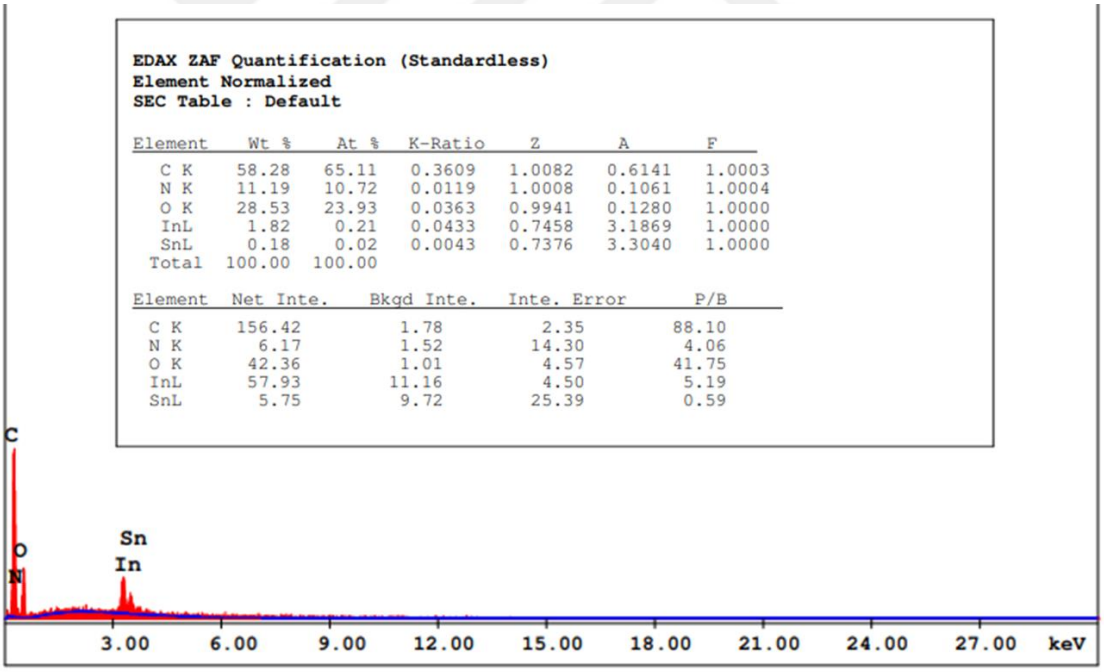
Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	66.44	73.88	0.4069	1.0086	0.6070	1.0002
O K	30.75	25.67	0.0427	0.9945	0.1396	1.0000
SiK	0.37	0.17	0.0018	0.9601	0.5059	1.0005
InL	2.19	0.25	0.0543	0.7462	3.3191	1.0000
SnL	0.26	0.03	0.0066	0.7380	3.4762	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	147.08	1.87	2.24	78.54
O K	41.20	1.73	4.35	23.83
SiK	7.13	6.48	16.87	1.10
InL	60.43	6.91	3.83	8.74
SnL	7.35	6.34	16.35	1.16

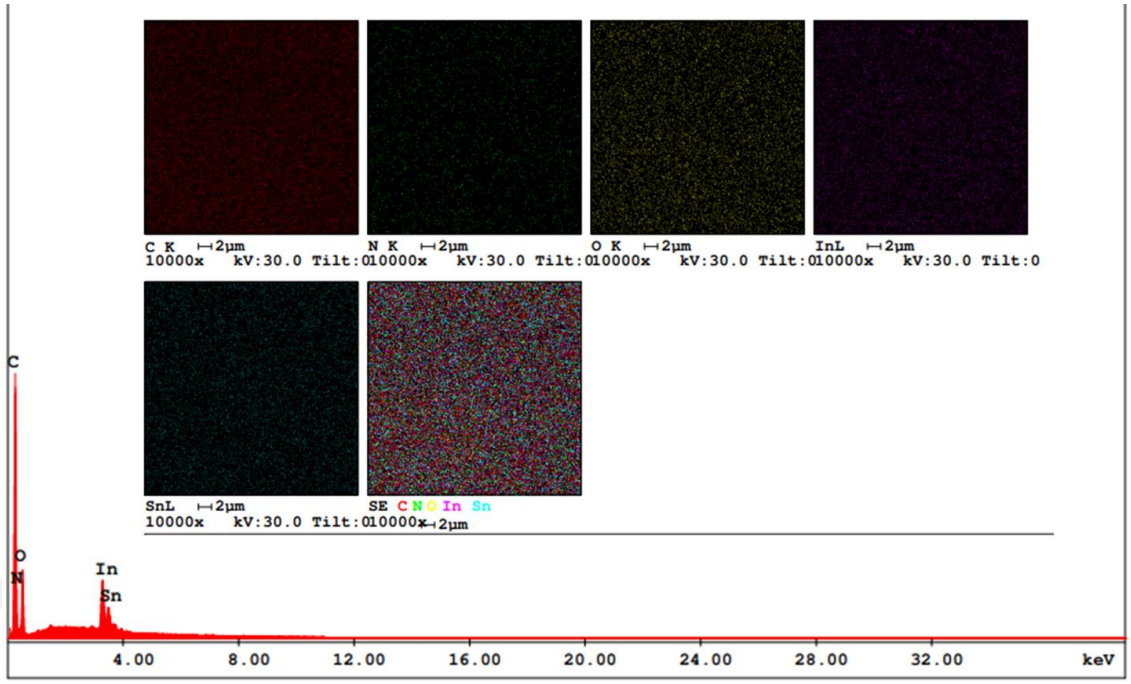
Şekil 4.33c1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH-TMOHES)



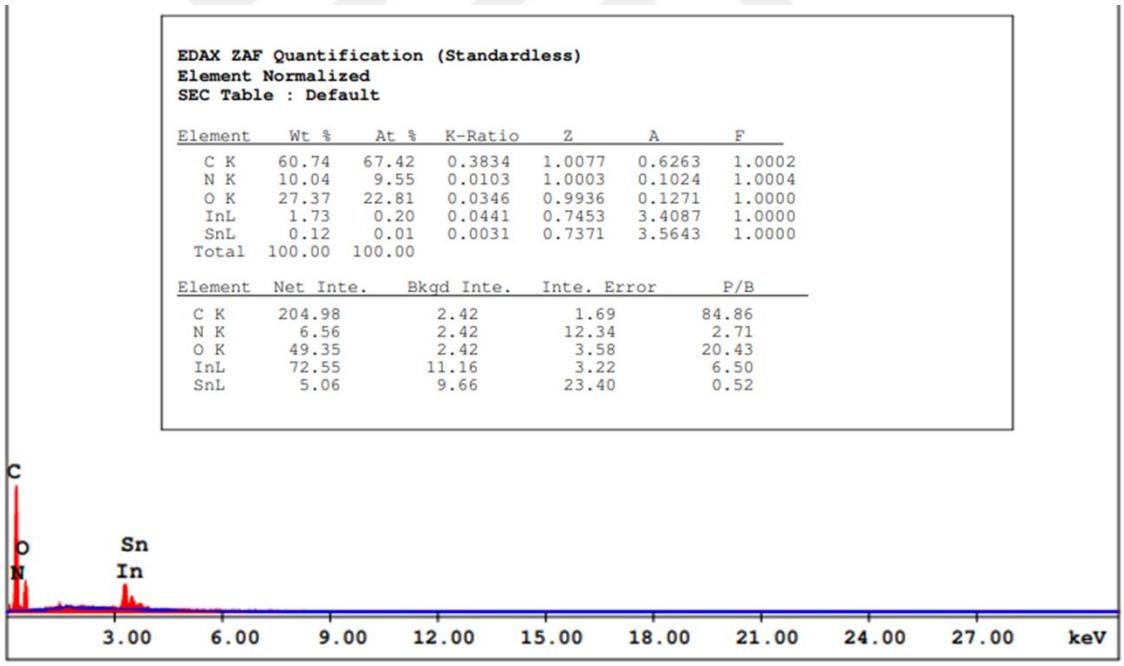
Şekil 4.33c2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH-TMOHES)



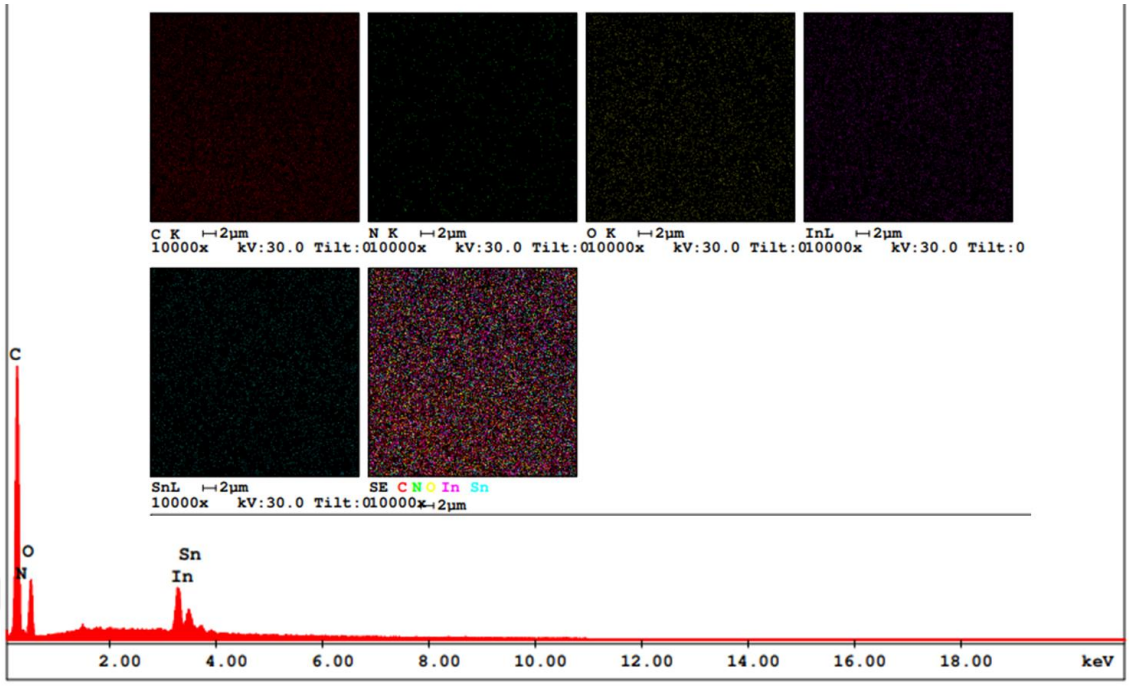
Şekil 4.33d1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3)



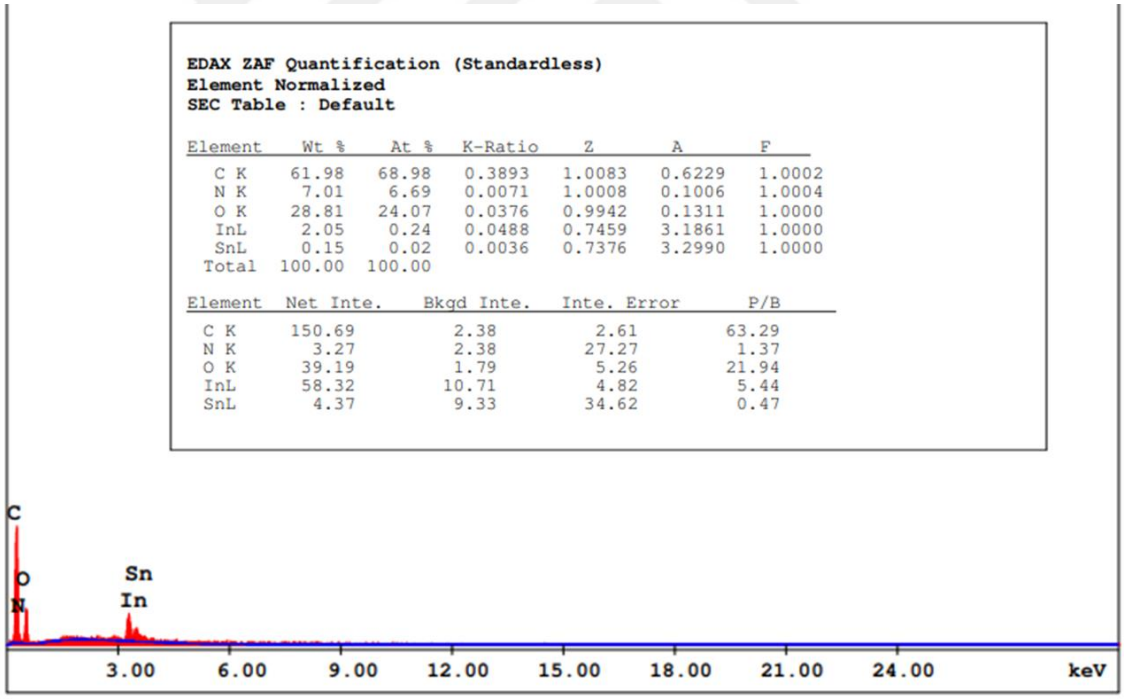
Şekil 4.33.d2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3)



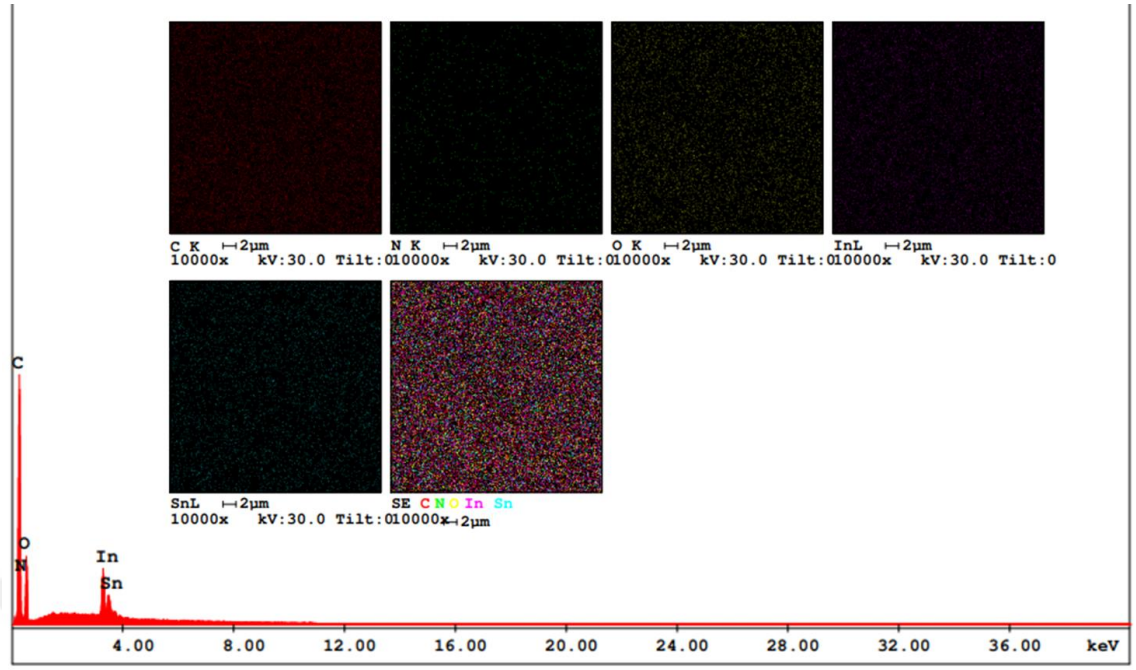
Şekil 4.33e1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA)



Şekil 4.33e2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA)



Şekil 4.33f1. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Nokta Alan spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA/Gal3)

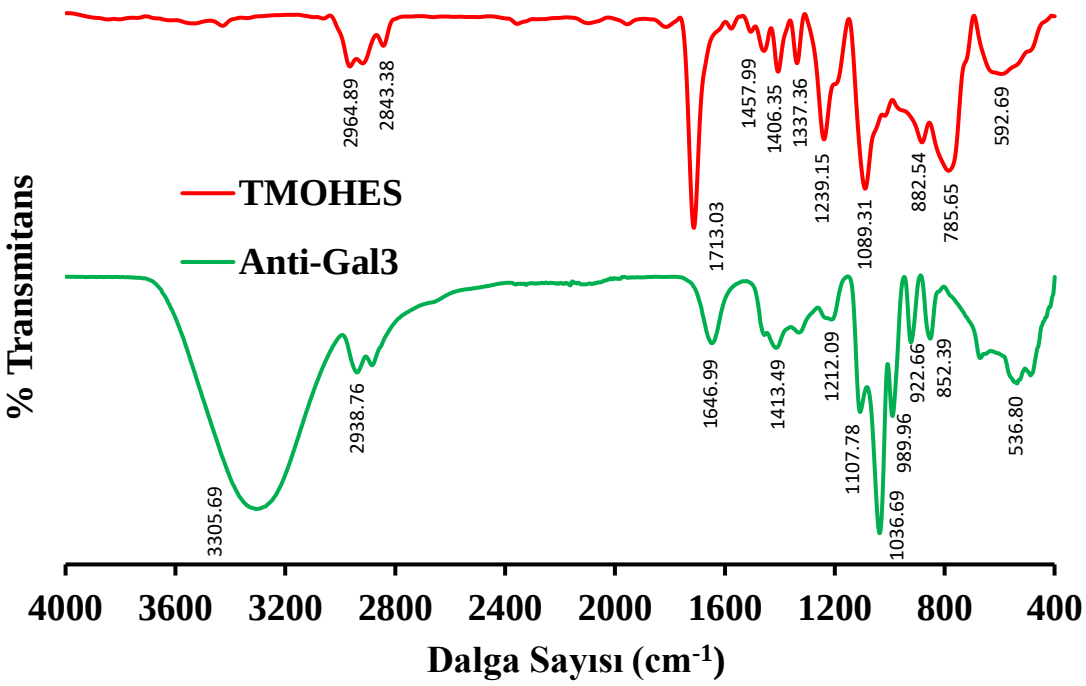


Şekil 4.33f2. Gal-3 Biyosensörü tasarım aşamalarının EDX Haritalama spektrumları (ITO-OH/TMOHES/Anti-Gal3/BSA/Gal3)

Gal-3 biyosensörünün tasarımında yüzey modifikasyonu öncesi yalın elektrot yüzeyi dahil tüm modifikasyon basamakları için alınan EDX Nokta Alan ve Haritalama Spektrumlarının sonuçları yüzeyde oluşması beklenen elementel farklılığı desteklemektedir. Şekil 4.33a1 ve Şekil 4.33a2'de verilen yalın ITO-PET elektrot spektrumlarındaki karbon, indiyum, kalay ve oksijen pikleri ve haritaları ITO (indiyum kalay oksit) yapısından gelen elementleri göstermektedir. Şekil 4.33b1 ve Şekil 4.33b2'de'de yalın elektrottan elde edilen spektrumlara kıyasla belirgin olmasa da yüzey hidroksillenmesinden kaynaklandığı düşünülen oksijen elementinin pikinde ve yüzdesinde hafif bir artış görülmektedir, artışın çok küçük olması elektrot yüzeyinin genişliğinden kaynaklanıyor olabilir. Şekil Şekil 4.33c1 ve Şekil 4.33c2'de spektrumlarda beliren silisyum elementini yine TMOHES molekülü immobilizasyonunu işaret etmektedir. Şekil 4.33d,e,f.1 ve Şekil 4.33d,e,f.2 spektrumlarında azot elementinin pikinin görülmesi yüzeydeki proteinlerin amin gruplarından ve immobilize olmuş Anti-Gal3 antikorunun modifiye yüzeydeki SAM tabakası ile yaptığı amid bağındaki azot atomlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.3.8.3. Gal-3 biyosensörünün fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) sonuçları

Üretilen Gal-3 biyosensörünün, yüzeyindeki kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların tanımlanmasında FTIR spektroskopisinden yararlanılmıştır. Biyosensör yüzeyine TMOHES immobilizasyonu sonrası alınan FTIR spektrumu (kırmızı renkli) ve Anti-Gal3 immobilizasyonu sonrası alınan FTIR spektrumu (yeşil renkli) Şekil 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.34. Gal-3 biyosensörünün TMOHES ve Anti-GAL3 immobilizasyonu sonrası FTIR sonucu

Şekil 4.34'de verilen TMOHES immobilizasyonu sonrası elde edilen spektrumda 1089, 882 ve 785 cm^{-1} de gelen piklerin TMOHES moleküllerinin epoksi uç gruplarından, Si-O-Si ve Si-O bağlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu veriler TMOHES molekülleri kullanılarak oluşturulan silan-SAM yapısını destekler niteliktedir. Şekilde silan-SAM tabakası ile kaplı biyosensör yüzeyine Anti-Gal3 antikorunun immobilizasyonu sonrası elde edilen spektrumda, TMOHES modifikasyonu sonrası alınan spektrumdaki piklerin kaybolduğu veya şiddetlerinin azaldığı görülmektedir. Bunun yanı sıra 3305 cm^{-1}'de gelen yüksek band bu bölgedeki amid bağı gerilmesine ait karakteristik piklere işaret etmektedir. 1646 cm^{-1}(amid I) ve 1413 cm^{-1}'deki (amid II)

piklerin de yine amid bağına ait karakteristik titreşim piklerine karşılık geldiği düşünülmektedir. Bu pikler Anti-Gal3 antikor proteinlerinin serbest amino grupları ile biyosensör yüzeyindeki TMOHES moleküllerinin epoksi uç grupları arasında amid bağları yaparak yüzeye başarıyla immobilize edildiğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca 2938 cm^{-1}'deki kamburlu pikin de antikor proteinindeki disülfit bağlarından ve sistein kalıntılarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

KVH'lar her yıl dünya genelinde milyonlarca insanın yaşam koşullarını olumsuz etkilemekte ve morbitide ile mortalitenin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir (Martin vd., 2024; Mensah vd., 2023; Roth vd., 2020). 1980'lerden günümüze çarpıcı bir şekilde artan KVH kaynaklı ölümler tüm dünyadaki ölümlerin üçte birinden sorumludur ve güncel yıllık verilerde 18 milyona yaklaşmıştır. Bu oran, her gün binlerce kişinin çoğunlukla önlenebilir nedenlerle hayatını kaybettiği anlamına gelmektedir. KVH riski ve hastalık yükü küresel ölçekte artış gösterirken, bu durum sağlık hizmetlerine erişimdeki dengesizlikleri ve yaşam beklentisi açısından eşitsizlikleri de derinleştirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (2019) verilerine göre en zengin ve en yoksul ülkeler arasında ortalama yaşam süresi beklentisi farkı 20 yıla yaklaşmıştır.

KVH'ların önlenmesi, erken teşhis edilmesi ve etkili bir şekilde yönetilmesi günümüzün en acil ve önemli küresel sağlık sorunlarından biri olarak görülmektedir (Krumholz vd., 2024). Bu denli yüksek ölüm oranına, küresel sağlık eşitsizliğine ve ekonomik yüke yol açan hastalıkların risk faktörlerinin belirlenmesi, erken teşhis edilmesi, hastalık yönetimi ve etkili tedavi stratejilerin geliştirilmesi ve toplum temelli önleme politikalarının şekillendirilmesi kritik bir öneme sahip olmaktadır ve bu yöndeki bilimsel ve teknolojik çalışmaları tetiklemektedir. Erken tanı, birçok durumda hastalığın ilerlemesini durdurmakla kalmaz; patolojik durumun hiç yaşanmadan, zararsız bir şekilde ya da minimum zararla önüne geçilmesini sağlayabilir. Bu bağlamda, KVH'ların erken teşhisi ve izlenim süreçleri için hızlı, invaziv olmayan, spesifik ve hassas tanı araçlarına duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır.

Biyosensörler, son yıllarda biyolojik belirteçlerin tespitinde düşük konsantrasyonlarda dahi gösterdikleri yüksek analitik performanslarıyla dikkat çeken analitik platformlar haline gelmişlerdir. Biyosensör teknolojisi, yüksek duyarlılık, kısa

hazırlık ve analiz süreleri, düşük maliyet gibi avantajlar sunarak, klinik uygulamalarda alternatif tanı araçları ya da hastalık yönetimi ve tanısında tamamlayıcı araçlar olarak değerlendirilmektedir. Elektrokimyasal biyosensörler örnek hazırlık kolaylığı, kısa analiz süreleri ile uzun süren ELISA testleri gibi klinik alanda yüksek kabul gören geleneksel analiz yöntemlerine göre önemli avantajlar sunarak öne çıkmaktadır. Özellikle elektrokimyasal immünosensörler minyatürize edilebilir ve taşınabilir şekilde tasarlanabilme potansiyeli ile saha uygulamalarına da olanak sağlayan biyosensörlerdir. Bu sistemler, hassas tayin yetenekleri ile, uygun yüzey modifikasyonlarla desteklenerek düşük konsantrasyonlarda (pg-fg/mL) analit tayin limitlerine ulaşabilirler ve tek bir platform üzerine farklı antikorların immobilizasyonuyla çoklu analit tayinine uygun şekilde tasarlanabilirler. Ayrıca bazı durumlarda yüzey rejenerasyonu yoluyla tekrar kullanılabilmeleri ve kompakt cihazlara entegre edilebilmeleri gibi avantajları bulunmaktadır (Chen vd., 2023c; Mollarasouli vd., 2019).

Seçiciliği yüksek biyomoleküllerin elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik transdüksiyon sistemleriyle entegrasyonu, biyosensörlerin verimliliğini ve doğruluğunu önemli ölçüde artırır. İmmünosensörler, kardiyak hasarın ya da doku stresinin erken evrelerde tespitinde, düşük konsantrasyonda salınan biyobelirteçlerin kompleks biyolojik örneklerde dahi hızlı, hassas ve yüksek doğrulukta tespitinde son derece etkilidir ve erken tanı için güçlü bir araç olmasını sağlar. Bu biyobelirteçlere yönelik immünosensörler, risk altındaki hastaların erken dönemde belirlenmesini ya da hastalık ilerlemesinin izlenmesini mümkün kılabilir.

KVH'lardan kaynaklı yüksek ölüm oranlarının yanı sıra, günümüzde yarım milyardan fazla kişi bu hastalıklarla yaşamını sürdürmektedir. Bu artışın nedenleri arasında KVH'ların gelişiminde belirleyici rol oynayan, hareketsiz yaşam, sağlıksız beslenme gibi günümüz yaşam koşulları ve bunların da etkisiyle kaçınılmaz hale gelen hipertansiyon, diyabet, obezite gibi geleneksel risk faktörlerine yaşam boyunca maruz kalma, popülasyonun ve yaşlanmanın artışı sayılabilir (İngiliz Kalp Vakfı, 2025). Kardiyovasküler hastalıklarla etkili mücadele, bireylerin risk düzeylerinin doğru şekilde belirlenmesine bağlı olup, kardiyovasküler riskin doğru sınıflandırılması, bu KVH'lar için önleyici stratejilerin hedefe yönelik ve etkili şekilde uygulanmasında temel bir gerekliliktir. Günümüzde bu stratejiler, öncelikle yaşam tarzı değişiklikleri ve geleneksel risk faktörlerinin kontrolü üzerine kuruludur. Ancak bazı bireylerde bu risk faktörlerinin

optimal şekilde kontrolüne rağmen KVH riski yüksek kalmaya devam etmekte, özellikle inflamasyonun katkısı ile ilerleyici klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir.

Kardiyovasküler risk faktörlerinin altında yatan en önemli sebeplerden biri kronik inflamasyondur. Kronik inflamasyon kardiyak dokuya zarar vererek özellikle kalp yetmezliği, ateroskleroz gibi KVH'ların gelişimine ve ilerlemesine neden olmaktadır. Ateroskleroz erken yaşlarda başlayabilen ve yıllarca sessizce ilerleyebilen bir hastalık olup, günümüzde yaygın şekilde inflamatuar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bilimsel gelişmeler inflamasyonun aterosklerozun başlangıcından ilerlemesine ve trombotik komplikasyonlarına kadar tüm aşamalarında aracılık ederek, temel bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Libby vd., 2002). Ateroskleroz, yalnızca bir lipid birikimi süreci değil, baştan sona kronik inflamasyonla karakterize edilen sistemik bir damar hastalığıdır. Bu süreçte inflamasyon, aterogenezin tüm aşamalarında -başlangıç lezyonlarından yağlı çizgilere, gelişmiş plaklara ve son evre komplikasyonlara (örneğin plak rüptürüne bağlı tromboemboliye) kadar- gözlemlenmektedir. Özellikle okside LDL partikülleri tarafından tetiklenen bu inflamatuar süreç, plak oluşumunun başlatılması, ilerletilmesi ve son olarak trombüs oluşumuna neden olan rüptür olayında belirleyici bir role sahiptir (Hansson, 2005; Libby vd., 2002).

KVH'larda inflamasyonun belirlenmesinde, hastalık teşhis ve takibinde inflamasyon biyobelirteçlerinden yararlanılabilmektedir. İnflamasyonun etkinliği tüm bu patofizyolojik süreçlerde daha iyi aydınlatıldıkça bu hastalıklar için inflamasyon biyobelirteçlerine duyulan ilgi de artmaktadır. Son çeyrek yüzyılda, aterosklerozun kronik, düşük seviyeli, steril inflamatuar bir süreç olarak yeniden tanımlanması; inflamasyon biyobelirteçlerinin KVH varlığının ve ilerleyişinin izlenmesinde daha yaygın kullanılmasına yol açmıştır. Özellikle CANTOS ve JUPITER gibi büyük ölçekli klinik çalışmalar, bu hipotezin güçlenmesini ve inflamasyona yönelik biyobelirteç temelli klinik yaklaşımların kalıcı hale gelmesini sağlamıştır. Bu bağlamda son yıllarda giderek daha fazla kabul gören bir kavram olan rezidüel inflamatuar risk, sistemik ve vasküler inflamasyonun ölçümlerle değerlendirilmesini ve bu sayede bireysel riskin daha hassas şekilde tanımlanmasını mümkün kılmaktadır. Bu kavram, yalnızca gelecekteki kardiyovasküler olayların öngörülmesini kolaylaştırmakla kalmaz; aynı zamanda inflamasyon temelli hedefe yönelik tedavi stratejilerinin de kapısını aralar. Rezidüel inflamatuar riskin belirlenmesinde en sık başvurulan yöntem, dolaşımdaki inflamasyon

biyobelirteçlerinin düzeylerinin ölçülmesidir (Antonopoulos vd., 2022). Bu biyobelirteçlerin ileri kardiyak görüntüleme teknikleri ile entegrasyonu ise özellikle kompleks vakalarda tanısal değeri artırmaktadır (Parhi vd., 2025).

Kronik inflamatuar hastalıkların aşırı artışına bağlı olarak etkili teşhis ve tedavi yöntemlerinin desteklenmesi, biyobelirteçlerin erken tespiti için etkili metodların geliştirilmesinin önünü açmıştır. Buna bağlı olarak yeni nesil inflamasyon biyobelirteçlerin keşfi ve bu biyobelirteçlerin klinikte kullanılabilmesi ve analitik platformlar geliştirilmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. GDF-15 ve Gal-3 özellikle KVH'lar için ilgi gören yeni inflamasyon biyobelirteçlerdendir.

Literatürde GDF-15'in kalp yetmezliği (KY), akut koroner sendrom (AKS) ve ateroskleroz gibi KVH'larda prognostik belirteç olarak değerlendirildiği; plazma seviyesindeki artışların özellikle yaşlanmaya bağlı kronik sistemik inflamasyon (inflammaging) sürecinde asemptomatik aterosklerozu gösterebileceği ifade edilmektedir (Abubakar, 2024). GDF-15'in ve Gal-3'ün çok yönlü fizyolojik etkileri bulunmaktadır. Örnegin GDF-15'in plak oluşumunu destekleyici işlevleri bulunurken bunun yanı sıra aşırı lökosit göçünü inhibe edici bir özelliğe sahip olduğu da önerilmektedir. Gal-3, FDA onaylı bir biyobelirteç olarak, klinik öngörü kabiliyeti nedeniyle hem tanısal hem de prognostik bir araç olarak dikkatleri çekmektedir. Gal-3 monosit/makrofaj göçünü arttırarak vasküler inflamasyonu tetiklemektedir. Makrofajlardan salgılandığı için plak büyümesini tetikler ve plağın instabilizasyonunu arttırır (He vd., 2023; Sano vd., 2000; Wang vd., 2017).

İnflamatuar biyobelirteçlerin klinik değerine yönelik bu artan ilgi, özellikle kalp yetmezliği gibi geniş spektrumlu klinik sendromlarda da önem kazanmıştır. Literatürde bu biyobelirteçlerin, hastalık şiddeti ve prognozu ile güçlü şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hartupee & Mann, 2013). Artmış Gal-3 seviyesi, özellikle miyokardiyal fibrozis, yeniden yapılanma, kalp yetmezliği gelişimi ve mortalite riski ile yakından ilişkilidir. GDF-15'in güçlü bir mortalite belirleyicisi olması gibi özellikleriyle diğer geleneksel inflamatuar biyobelirteçleri ile birlikte değerlendirilmesi, hastalık seyrinin daha hassas takibi ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından umut vadetmektedir. Ayrıca geleneksel risk faktörleriyle açıklanamayan durumlar için önemli bir tanısal boşluğu doldurabileceği ifade edilmektedir.

Bu doktora tezi kapsamında KVH'larda inflamasyonla ilişkili klinik önemi giderek artan yeni biyobelirteçler olan GDF-15 ve Gal-3'ün kantitatif analizi için iki adet elektrokimyasal impidimetrik temelli immünobiyosensör sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen GDF-15 ve Gal-3 biyosensörleri, analitlerinin geniş ve aynı zamanda uygun klinik çalışma aralığı ile örtüşen doğrusal tayin aralığında ve yüksek tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, düşük tayin limitleri (LOD) ile yüksek duyarlılık ve seçicilikte başarılı bir şekilde tayin edilebilirliğini kanıtlamıştır. Üretilen her iki biyosensörün analitik ölçüm performansı, optimum koşulları, analitik karakterizayonu EİS ve CV yöntemleri ile belirlendi. EİS, modifiye edilmiş iletken sensör yüzeylerinde immobilizasyon adımları boyunca yüzey modifikasyonlarının ve biyoafinite etkileşimlerinin izlenmesine ve etiket (label)-kullanmayan analizlerde impedimetrik transdüksiyon yöntemiyle analit tespitine olanak sağlar (Lisdat & Schäfer, 2008). CV, sensörlerin yüzey modifikasyonunun doğrulanmasında yüzey alanının belirlenmesi çalışmalarında ve sistemin genel redoks davranışının anlaşılmasında önemli bir araç olarak çoğunlukla biyosensörlerin nicel analizden ziyade genellikle kalitatif ve yarı-nicel amaçlarla kullanılır.

Biyosensörlerin yüzey karakterizasyonları SEM, EDX (Nokta alan/haritalama) ve FTIR analizleri ile desteklenerek başarılı yüzey modifikasyonları ve biyomolekül immobilizasyonları gerçekleştirildiği doğrulandı. GDF-15 biyosensörü karakterizasyonunda biyosensörünün CV ölçümleriyle yüzey alanı hesaplanarak antikor immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve SFI tekniğinden yararlanılarak immünokompleksin oluşumu doğrulandı. Bu ölçüm tekniği zamana bağlı olarak impedans ve faz açısındaki değişimin eş zamanlı izlenmesi ile antikor-antijenin etkileşimi kaynaklı bağlanmamın gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemeyi sağlar. Gal-3 biyosensörünün ise tek kullanımlık olarak tasarlanan çalışma elektrodu olan ITO/PET elektrotların rejenere edilerek tekrar tekrar (7 kez) kullanılabileceği, Gal-3 analit tayininin aynı koşullarda farklı bir araştırmacı tarafından gerçekleştirilip karşılaştırıldığında benzer ve tutarlı sonuçlar verdiği ve +4 °C'de aktivitesinde anlamlı bir kayıp olmayacak şekilde uzun süre (3 ay) depolanabileceği belirlendi.

Üretilen GDF-15 ve Gal-3 biyosensörlerinin her ikisi için de az adımlı ve basit ancak etkili modifikasyon stratejileri kullanılmıştır Farklı çalışma elektrotları kullanılarak üretilen biyosensörlerinde SAM-tabanlı yüzey modifikasyonlarından

yararlanılmıştır. Her iki biyosensörde özgün yüzey fonksiyonelleştirme stratejileri geliştirilerek kararlı SAM tabakaların oluşturulması sağlanmıştır. Her iki elektrot yüzeyi de öncelikle farklı hidroksilleme yöntemleri ile hidroksillenmiştir. Çalışma elektrodu olarak KAE kullanılan GDF-15 biyosensöründe hidroksillenme tiyol-bazlı SAM tabakalar üzerinden, ITO/PET elektrot kullanılan Gal-3 biyosensöründe yüzey hikroksillemesi ise kimyasal olarak gerçekleştirilmiştir. Hidroksillenen yüzeylerde ikinci ve son modifikasyon Silan-SAM tabakaların oluşturulması ile gerçekleştilmiştir. Bu amaçla her iki biyosensörde silanlayıcı molekül olarak aynı molekül, trimetoksi[2-(7-okzabisiklo[4.1.0]hept-3-il)etil]silan (TMOHES) kullanılmıştır.

GDF-15 biyosensörü fabrikasyonunda çalışma elektrodu olarak seçilen KAE'nin yüzey modifikasyonu tiyol bazlı ve silan bazlı iki ayrı SAM tabakanın kombinasyonu ile gerçektirilmiştir. Altın elektrot yüzeyinde önce 6-merkaptohekzanol (6-MHL) ile tiyol-SAM'ler oluşturulmuştur. 6-MHL ile oluşturulan tiyol-SAM'ler biyosensör yüzeyinde hidroksil (-OH) gruplarının açıkta kalmasını sağlamıştır. İkinci SAM tabaka TMOHES moleküllerinin baş kısmında bulunan metoksi gruplarının bu hidroksil gruplarıyla siloksan bağı yapmasıyla oluşturulmuştur. Biyosensörün üretimi, GDF-15 analit proteinini spesifik olarak tanıyan Anti-GDF15 antikorlarının biyosensör yüzeyinde bulunan silan-SAM tabakanın uç epoksi gruplarından doğrudan ve kovalent olarak immobilize edilmesiyle tamamlanmıştır.

Biyosensör cevabını ve duyarlılığını arttırmak amacıyla GDF-15 biyosensörünün üretim adımlarında tiyol-SAM tabakanın oluşmasında kullanılan 6-MHL konsantrasyonu, silan-SAM tabakanın oluşmasında kullanılan TMOHES çözeltisinin konsantrasyonu, biyolojik tanıma elemanı olan Anti-GDF15'in konsantrasyonu, Anti-GDF15 ve GDF-15 inkübasyon süreleri parametreleri optimize edilmiştir. Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum koşullar, GDF-15 analit proteinin GDF-15 biyosensörü ile kantitatif tayininde biyosensörün performansı, hassasiyeti ve tayinin güvenilirliğinde iyileştirme sağlamıştır.

GDF-15 biyosensör üretiminde katı altın elektrot ile immobilizasyon metodu optimize edildikten sonra minyaturize ve tek kullanımlık altın baskılı elektrotların kullanılması tez planlanması sürecinde hedeflenmişti. Ancak hem ticari olarak satın alınan altın SPGE'lerden, hem de 3D yazıcı ile fotopolimer kullanılarak basılan ve yüzeyi

altın kaplanmış çalışma elektrotları ile yapılan ön çalışmalardan istenen sonuçlar alınamayıp GDF-15 biyosensörü KAE ile geliştirilmiştir.

GDF-15 biyosensör üretimi için optimum koşulların belirlenmesinin ardından bu koşullarda hazırlanan biyosensörlerin doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, ticari olarak satılan insan serumunda analiz ve sabit frekansta impedans analizi yapılarak analitik karakterizasyonları ve yüzey karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu karakterizasyon çalışmaları ile geliştirilen GDF-15 biyosensörünün hassasiyeti, tekrarlanabilirliği, tekrar üretilebilirliği, seçiciliği ve insan serumunda uygulanarak pratik potansiyeli gibi özellikleri değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen doğrusal tayin aralığı çalışmasıyla GDF-15 biyosensörünün 250-1500 pg/mL konsantrasyon aralığında, kalibrasyon grafiği çizilerek elde edilen 0.998 gibi oldukça yüksek bir R^2 değeri ile ve en düşük analit konsantrasyonu ölçümlerinin standart sapmalarının ortalamasından hesaplanan 83 pg/mL tespit limiti (LOD) ile hassas ölçüm yapabildiği tespit edildi. Bu tayin aralığında farklı zamanlarda hazırlanan GDF-15 biyosensörlerinin GDF-15 analit konsantrasyonuna turatlı ve benzer cevaplar verdiği, çizilen doğru denklemlerinin yakınlığı ve R^2 değerlerinin benzer ve yüksek oluşu ile tekrar üretilebilir olduğu belirlendi. GDF-15 biyosensörünün ölçüm doğruluğu hedef analiti olan GDF-15'in sabit analit konsantrasyonlarında, GDF-15 biyosensörünün ölçüm sonucu hesaplanan sabit konsantrasyonlarının oldukça başarılı % geri kazanım performansına sahip oluşu, ölçülen konsantrasyonların uyumluluğu ve sapma değerlerinin kabul edilebilir düzeyde oluşuyla kanıtlandı. Biyotanıma elemanı olan Anti-GDF15'in diğer proteinlere afinitesi, ölçüme girişim yapabilecek başka biyomoleküllerin GDF-15 biyosensörü ile analizleri yapılarak değerlendirildiğinde, GDF-15 analit proteinin seçiciliğinin yüksek olduğu, biyosensörün GDF-15 analit proteinine verdiği cevaba kıyasla analiz edilen diğer biyomoleküllere verdiği cevabın ihmal edilebilir düzeyde düşük olduğu tespit edildi.

Üretilen biyosensörde en kritik karakterizasyon basamaklardan biri antikor immobilizasyonun etkili bir şekilde gerçekleştirildiğinin tespit edilmesidir ve antikor-antijen biyokompleksinin oluşumunun onaylanmasıdır. Bu amaçla GDF-15 biyosensörünün yüzeyindeki Anti-GDF15 antikoru ile GDF-15 analit proteini arasında oluşan antikor-antijen immünokompleksinin oluşumu SFI ölçüm tekniği ile antijen inkübasyon süresi boyunca kinetik olarak izlenerek impedansta görülen artış ve faz

açılarındaki azalma ile AntiGDF-15/GDF-15 immünokompleksinin oluşumu doğrulandı. SFI tekniği özellikle biyosensör sistemlerinde elektrot yüzey karakterizasyonu çalışmalarına oldukça önemli bir katkı sunmaktadır. Antijen-antikor etkileşiminde, ilk bağlanma hızla gerçekleşebilir ve ardından yüzeyde yavaşlayan bir doygunluk eğilimi görülebilir. Ancak, bağlanma kinetiği tam anlamıyla stabilize olmadan, yüzeye yeni antijenlerin ulaşmasıyla ikinci bir bağlanma dalgası oluşabilir. Bu, grafikte geçici bir doygunluk gibi görünebilir. Faz açısındaki azalma ise kapasitif etkilerin azalmasıyla sistemin daha dirençli hale geldiğini ifade ediyor olabilir. GDF-15 biyosensörünün yüzey alanı CV ile ölçülüp elde edilen veriler Laviron eşitliğinde yerine konularak 0.452735 mol/cm^2 olarak hesaplandı. Bu değer antikorun biyosensör yüzeyine immobilize edildiğini kanıtlamaktadır. GDF-15 biyosensörünün gerçek biyolojik örneklerde ölçüm potansiyelinin belirlenmesi için ticari olarak satın alınan insan serumunda hazırlanan GDF-15 analit proteini ile yapılan GDF-15 biyosensör analizlerinden de başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Gal-3 proteinine özgü geliştirilen Gal-3 biyosensörünün fabrikasyonunda çalışma elektrodu olarak ITO/PET elektrotlar kullanılmıştır. ITO/PET elektrotlar şeffaf, esnek ve düşük maliyetli yapıları ile tek kullanımlık biyosensör tasarımı için son derece uygundurlar. Ayrıca, elektrokimyasal ve yüzeysel modifikasyonlara elverişli olmaları, fonksiyonel biyotanıma katmanlarının immobilizasyonunu kolaylaştırarak güvenilir sinyal üretimini desteklemektedir. Gal-3 biyosensörünün üretim süreci ITO-PET elektrotların ölçüme uygun şekilde hazırlanması, temizliği, elektrot yüzeyinin hidroksillenmesi, silan-SAM oluşumu, antikor immobilizasyonu ve Anti-Gal3 immobilize edilemeyen açık epoksi uçların BSA ile kapatılması adımlarını içermektedir. Gal-3 biyosensör hazırlığında temizlenmiş ITO/PET elektrotlar önce kimyasal yöntemle hidroksillendirilerek elektrot yüzeyinde aktif hidroksil gruplarının oluşması sağlanmıştır. Bu aktif hidroksil grupları üzerine TMOHES moleküllerinin silan kimyası ile oda sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta (37.5 ℃'de) düzenli SAM tabakaları oluşturulmuştur. Silanlayıcı olarak baş kısmında üç adet metoksi grubu ve uç kısmında epoksi halkası bulunduran, (TMOHES) molekülü kullanılarak oluşturulan silan-SAM'ler ile fonksiyonelleştirilen elektrot yüzeylerine Anti-Gal3 molekülü immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Gal-3 biyosensörü üretim adımlarında silan-SAM tabakanın oluşmasında kullanılan TMOHES çözeltisinin konsantrasyonu, Anti-Gal-3 konsantrasyonu, antikor ve analit proteini inkübasyon süreleri optimize edilerek biyosensör cevabının ve hassasiyetinin iyileştirilmesi sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarının ardından biyosensör yüzey modifikasyon adımlarının etkinliği ve biyosensörün ölçüm başarısı doğrusal tayin aralığı, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik, insan serumunda uygulanabilirlik, depolama süresinin tayini gibi analitik karakterizasyon özellikleri ve bunların yanı sıra; SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleme, EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi-Nokta ve Alan Haritalama), ve FTIR analizleri gibi yüzey karakterizasyon özellikleri ile doğrulandı.

Bu tez kapsamında üretilen Gal-3 biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 2.5-40 ng/mL olarak belirlendi. Biyosensörün bu konsantrasyon aralığında $R^2 = 0.9996$ değeri ile oldukça yüksek bir doğrusallıkta ve hesaplanan LOD değeri 0.730483 ng/mL ve LOQ değeri 2.43 ng/mL ile, belirlenen tayin aralığında Gal-3 tayinini hassas ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirebildiği gösterilmiştir. Aynı üretim prosesi ile farklı zamanlarda hazırlanan 10 adet biyosensör ile biyosensörün tekrar üretilebilirliği değerlendirildiğinde elde edilen standart grafiklerin aynı grafikte verildiğinde üst üste gelerek neredeyse birebir çakıştığı, doğru denklemlerinin uyumlu olduğu, R^2 değerlerinin yüksek, 0.9992-0.9986 aralığında öbeklenen benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Elde edilen benzer sonuçlar Gal-3 biyosensörünün üretiminin ve optimizasyonlarının başarısını doğrulayarak, tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Dört farklı sabit Gal-3 konsantrasyonunda yapılan biyosensör analizleri ile biyosensörün tekrarlanabilirliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla ölçülen dört konsantrasyon için de hesaplanan ölçüm ortalamaları, sabit konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında sonuçların birbirine benzer, geri kazanım yüzdelerinin yüksek ve uygun, standart ve relatif sapmaların düşük ve kabul edilir aralıkta olduğu görülmektedir. Böylece Gal-3 biyosensörünün ölçüm başarısı tekrarlanabilirlik sonuçlarıyla pekiştirilmiştir. Anti-Gal3 biyoreseptörün Gal-3 analit proteini dışındaki ölçüme girişim yapabilecek potansiyel biyomoleküllerin Gal-3 biyosensör analizleri yapılarak, Gal-3 analit proteinine verdiği yanıtları ile karşılaştırıldığında diğer biyomoleküllere verdiği cevabın ihmal edilebilir olduğu belirlenerek Gal-3'e spesifikliğinin yüksek olduğu kanıtlanmıştır.

Gal-3 biyosensörünün tüm üretim aşamaları için yüzey morfolojisi yüksek çözünürlüklü SEM görüntüleri alınarak incelendiğinde, anti-Gal3 ve BSA immobilizasyonu sonucunda görüntülerde fark edilebilir bir değişim olduğu görülmektedir. Görülen bu değişim antikor proteininin biyosensör yüzeyine etkili bir şekilde bağlandığını, silan-SAM tabakanın antikorlarca bağlanmadan kalan olası açık epoksi uçlarının ise BSA moleküllerince kapatılabildiğini doğrulamayı sağlamaktadır.

Bu tez kapsamındaki geliştirilen GDF-15 ve Gal-3 biyosensörleri, yüzey modifikasyonları ve sistem performansı açısından Bölüm 2.5'te incelenen mevcut literatürdeki GDF-15 ve Gal-3 biyosensör çalışmaları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Üretilen GDF-15 biyosensörürün literatürde bulunan GDF-15 biyosensörleri ile karşılaştırması Çizelge 5.1'de ve Gal-3 biyosensörürün literatürde bulunan Gal-3 biyosensörleri ile karşılaştırılması ise Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.1'de karşılaştırıldığı üzere GDF-15 biyobelirtecine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri yakın tarihli çalışmalardan oluşmakta ve henüz erken gelişim aşamasındadır. Bu çalışmalar çoğunlukla elektrokimyasal immünosensör prensibine dayalı ve genellikle sandviç tipi olup sinyal amplifikasyonuna odaklanmaktadır. Biyosensör duyarlılığını artırmak amacıyla çoğu sistemde nanoyapılar (örn. MoS_2 tabanlı nanodendritler, altın nanoparçacıklar, ZnGa2O4 türevleri) ve/veya enzim etiketleme (HRP, streptavidin-HRP gibi) gibi sinyal artırıcı unsurlardan yararlanılmıştır.

Chen vd. (2023c), MoS_2-AuPtCu hekzagonal nanoçerçeveler ile geliştirdiği sistemde geniş bir tayin aralığı ve 0.212 pg/mL gibi oldukça düşük bir LOD değeri raporlamıştır. Benzer şekilde optik tabanlı QDs-P16K@FLISA sistemi 0.98 pg/mL gibi başarılı bir tespit limiti sunmuştur. Bu sistemin klinik serum örnekleri ile yapılan karşılaştırmalarında, ELISA ile uyumlu olduğu belirtilmiştir (Chen vd., 2025). Doğrusal tayin aralığı bu tez kapsamında geliştirdiğimiz GDF-15 biyosensörü ile uyumludur.

Geliştirilen bu sistemler geniş tayin aralığı ve düşük tespit limitleri sunsa da işaretleme gibi ek adımlar ve/veya nanomalzemelerle güçlendirilmiş kompleks yüzey modifikasyonları gerektirmeleri nedeniyle üretim süreçleri karmaşık ve daha maliyetlidir.

Bu tezde geliştirilen GDF-15 biyosensörlerinde kullanılan immobilizasyon stratejileri, çok adımlı ve karmaşık modifikasyonlar ve etiketleme olmaksızın üretimlerini

mümkün kılmıştır. Geliştirdiğimiz GDF-15 biyosensörleri yüzey fonksiyonelleştirmesini daha basit ve hazırlaması kolay hale getirerek avantaj sağlamaktadır.

Literatürde etiketli elektrokimyasal biyosensörlerin dışında KVH'ların erken tespitinde GDF-15 biyobelirtecinin analizi için etiketsiz bir immünosensör AuPtCu-SWCNTs@MoS_2-rGO ile üç boyutlu bir nanokompozit elektrot platformu Jiao vd. (2022) tarafından geliştirilmiştir. Bu immünosensör 0.825 pg/mL gibi düşük bir LOD değeri sunmuş olsa da sistemin üretim sürecinde karmaşık nanokompozit yapıların hazırlanması ve 3D yapıların entegrasyonu gerekliliği söz konusudur.

KVH dışında, glokom (Gao vd., 2023), kolorektal kanser (Tejerina-Miranda vd., 2024) gibi farklı odaklara sahip GDF-15 biyosensörleri de literatürde yer almaktadır; ancak bu sistemler kardiyovasküler hastalıklar için optimize edilmemiştir.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen elektrokimyasal GDF-15 immünosensörü, etiketsiz yapısı, özgün yüzey kimyası ve sade üretim süreci ile literatürdeki kompleks, işaretli ve nanoyapı temelli sistemlere pratik bir alternatif sunmaktadır. Geliştirdiğimiz GDF-15 biyosensörü tayin aralığı (125-1500 pg/mL) ELISA testleri tayin aralıkları ile ve literatürde verilen KVH'larda dolaşımdaki GDF-15 seviyeleri ile uyumludur. Biyosensörün düşük tayin limiti ve yüksek regresyon katsayısıyla GDF-15 analit proteininin yüksek doğruluk ve hassas bir şekilde tayin edilebildiğini göstermektedir.

Çizelge 5.1. Literatürde bulunan GDF-15 biyosensörleri ile karşılaştırma

Biyosensör tipi	**Elektrot**	**Yüzey Modifikasyonu**	**Biyoreseptör**	**Ölçüm Tekniği**	**Lineer Aralık**	**LOD**	**Referans**
Sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör	Camsı karbon elektrot (GCE)	GDY-Au TNPs MoS2-AuPtCu HNF	Ab1, Ab2	EIS, CV, Chronoamperometri	500 fg/mL – 50 ng/mL	0.212 pg/mL	(Chen vd., 2023c)
Sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör	GCE	NG/AuNPs MoS2/AuPtPd	Ab1, Ab2	EIS, CV	1.5 pg/mL -1.5 µg/mL	0.9 pg/mL	(Chen vd., 2022)
Elektrokimyasal immünosensör	GCE	PANI/Pd NPs@ ZnGa2O4/Au NPs	Ab1 (anti-GDF15), Ab2	EIS, CV, Chronoamperometri	100 fg/mL-10 ng/mL	42.23 fg/mL	(Chen vd., 2023a)
Optik immünobiyosensör	Fluoresan tabanlı mikrotitre plaka	CdTe QDs-P16K	Anti-GDF15	FLISA (Spektroflourometrik)	6 pg/mL-1.600 pg/mL	0.98 pg/mL	(Chen vd., 2025)
Optik Aptasensör	Fiber optik uçlar	APT2TM HRP-APT2TM	HRP-APT2TM aptamer	BLI-ELASA (Spektrofotometrik)	10 pg/mL-810 pg/mL	5–6 pg/mL	(Gao vd., 2023)
Elektrokimyasal immünosensör		AuPtCu-SWCNTs@MoS2-rGO			1 pg/mL-50 ng/mL	0.825 pg/mL	(Jiao vd., 2022)
Sandviç tipi immünosensör	Ticari ELISA kiti			ELISA (Spektrofotometrik)	50 pg/mL-1.6 ng/mL	10 pg/mL	MLBIO
Elektrokimyasal immünosensör	KAE	6-MHL+ TMOHES	Anti-GDF15	EIS, CV	125pg/mL – 1500pg/mL	83 pg/mL(LOD), 254.2 pg/mL (LOQ)	Bu çalışma

Çizelge 5.2. Literatürde bulunan Gal-3 biyosensörleri ile karşılaştırma

Biyosensör tipi	**Elektrot**	**Yüzey Modifikasyonu**	**Biyoreseptör**	**Ölçüm Tekniği**	**Lineer Aralık**	**LOD**	**Referans**
Elektrokimyasal immünosensör	GCE	N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs	Anti-Gal3 Ab1 (primer) + Anti-Gal-3 Ab2 (sekonder)	Amperometri	100 fg/mL–50 ng/mL	33.33 fg/mL	(Tang vd., 2018)
Optik biyosensör	Altın çip	Au/MPS/ (PDDA/GO)n/3ABA	Anti-Gal3	SPR	10 ng/mL-50 ng/mL	2 ng/mL	(Primo vd., 2018)
Elektrokimyasal Biyosensör	SiO2 molibden elektrot	d-(+)-galaktoz-SWCNT'ler	d-(+)-galaktoz-SWCNT'ler	Elektrokimyasal	0.0156 µg/100 µL–0.03125 µg/100 µL		(Park vd., 2011)
Floresans sensörü		NBD ile işaretlenmiş α-helikal peptitler	NBD ile işaretlenmiş α-helikal peptitler	Çözeltide floresans ölçümü Görsel Tayin			(Hashimoto vd., 2021)
Elektrokimyasal Biyosensör	C-SPE	2-aminofenol/Gal-3 (elektropolimerizasyon)	Moleküler imprinting polimer	EIS, CV	0.5 ng/ mL-500 ng/ mL		(Cerqueira vd., 2021)
Elektrokimyasal immünosensör	Au-Kağıt elektrot	EDC/NHS	Anti-Gal3		0.5ng/mL-8ng/mL	0.5 ng/mL (LOQ)	(Nihal vd., 2024)
Elektrokimyasal immünosensör	ITO/PET	TMOHES	Anti-Gal-3	EIS, CV	2.5 ng/mL-40 ng/mL	0.73 ng/ mL (LOD), 2.43 ng/ mL (LOQ)	Bu çalışma

Çizelge 5.2'de literatürde bulunan Gal-3 biyosensörleri verilmiştir. Geliştirilen yeni nesil biyosensör platformları, sadece serum örneklerinde değil, tükürük gibi alternatif biyolojik sıvılarda da tanı kolaylığı sağlamaktadır. Tabloda verilen Hashimoto vd. (2021) ve Nihal vd. (2024) tarafından geliştirilen biyosensörler tükürükte, diğer biyosensörler plazmada Gal-3 tayini için tasarlanmıştır. Cerqueira vd. (2021) tarafından geliştirilen Gal-3 biyosensörü KVH için değil melanoma tanısında kullanılma amacı taşımaktadır. Bu nedenle tayin aralığı bu hastalığın klinik değerini karşılamak amacıyla daha geniş tutulmuş olabilir. Aynı şekilde Park vd. (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada galaktozun Gal-3'ün karbonhidrat tanıma bölgesine seçiciliğinden yararlanılmış ve Gal-3 bir kanser biyobelirteci olarak ele alınmıştır. Çizelgede bu tez kapsamında geliştirilen biyosensör dışında Gal-3'ün KVH'lara yönelik kanda Gal-3 analizi için verilmiş iki adet biyosensör bulunmaktadır. Bunlardan çizelgenin ilk satırında verilen Tang vd. (2018)'nin gerçekleştirdiği sandviç tipi immünosensör yüksek duyarlılık ve geniş tayin aralığı ile dikkat çekmektedir. Ancak bu çalışma çok adımlı ve detaylı yüzey modifikasyonlarına sahiptir, sandviç tipi immünoassayler olarak ikinci bir antikora ya da işaretli bir moleküle ihtiyaç duymaktadır. Çalışmanın detayı Bölüm 2.5.2'de verilmiştir. Primo vd. (2018) tarafından KVH hastalıklara yönelik hazırlanan SPR temelli Gal-3 immünobiyosensörünün, bu tez ile hazırlanan Gal-3 biyosensörü ile karşılaştırıldığında yüzey modifikasyonları daha fazla adım içermekte olup, 3 katı kadar yüksek bir LOD değeriyle tayin limitinin daha kısıtlı ve doğrusal tayin aralığının da daha dar olduğu görülmektedir.

Bu tez kapsamında geliştirilen Gal-3 biyosensörleri ise, hidroksilasyon ve silanizasyon immobilizasyon adımını içeren basit bir imalat yöntemi ile üretilmiştir. Böylece biyosensör fabrikasyonunda kullanılan immobilizasyon stratejileri çok adımlı ve karmaşık modifikasyonlar ve etiketleme olmaksızın üretimlerini mümkün kılmıştır. Üretilen biyosensörler, herhangi bir Gal-3 biyobelirteç proteinlerini başarıyla tespit edebilmiştir. Gal-3 analit proteinin geliştirdiğimiz Gal-3 biyosensörü ile kantitatif tayininde düşük LOD ve LOQ değerleri biyosensörün performansının, hassasiyeti ve tayinin güvenilirliğinin yüksek ve 2.5 ng/mL-40 ng/mL konsantrasyon aralığında tayin aralığının klinik kullanıma uygun bir aralık olduğunu göstermektedir.

Silan-SAM'ler ile modifiye edilen elektrot yüzeylerinde analitlerin spesifik antikorlarının başarılı bir şekilde immobilize edilmesi sağlanmıştır. Biyosensör

yüzeylerinde Silan-SAM tabaka oluşturmak için kullanılan TMOHES molekülünün baş kısmındaki üç adet metoksi grubu yüzeylerde oluşturulan açık hidroksil gruplarından biyosensör yüzeyine immobilizasyonu ve SAM tabaka oluşumunu, uç epoksi grupları ise her iki biyosensörün biyoalgılayıcı molekülleri olan spesifik antikorlarını başka bir ara basamağa gerek kalmadan, oluşturulan silan SAM tabakaların üzerine doğrudan ve kovalent olarak immobilize edilmesini sağlar. Bu yaklaşım tasarım adımlarını kolaylaştırırken, yönelimli ve etkin immobilizasyona olanak tanıyarak antikorun biyolojik aktivitesinin korunmasını destekler ve etiketsiz tayin sağlar. Bunun yanı sıra tasarlanan immünosensörlerin güvenilir, etkin ve maliyet açısından daha avantajlı hale gelmesini sağlar.

Elektrot materyalinin yapısı ve uygulanan yüzey fonksiyonelleştirme yaklaşımı, biyosensörün genel performansını doğrudan etkileyen temel parametrelerdendir. Bu tezde kullanılan altın ve ITO/PET elektrotlara uygulanan modifikasyonlar, literatürde önerilen etkin stratejilerle uyumlu olup, antijen-antikor etkileşiminin yüksek verimlilikle gerçekleşmesini mümkün kılmıştır. ITO elektrotlarda üretilen Gal-3 biyosensörü, tek kullanımlık, maliyet etkin yapısı, rejenere edilebilirliği ile biyosensör tasarım ve kullanım maliyetini daha da aşağıya çekmesi, uzun depolama süresince etkinliğini koruması, farklı kullanıcılar arasında tutarlı sonuçlar vermesi gibi özellikleriyle öne çıkmaktadır.

Sonuç olarak, bu doktora tezi çalışmasında geliştirilen biyosensörler KVH'larda inflamasyonla ilişkilendirilen iki yeni önemli biyobelirteç olan GDF-15 ve Gal-3'ün kantitatif analizini klinik çalışma aralığına uygun olarak ve geniş bir doğrusal tayin aralığında, yüksek tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, duyarlılık ve seçicilik ile ve düşük tayin limitleri (LOD) ile başarılı bir şekilde gerçekleştirdiğini kanıtlanmıştır.

Geliştirilen biyosensörler özellikle kalp yetmezliği ve akut koroner sendrom gibi durumların erken tanısı, prognozun belirlenmesi ve tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanılabilecek potansiyele sahiptir. Ancak bu sistemlerin klinik geçerlilik kazanabilmesi için, sensörlerin stabilite, tekrar üretilebilirlik, biyouyumluluk ve klinik doğruluk açısından geniş çaplı validasyon çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca yapay zeka destekli veri analiz sistemlerinin, sensörlerden gelen verilerin yorumlanmasında entegre edilmesi, klinik karar destek sistemlerini güçlendirecektir.

Ayrıca bu platformların taşınabilir hale getirilmesi, evde takip sistemlerine entegre edilmesi ve çoklu biyobelirteç ölçüm kapasitesiyle (örneğin GDF-15 + NT-proBNP vb.) kombine panel kullanımı, kardiyovasküler hastalıkların erken tanı ve prognozunda çığır açabilecek potansiyele sahiptir (Miftode vd., 2022).

GDF-15 ve Gal-3 biyosensörünün geliştirilmesinin nihai hedefi, gerçek biyolojik örneklerde analit miktarlarının yüksek hassasiyetle belirlenmesi ve bu analizin klinik uygulamalarda yer bulmasıdır. Klasik bir tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan analit proteini ile yapılan bir analize göre insan serumu içerisinde hazırlanan analit proteinin analizinin bazı avantajları vardır. İnsan serumu daha gerçekçi bir matris olduğundan gerçek biyolojik örneklerle yapılacak analizlere daha benzer bir ortam sağlar.

Bundan sonraki çalışmalarda, ticari serum örneklerinde başarılı sonuçlar vermiş olan bu biyosensörlerin gerçek klinik örneklerin analizinde denemeleri yapılarak klinik potansiyeli değerlendirilebilir. Bu biyosensörlerin endüstriyel üretimleri için gelecekteki çalışmalarda öncelikle minyatürizasyon ve standardizasyon süreçleri gerekecektir. ITO elektrotların minyatürizasyon potansiyeli ve düşük maliyeti, gelecekte hasta başında test yapabilecek biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi için umut verici bir aday olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

5VT2-RCSB PDB. (2017, Kasım 1). *Crystal structure of growth differentiation factor*. RCSB PDB. https://doi.org/10.2210/pdb5vt2/pdb

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2024). *Basic immunology : functions and disorders of the immune system* (C. 7). Elsevier Inc.

Abubakar, M., Irfan, U., Abdelkhalek, A., Javed, I., Khokhar, M. I., Shakil, F., Raza, S., Salim, S. S., Altaf, M. M., Habib, R., Ahmed, S., & Ahmed, F. (2024). Comprehensive Quality Analysis of Conventional and Novel Biomarkers in Diagnosing and Predicting Prognosis of Coronary Artery Disease, Acute Coronary Syndrome, and Heart Failure, a Comprehensive Literature Review. *Journal of Cardiovascular Translational Research 2024 17:6*, *17*(6), 1258-1285. https://doi.org/10.1007/S12265-024-10540-8

Adela, R., & Banerjee, S. K. (2015). GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *Journal of Diabetes Research*, *2015*, 490842. https://doi.org/10.1155/2015/490842

Aizawa, M. (1994). Immunosensors for Clinical Analysis. *Advances in Clinical Chemistry*, *31*(C), 247-275. https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60337-6

Akin, M., Yuksel, M., Geyik, C., Odaci, D., Bluma, A., Höpfner, T., Beutel, S., Scheper, T., & Timur, S. (2010). Alcohol biosensing by polyamidoamine (PAMAM)/cysteamine/alcohol oxidase-modified gold electrode. *Biotechnology Progress*, *26*(3), 896-906. https://doi.org/10.1002/BTPR.372

Alderton, G., & Scanlon, S. T. (2021). Inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, *374*(6571), 1068-1069. https://doi.org/https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABN1721

Alfaddagh, A., Martin, S. S., Leucker, T. M., Michos, E. D., Blaha, M. J., Lowenstein, C. J., Jones, S. R., & Toth, P. P. (2020). Inflammation and

cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics. *American Journal of Preventive Cardiology*, *4*, 100130. https://doi.org/10.1016/J.AJPC.2020.100130

Alharthi, S. D., Bijukumar, D., Prasad, S., Khan, A. M., & Mathew, M. T. (2021). Evolution in Biosensors for Cancers Biomarkers Detection: A Review. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion 2021 7:2*, *7*(2), 1-17. https://doi.org/10.1007/S40735-020-00463-7

Altay, D. N., Yagar, H., & Ozcan, H. M. (2023). A new ITO-based Aβ42 biosensor for early detection of Alzheimer's disease. *Bioelectrochemistry*, *153*, 108501. https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2023.108501

Amitava Banerjee, & Kaleab Asrress. (2018). Prevention of cardiovascular disease. Içinde Patrick Davey & David Sprigings (Ed.), *Diagnosis and Treatment in Internal Medicine* (online, ss. 1172-1175). Oxford Academic. https://doi.org/10.1093/med/9780199568741.003.0343

Antonelli, M., & Kushner, I. (2017). It's time to redefine inflammation. *FASEB Journal*, *31*(5), 1787-1791. https://doi.org/10.1096/FJ.201601326R

Antonopoulos, A. S., Angelopoulos, A., Papanikolaou, P., Simantiris, S., Oikonomou, E. K., Vamvakaris, K., Koumpoura, A., Farmaki, M., Trivella, M., Vlachopoulos, C., Tsioufis, K., Antoniades, C., & Tousoulis, D. (2022). Biomarkers of Vascular Inflammation for Cardiovascular Risk Prognostication: A Meta-Analysis. *JACC: Cardiovascular Imaging*, *15*(3), 460-471. https://doi.org/10.1016

Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., Himmelfarb, C. D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J. W., Michos, E. D., Miedema, M. D., Muñoz, D., Smith, S. C., Virani, S. S., Williams, K. A., Yeboah, J., & Ziaeian, B. (2019). 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, *140*(11), e563-e595. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000677

Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., Peck, C. C., Schooley, R. T., Spilker, B. A., Woodcock, J., & Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *69*(3), 89-95. https://doi.org/10.1067/MCP.2001.113989

Aydın, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2017). Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 309-315. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.09.021

Aydin, E. B., Aydin, M., & Sezgintürk, M. K. (2019). Advances in electrochemical immunosensors. Içinde *Advances in Clinical Chemistry* (C. 92, ss. 1-57). Elsevier. https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2019.04.006

Badillo-Ramírez, I., Carreón, Y. J. P., Rodríguez-Almazán, C., Medina-Durán, C. M., Islas, S. R., & Saniger, J. M. (2022). Graphene-Based Biosensors for Molecular Chronic Inflammatory Disease Biomarker Detection. *Biosensors 2022, Vol. 12, Page 244*, *12*(4), 244. https://doi.org/10.3390/BIOS12040244

Baek, S. J., & Eling, T. (2019). Growth differentiation factor 15 (GDF15): A survival protein with therapeutic potential in metabolic diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, *198*, 46-58. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.02.008

Bard, A. J., Faulkner, L. R., & White, H. S. (2022). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.* (3. bs). John Wiley & Sons Ltd. https://www.wiley.com/go/BardElectrochemical3e

Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N. W., Cummings, R. D., Drickamer, K., Felzi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. ichi, Leffler, H., Liu, F. T., Lotan, R., Mercurio, A. M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P. W. J., … Wang, J. L. (1994a). Galectins: A family of animal β-galactoside-binding lectins. *Cell*, *76*(4), 597-598. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7

Barondes, S. H., Cooper, D. N. W., Gitt, M. A., & Leffler, H. (1994b). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of*

Biological Chemistry, *269*(33), 20807-20810. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31891-4

Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 413-420. https://doi.org/10.1172/JCI34431

Bauskin, A. R., Zhang, H. P., Fairlie, W. D., He, X. Y., Russell, P. K., Moore, A. G., Brown, D. A., Stanley, K. K., & Breit, S. N. (2000). The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *The EMBO journal*, *19*(10), 2212-2220. https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.10.2212

Beasley, C. (2015). Introduction to Electrochemical Impedance Spectroscopy Gamry Instruments. *2015*.

Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E., & Sturmberg, J. P. (2018). Inflammation–Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases. *Frontiers in Medicine*, *5*(NOV), 316. https://doi.org/10.3389/FMED.2018.00316

Bhagat, A., Shrestha, P., & Kleinerman, E. S. (2022). The Innate Immune System in Cardiovascular Diseases and Its Role in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(23). https://doi.org/10.3390/ijms232314649

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1. https://doi.org/10.1042/EBC20150001

Bhatia, D., Paul, S., Acharjee, T., & Ramachairy, S. S. (2024). Biosensors and their widespread impact on human health. *Sensors International*, *5*, 100257. https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2023.100257

Bio-techne. (t.y.). *GDF-15 Products: R&D Systems*. Geliş tarihi 27 Mayıs 2025, gönderen https://www.rndsystems.com/target/gdf-15?category=ELISAs

Blanda, V., Bracale, U. M., Di Taranto, M. D., & Fortunato, G. (2020). Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 9232*, *21*(23), 9232. https://doi.org/10.3390/IJMS21239232

Bootcov, M. R., Bauskin, A. R., Valenzuela, S. M., Moore, A. G., Bansal, M., He, X. Y., Zhang, H. P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., Walsh, B. J., Nicholson, R. C., Fairlie, W. D., Por, S. B., Robbins, J. M., & Breit, S. N. (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-β superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(21), 11514-11519. https://doi.org/10.1073/PNAS.94.21.11514

Boyalla, V., Gallego-Colon, E., & Spartalis, M. (2023). Immunity and inflammation in cardiovascular disorders. *BMC Cardiovascular Disorders*, *23*(1), 148. https://doi.org/10.1186/S12872-023-03185-Z

Böttner, M., Suter-Crazzolara, C., Schober, A., & Unsicker, K. (1999). Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell and tissue research*, *297*(1), 103-110. https://doi.org/10.1007/S004410051337

Braga, T. T., Agudelo, J. S. H., & Camara, N. O. S. (2015). Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Frontiers in Immunology*, *6*(NOV), 165269. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00602/BIBTEX

Braunwald, E. (2008). Biomarkers in Heart Failure. *New England Journal of Medicine*, *358*(20). https://doi.org/10.1056/NEJMRA0800239

Brusini, R., Varna, M., & Couvreur, P. (2020). *Advanced nanomedicines for the treatment of inflammatory diseases*. https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.010

Carvalhal, R. F., Freire, R. S., & Kubota, L. T. (2005). Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. *Electroanalysis*, *17*(14), 1251-1259. https://doi.org/10.1002/ELAN.200403224

Cavaillon, J.-M. (2011). The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *Journal of Leukocyte Biology*, *90*(3), 413-424. https://doi.org/10.1189/JLB.0211094

Cerqueira, S. M. V., Fernandes, R., Moreira, F. T. C., & Sales, M. G. F. (2021). Development of an electrochemical biosensor for Galectin-3 detection in point-of-care. *Microchemical Journal*, *164*, 105992. https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.105992

Cesaro, A., Acerbo, V., Indolfi, C., Filardi, P. P., & Calabrò, P. (2024). The clinical relevance of the reversal of coronary atherosclerotic plaque. *European Journal of Internal Medicine, 129*, 16-24. https://doi.org/10.1016/J.EJIM.2024.08.010

Chaki, N. K., & Vijayamohanan, K. (2002). Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, *17*(1-2), 1-12. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00277-9

Chang, B. Y., & Park, S. M. (2010). Electrochemical impedance spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *3*(1), 207-229. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ANCHEM.012809.102211/CITE/REFWORKS

Chen, C., Kang, J., Wang, S., Chen, S., Guo, H., & Chen, M. (2023a). An electrochemical immunosensor based on polyaniline microtubules and zinc gallinate for detection of human growth differentiation factor-15. *Microchimica Acta*, *190*(3), 1-11. https://doi.org/10.1007/S00604-023-05674-6/TABLES/1

Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology 2010 10:12*, *10*(12), 826-837. https://doi.org/10.1038/nri2873

Chen, H., Zhang, J., Huang, R., Wang, D., Deng, D., Zhang, Q., & Luo, L. (2023b). The Applications of Electrochemical Immunosensors in the Detection of Disease Biomarkers: A Review. *Molecules*, *28*(8). https://doi.org/10.3390/MOLECULES28083605

Chen, M., Jiao, Y., Chen, C., Wang, Y., Lu, H., & Dai, X. (2023c). A sandwich-type electrochemical immunosensor prepared with graphyne-Au triangular nanoprisms and MoS2-AuPtCu hexagonal nanoframes for the detection of human growth/differentiation factor 15. *Microchemical Journal*, *193*, 109150. https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2023.109150

Chen, M., Zhao, L., Wu, D., Tu, S., Chen, C., Guo, H., & Xu, Y. (2022). Highly sensitive sandwich-type immunosensor with enhanced electrocatalytic durian-shaped MoS2/AuPtPd nanoparticles for human growth differentiation factor-15 detection. *Analytica Chimica Acta*, *1223*. https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340194

Chen, T., Zang, T., Liang, J., Zhou, Y., & Zhou, X. (2025). A highly sensitive fluorescence biosensor based on polylysine functionalized quantum dots for serum GDF-15 detection. *Talanta*, *285*, 127274. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.127274

Cherayil, B. J., Weiner, S. J., & Pillai, S. (1989). The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *The Journal of Experimental Medicine*, *170*(6), 1959. https://doi.org/10.1084/JEM.170.6.1959

Chopra, D., Shukla, S., Rana, P., Kamar, M. D., Gaur, P., Bala, M., & Pathaniya, D. (2024). Overview of Inflammation. Içinde *Inflammation Resolution and Chronic Diseases* (ss. 1-18). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0157-5_1

Chopra, K. L., Major, S., & Pandya, D. K. (1983). Transparent conductors-A status review. Içinde *Thin Solid Films* (C. 102, Sayı 1). https://doi.org/10.1016/0040-6090(83)90256-0

Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. *Molecular Cell*, *54*(2), 281-288. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.03.030

Chow, S. L., Maisel, A. S., Anand, I., Bozkurt, B., De Boer, R. A., Felker, G. M., Fonarow, G. C., Greenberg, B., Januzzi, J. L., Kiernan, M. S., Liu, P. P., Wang, T. J., Yancy, C. W., & Zile, M. R. (2017). Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, *135*(22), e1054-e1091. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000490

Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New*

York Academy of Sciences, *102*(1), 29-45. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1962.TB13623.X

Clementy, N., Piver, E., Bisson, A., Andre, C., Bernard, A., Pierre, B., Fauchier, L., & Babuty, D. (2018). Galectin-3 in Atrial Fibrillation: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 976*, *19*(4), 976. https://doi.org/10.3390/IJMS19040976

Clerkin, K. J., Fried, J. A., Raikhelkar, J., Sayer, G., Griffin, J. M., Masoumi, A., Jain, S. S., Burkhoff, D., Kumaraiah, D., Rabbani, L. R., Schwartz, A., & Uriel, N. (2020). COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *141*(20), 1648-1655. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046941/ASSET/869E6314-869F-4C2D-9F6D-87FF1087C3E0/ASSETS/IMAGES/LARGE/CIRCULATIONAHA.120.046941

Crossley, L., Attoye, B., Vezza, V., Blair, E., Corrigan, D. K., & Hannah, S. (2019). Establishing a Field-Effect Transistor Sensor for the Detection of Mutations in the Tumour Protein 53 Gene (TP53)—An Electrochemical Optimisation Approach. *Biosensors 2019, Vol. 9, Page 141*, *9*(4), 141. https://doi.org/10.3390/BIOS9040141

Daniels, J. S., & Pourmand, N. (2007). Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis*, *19*(12), 1239. https://doi.org/10.1002/ELAN.200603855

De Boer, R. A., Voors, A. A., Muntendam, P., Van Gilst, W. H., & Van Veldhuisen, D. J. (2009). Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *European journal of heart failure*, *11*(9), 811-817. https://doi.org/10.1093/EURJHF/HFP097

Desimoni, E., & Brunetti, B. (2013). Presenting Analytical Performances of Electrochemical Sensors. Some Suggestions. *Electroanalysis*, *25*(7). https://doi.org/10.1002/elan.201300150

Dey, T., & Naughton, D. (2016). Cleaning and anti-reflective (AR) hydrophobic coating of glass surface: a review from materials science perspective. Içinde *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (C. 77, Sayı 1). https://doi.org/10.1007/s10971-015-3879-x

di Candia, A. M., de Avila, D. X., Moreira, G. R., Villacorta, H., & Maisel, A. S. (2021). Growth differentiation factor-15, a novel systemic biomarker of oxidative stress, inflammation, and cellular aging: Potential role in cardiovascular diseases. *American Heart Journal Plus: Cardiology Research and Practice*, *9*, 100046. https://doi.org/10.1016/J.AHJO.2021.100046

Doan, Thao., Lievano, Fabio., Swanson-Mungerson, Michelle., & Viselli, Susan. (2021). *Lippincott : illustrated reviews : immunology* (3. bs). Wolters Kluwer Health.

Docherty, N., Collins, L., Pang, S., Fu, Y., Milne, S., & Corrigan, D. (2025). Cost-effective Amperometric Immunosensor for cardiac troponin I as a step towards affordable point-of-care diagnosis of acute myocardial infarction. *Sensing and Bio-Sensing Research*, *47*, 100725. https://doi.org/10.1016/J.SBSR.2024.100725

Dong, R., Zhang, M., Hu, Q., Zheng, S., Soh, A., Zheng, Y., & Yuan, H. (2018). Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International journal of molecular medicine*, *41*(2), 599-614. https://doi.org/10.3892/IJMM.2017.3311

Dumic, J., Dabelic, S., & Flögel, M. (2006). Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1760*(4), 616-635. https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2005.12.020

Duque, G. A., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, *5*(OCT), 117833. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00491/BIBTEX

Dünya Kalp Raporu. (2023). *World Heart Report 2023: Confronting the World's Number One Killer*. https://world-heart-federation.org/wp-content/uploads/World-Heart-Report-2023.pdf

Dünya Sağlık Örgütü. (2019). Uneven access to health services drives life expectancy gaps: WHO. *News Relase*. https://www.who.int/news/item/04-04-2019-uneven-access-to-health-services-drives-life-expectancy-gaps-who

Dünya Sağlık Örgütü. (2021). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. WHO, Fact Sheet, Update 11 June 2021. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)

Elsewify, W. A. E., Ashry, M. A., Elsaied, A. A., Hassan, M. H., Ahmed, M. A. E., & Mahmoud, H. E. M. (2022). Validity of B-Type Natriuretic Peptide, Growth Differentiation Factor 15, and High-Sensitivity Troponin I Levels in Ischemic Heart Failure. *Clinical Laboratory*, *68*(5), 2324-2335. https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2021.210751,

Eltelbany, M., Shah, P., & deFilippi, C. (2022). Biomarkers in HFpEF for Diagnosis, Prognosis, and Biological Phenotyping. *Current Heart Failure Reports*, *19*(6), 412-424. https://doi.org/10.1007/S11897-022-00578-7

Engelen, S. E., Robinson, A. J. B., Zurke, Y. X., & Monaco, C. (2022). Therapeutic strategies targeting inflammation and immunity in atherosclerosis: how to proceed? *Nature Reviews Cardiology 2022 19:8*, *19*(8), 522-542. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00668-4

Epelman, S., Liu, P. P., & Mann, D. L. (2015). Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nature Reviews Immunology 2015 15:2*, *15*(2), 117-129. https://doi.org/10.1038/nri3800

Fagundes, C. P., Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2012). Stressful Early Life Experiences and Immune Dysregulation across the Lifespan. *Brain, behavior, and immunity*, *27C*(1), 8. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2012.06.014

FDA. (2010). *510(k) Substantial equivalence determination decision summary. Review memorandum K093758*. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K093758.pdf

FDA-NIH Biyomarker Çalışma Grubu. (2016). BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Içinde *BEST (Biomarkers , EndpointS , and other Tools) Resource*. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda

(MD): National Institutes of Health (US). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/

Frangogiannis, N. G. (2017). The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(5), 1600. https://doi.org/10.1172/JCI87491

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, *25*(12), 1822. https://doi.org/10.1038/S41591-019-0675-0

Galvão, I., Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Machado, M. G., & Sousa, L. P. (2018). Mediators of Inflammation. Içinde *Immunopharmacology and Inflammation* (ss. 3-32). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77658-3_1

Gao, Z., Liu, Z., Wang, R., Zheng, Y., Li, H., & Yang, L. (2020). Galectin-3 Is a Potential Mediator for Atherosclerosis. *Journal of Immunology Research*, *2020*(1), 5284728. https://doi.org/10.1155/2020/5284728

George, M., Jena, A., Srivatsan, V., Muthukumar, R., & Dhandapani, V. (2016). GDF 15 - A Novel Biomarker in the Offing for Heart Failure. *Current Cardiology Reviews*, *12*(1), 37. https://doi.org/10.2174/1573403X12666160111125304

Gimbrone, M. A., & García-Cardeña, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, *118*(4), 620-636. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301

Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*, *104*(4), 503-516. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00238-0

Global Burden of Disease Collaborative Network. (2024). *Global Burden of Disease Study 2021*. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/

Gooding, J. J., Mearns, F., Yang, W., & Liu, J. (2003). Self-Assembled Monolayers into the 21st Century: Recent Advances and Applications. *Electroanalysis*, *15*(2), 81-96. https://doi.org/10.1002/ELAN.200390017

Gori, A. M., Cesari, F., Marcucci, R., Giusti, B., Paniccia, R., Antonucci, E., Gensini, G. F., & Abbate, R. (2009). The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with platelet aggregability in acute coronary syndrome patients. *Atherosclerosis*, *202*(1), 255-262. https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2008.04.001

Goryacheva, O. A., Ponomaryova, T. D., Drozd, D. D., Kokorina, A. A., Rusanova, T. Y., Mishra, P. K., & Goryacheva, I. Y. (2022). Heart failure biomarkers BNP and NT-proBNP detection using optical labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *146*, 116477. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2021.116477

Hansson, G. K. (2005). Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, *352*(16), 1685-1695. https://doi.org/10.1056/NEJMRA043430

Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology 2011 12:3*, *12*(3), 204-212. https://doi.org/10.1038/ni.2001

Hartupee, J., & Mann, D. L. (2013). Positioning of inflammatory biomarkers in the heart failure landscape. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *6*(4), 485-492. https://doi.org/10.1007/S12265-013-9467-Y

Hashimoto, M., Miki, T., Chang, I. V., Tsutsumi, H., & Mihara, H. (2021). Selection of fluorescent biosensors against galectin-3 from an NBD-modified phage library displaying designed α-helical peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *37*, 127835. https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2021.127835

He, Z., Luo, J., Lv, M., Li, Q., Ke, W., Niu, X., & Zhang, Z. (2023). Characteristics and evaluation of atherosclerotic plaques: an overview of state-of-the-art techniques. *Frontiers in Neurology*, *14*, 1159288. https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1159288

Henderson, N. C., & Sethi, T. (2009). The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological reviews*, *230*(1), 160-171. https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2009.00794.X

Hinderer, S., & Schenke-Layland, K. (2019). Cardiac fibrosis – A short review of causes and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *146*, 77-82. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2019.05.011

Ho, M. K., & Springer, T. A. (1982). Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology*, *128*(3), 1221-1228. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.128.3.1221

Hromas, R., Hufford, M., Sutton, J., Xu, D., Li, Y., & Lu, L. (1997). PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochimica et biophysica acta*, *1354*(1), 40-44. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00122-X

Hu, X., li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2021 6:1*, *6*(1), 1-33. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1

Ilatovskaya, D. V., Halade, G. V., & DeLeon-Pennell, K. Y. (2019). Adaptive immunity-driven inflammation and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *317*(6), H1254. https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00642.2019

İngiliz Kalp Vakfı. (2025). *Global Heart & Circulatory Diseases Factsheet*. https://www.bhf.org.uk/-/media/files/for-professionals/research/heart-statistics/bhf-cvd-statistics-global-factsheet.pdf

Italiani, P., & Boraschi, D. (2015). New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Network*, *15*(4), 167. https://doi.org/10.4110/IN.2015.15.4.167

Jalalvand, A. R. (2019). Fabrication of a novel and ultrasensitive label-free electrochemical aptasensor for detection of biomarker prostate specific antigen. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 1065-1073. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.01.012

Januarie, K. C., Oranzie, M., Feleni, U., & Iwuoha, E. (2023). Quantum dot amplified impedimetric aptasensor for interferon-gamma. *Electrochimica Acta*, *463*, 142825. https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2023.142825

Jiang, J., Yang, B., Sun, Y., Jin, J., Zhao, Z., & Chen, S. (2021). Diagnostic Value of Serum Concentration of Galectin-3 in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *8*, 829151. https://doi.org/10.3389/FCVM.2021.829151/BIBTEX

Jiang, T., Mallik, R., & Hage, D. S. (2005). Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction. *Analytical Chemistry*, *77*(8), 2362-2372. https://doi.org/10.1021/AC0483668,

Jiao, Y., Huang, Z., Chen, M., Zhou, X., Lu, H., Wang, B., & Dai, X. (2022). A label-free amperometric immunosensor with improved electrocatalytic 3D braided AuPtCu-SWCNTs@MoS2-rGO for human growth differentiation factor-15 detection. *Analytical Methods*, *14*(14), 1420-1429. https://doi.org/10.1039/D1AY02198B

Jie, M., Ming, C. Y., Jing, D., Cheng, L. S., Huai Na, L., Jun, F., & Xiang, C. Y. (1999). An electrochemical impedance immunoanalytical method for detecting immunological interaction of human mammary tumor associated glycoprotein and its monoclonal antibody. *Electrochemistry Communications*, *1*(9), 425-428. https://doi.org/10.1016/S1388-2481(99)00071-5

Johannes, L., Jacob, R., & Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *Journal of Cell Science*, *131*(9). https://doi.org/10.1242/JCS.208884/57083

Kadrofske, M. M., Openo, K. P., & Wang, J. L. (1998). The HumanLGALS3(Galectin-3) Gene: Determination of the Gene Structure and Functional Characterization of the Promoter,. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *349*(1), 7-20. https://doi.org/10.1006/ABBI.1997.0447

Kalita, N., Gogoi, S., Minteer, S. D., & Goswami, P. (2023). Advances in Bioelectrode Design for Developing Electrochemical Biosensors. *ACS Measurement Science Au*, *3*(6), 404. https://doi.org/10.1021/ACSMEASURESCIAU.3C00034

Kaminker, J. D., & Timoshenko, A. V. (2021). Expression, Regulation, and Functions of the Galectin-16 Gene in Human Cells and Tissues. *Biomolecules 2021, Vol. 11, Page 1909*, *11*(12), 1909. https://doi.org/10.3390/BIOM11121909

Kaminska, B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1754*(1-2), 253-262. https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2005.08.017

Karunakaran, C., Bhargava, K., & Benjamin, R. (2015). Biosensors and Bioelectronics. Içinde *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2014-0-03790-2

Katsoularis, I., Fonseca-Rodríguez, O., Farrington, P., Lindmark, K., & Connolly, A.-M. F. (2021). Risk of acute myocardial infarction and ischaemic stroke following COVID-19 in Sweden: a self-controlled case series and matched cohort study. *www.thelancet.com*, *398*, 599. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00896-5

Kayani, M., Fatima, N., Yarra, P. C., Almansouri, N. E., K, D., Balasubramanian, A., Parvathaneni, N., Mowo-wale, A. G., Valdez, J. A., Nazir, Z., Kayani, M., Fatima, N., Yarra, P. C., Almansouri, N. E., K, D., Balasubramanian, A., Parvathaneni, N., Mowo-wale, A. G., Valdez, J. A., & Nazir, Z. (2024). Novel Biomarkers in Early Detection of Heart Failure: A Narrative Review. *Cureus*, *16*(2). https://doi.org/10.7759/CUREUS.53445

Kempf, T., von Haehling, S., Peter, T., Allhoff, T., Cicoira, M., Doehner, W., Ponikowski, P., Filippatos, G. S., Rozentryt, P., Drexler, H., Anker, S. D., & Wollert, K. C. (2007). Prognostic Utility of Growth Differentiation Factor-15 in Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, *50*(11), 1054-1060. https://doi.org/10.1016/J.JACC.2007.04.091

Khan, S. Q., Ng, K., Dhillon, O., Kelly, D., Quinn, P., Squire, I. B., Davies, J. E., & Ng, L. L. (2009). Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, *30*(9), 1057-1065. https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHN600

Khan, Z. H. (2016). Effect of ITO surface properties on SAM modification: A review toward biosensor application. *Cogent Engineering*, *3*(1), 1170097. https://doi.org/10.1080/23311916.2016.1170097;JOURNAL:JOURNAL:OAEN20;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, *60*(9), 702-706. https://doi.org/10.1021/ED060P702

Kong, P., Cui, Z. Y., Huang, X. F., Zhang, D. D., Guo, R. J., & Han, M. (2022). Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2022 7:1*, *7*(1), 1-24. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00955-7

Kosyakovsky, L. B., de Boer, R. A., & Ho, J. E. (2024). Screening for Heart Failure: Biomarkers to Detect Heightened Risk in the General Population. *Current Heart Failure Reports 2024 21:6*, *21*(6), 591-603. https://doi.org/10.1007/S11897-024-00686-6

Krasnoslobodtsev, A. V., & Smirnov, S. N. (2002). Effect of water on silanization of silica by trimethoxysilanes. *Langmuir*, *18*(8), 3181-3184. https://doi.org/10.1021/LA015628H

Krintus, M., Kozinski, M., Fabiszak, T., Kubica, J., Panteghini, M., & Sypniewska, G. (2017). Establishing reference intervals for galectin-3 concentrations in serum requires careful consideration of its biological determinants. *Clinical Biochemistry*, *50*(10-11), 599-604. https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2017.03.015

Krumholz, H. M., Geraldes, F., Wilson, C., & Horton, R. (2024). The Lancet–JACC collaboration: advancing cardiovascular health. *The Lancet*, *404*(10455), 833-834. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01700-8

Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Robbins, S. L. (Stanley L. (2012). *Robbins Basic Pathology* (A. J. Kumar V, Abbas AK, Ed.). Elsevier Saunders. https://books.google.com/books/about/Robbins_Basic_Pathology_E_Book.html?hl=pt-BR&id=jheBzf17C7YC

Laviron, E. (1979). General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *101*(1). https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80075-3

Lawton, L. N., Bonaldo, M. D. F., Jelenc, P. C., Qiu, L., Baumes, S. A., Marcelino, R. A., De Jesus, G. M., Wellington, S., Knowles, J. A., Warburton, D., Brown, S., & Soares, M. B. (1997). Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene*, *203*(1), 17-26. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00485-X

Lee, J., Jung, H., Lee, J., Lim, D., Yang, K., Yi, J., & Song, W. C. (2008). Growth and characterization of indium tin oxide thin films deposited on PET substrates. *Thin Solid Films*, *516*(7). https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.05.028

Li, J., Hu, X., Xie, Z., Li, J., Huang, C., & Huang, Y. (2024). Overview of growth differentiation factor 15 (GDF15) in metabolic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *176*, 116809. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2024.116809

Li, M., Duan, L., Cai, Y. L., Li, H. Y., Hao, B. C., Chen, J. Q., & Liu, H. Bin. (2020). Growth differentiation factor-15 is associated with cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Diabetology*, *19*(1), 120. https://doi.org/10.1186/S12933-020-01092-7

Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews*, *65*(12 Pt 2). https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2007.TB00352.X

Libby, P. (2012). History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *32*(9), 2045. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705

Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1). https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z

Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2009). Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. *Journal of the American College of Cardiology*, *54*(23), 2129-2138. https://doi.org/10.1016/J.JACC.2009.09.009

Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, *105*(9), 1135-1143. https://doi.org/10.1161/HC0902.104353

Lindholm, D., James, S. K., Gabrysch, K., Storey, R. F., Himmelmann, A., Cannon, C. P., Mahaffey, K. W., Steg, P. G., Held, C., Siegbahn, A., & Wallentin, L. (2018). Association of Multiple Biomarkers with Risk of All-Cause and Cause-Specific Mortality after Acute Coronary Syndromes: A Secondary Analysis of the PLATO Biomarker Study. *JAMA Cardiology*, *3*(12), 1160-1166. https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2018.3811

Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G., Linton, E. F., Song, W. L., Doran, A. C., & Vickers, K. C. (2019). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. Içinde *Science* (C. 111, Sayı 2877). MDText.com, Inc. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/

Lisdat, F., & Schäfer, D. (2008). The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *391*(5), 1555-1567. https://doi.org/10.1007/S00216-008-1970-7

Liu, J., Chen, C. F., Chang, C. W., & DeVoe, D. L. (2010). Flow-through immunosensors using antibody-immobilized polymer monoliths. *Biosensors & bioelectronics*, *26*(1), 182. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.06.007

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2017 2:1*, *2*(1), 1-9. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23

Lockhart, S. M., Saudek, V., & O'Rahilly, S. (2020). GDF15: A Hormone Conveying Somatic Distress to the Brain. *Endocrine Reviews*, *41*(4), bnaa007. https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAA007

Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., & Whitesides, G. M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical reviews*, *105*(4), 1103-1169. https://doi.org/10.1021/CR0300789

Luan, H. H., Wang, A., Hilliard, B. K., Carvalho, F., Rosen, C. E., Ahasic, A. M., Herzog, E. L., Kang, I., Pisani, M. A., Yu, S., Zhang, C., Ring, A. M., Young, L. H., & Medzhitov, R. (2019). GDF15 Is an Inflammation-Induced Central Mediator of Tissue Tolerance. *Cell*, *178*(5), 1231-1244.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.033

Luo, M., Zhao, F., Cheng, H., Su, M., & Wang, Y. (2024). Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1352946. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1352946/BIBTEX

Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *314*(1-2), 1-26. https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00629-5

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*(6801), 233-241. https://doi.org/10.1038/35025203

Madaudo, C., Coppola, G., Parlati, A. L. M., & Corrado, E. (2024). Discovering Inflammation in Atherosclerosis: Insights from Pathogenic Pathways to Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(11). https://doi.org/10.3390/ijms25116016

Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *21*(19), 6578. https://doi.org/10.3390/S21196578

Maiolino, G., Rossitto, G., Pedon, L., Cesari, M., Frigo, A. C., Azzolini, M., Plebani, M., & Rossi, G. P. (2015). Galectin-3 predicts long-term cardiovascular death in high-risk patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *35*(3), 725-732. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304964

Malinowska, N., Białobrzeska, W., Łęga, T., Pałka, K., Dziąbowska, K., Żołędowska, S., Czaczyk, E., Pala, K., & Nidzworski, D. (2020). Antibody Modified Gold Electrode as an Impedimetric Biosensor for the Detection of

Streptococcus pyogenes. *Sensors 2020, Vol. 20, Page 5324*, *20*(18), 5324. https://doi.org/10.3390/S20185324

Mann, D. L. (2011). The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: For whom the cell tolls. *Circulation Research*, *108*(9), 1133-1145. https://doi.org/https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226936

Mann, D. L. (2015). Innate immunity and the failing heart: The cytokine hypothesis revisited. *Circulation Research*, *116*(7), 1254-1268. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302317/-/DC1

Marken, F., Neudeck, A., & Bond, A. M. (2010). Cyclic voltammetry. Içinde *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_4

Martin, S. S., Aday, A. W., Almarzooq, Z. I., Anderson, C. A. M., Arora, P., Avery, C. L., Baker-Smith, C. M., Gibbs, B. B., Beaton, A. Z., Boehme, A. K., Commodore-Mensah, Y., Currie, M. E., Elkind, M. S. V, Evenson, K. R., Generoso, G., Heard, D. G., Hiremath, S., Johansen, M. C., Kalani, R., … Subcommittee, S. S. (2024). 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation*, *149*(8), e347-e913. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001209

Massa, S. M., Cooper, D. N. W., Leffler, H., & Barondes, S. H. (1993). L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry*, *32*(1), 260-267. https://doi.org/10.1021/BI00052A033

Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*, *67*, 753-791. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.753

Mauricio, D., Castelblanco, E., & Alonso, N. (2020). Cholesterol and Inflammation in Atherosclerosis: An Immune-Metabolic Hypothesis. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 2444*, *12*(8), 2444. https://doi.org/10.3390/NU12082444

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature 2008 454:7203*, *454*(7203), 428-435. https://doi.org/10.1038/nature07201

Medzhitov, R. (2021). The spectrum of inflammatory responses. *Science*, *374*(6571), 1070-1075. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABI5200

Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immunity. *The New England journal of medicine*, *343*(5), 338-344. https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506

Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *6*(2), 153-159. https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2015.12.002

Melaku, L., & Dabi, A. (2021). The cellular biology of atherosclerosis with atherosclerotic lesion classification and biomarkers. *Bulletin of the National Research Centre 2021 45:1*, *45*(1), 1-22. https://doi.org/10.1186/S42269-021-00685-W

Mensah, G. A., Fuster, V., Murray, C. J. L., Roth, G. A., null null, Mensah, G. A., Abate, Y. H., Abbasian, M., Abd-Allah, F., Abdollahi, A., Abdollahi, M., Abdulah, D. M., Abdullahi, A., Abebe, A. M., Abedi, A., Abedi, A., Abiodun, O. O., Ali, H. A., Abu-Gharbieh, E., … Roth, G. A. (2023). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. *Journal of the American College of Cardiology*, *82*(25), 2350-2473. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.11.007

Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X. M., Malmström, V., & Harris, R. A. (2014). An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. *Scandinavian Journal of Immunology*, *79*(5), 305. https://doi.org/10.1111/SJI.12162

Miftode, R. S., Constantinescu, D., Cianga, C. M., Petris, A. O., Costache, I. I., Mitu, O., Miftode, I. L., Mitu, I., Timpau, A. S., Duca, S. T., Costache, A. D., Cianga, P., & Serban, I. L. (2022). A Rising Star of the Multimarker Panel: Growth Differentiation Factor-15 Levels Are an Independent Predictor of Mortality in Acute Heart Failure Patients Admitted to an Emergency Clinical Hospital from Eastern Europe. *Life 2022, Vol. 12, Page 1948*, *12*(12), 1948. https://doi.org/10.3390/LIFE12121948

Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, *164*(12), 6166-6173. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.12.6166

Mills, C. D., & Ley, K. (2014). M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *Journal of Innate Immunity*, *6*(6), 716. https://doi.org/10.1159/000364945

Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S., & Ozkan, S. A. (2019). The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. *Biosensors 2019, Vol. 9, Page 86*, *9*(3), 86. https://doi.org/10.3390/BIOS9030086

Moore, E., O'Connell, D., & Galvin, P. (2006). Surface characterisation of indium-tin oxide thin electrode films for use as a conducting substrate in DNA sensor development. *Thin Solid Films*, *515*(4), 2612-2617. https://doi.org/10.1016/J.TSF.2006.03.025

Morgan, C. L., Newman, D. J., & Price, C. P. (1996). Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry*, *42*(2), 193-209. https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/42.2.193

Murray, D. R., & Freeman, G. L. (2003). Proinflammatory cytokines: Predictors of a failing heart? *Circulation*, *107*(11), 1460-1462. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000060808.79274.0C

Musunuru, K., Ingelsson, E., Fornage, M., Liu, P., Murphy, A. M., Newby, L. K., Newton-Cheh, C., Perez, M. V., Voora, D., & Woo, D. (2017). The Expressed Genome in Cardiovascular Diseases and Stroke: Refinement, Diagnosis, and Prediction: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *10*(4). https://doi.org/10.1161/HCG.0000000000000037

Mwanza, D., Adeniyi, O., Tesfalidet, S., Nyokong, T., & Mashazi, P. (2022). Capacitive label-free ultrasensitive detection of PSA on a covalently attached monoclonal anti-PSA antibody gold surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *927*, 116983. https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2022.116983

Nambi, V. (2018). Biomarkers in Cardiovascular Disease. Içinde V. Nambi (Ed.), *Biomarkers in Cardiovascular Disease* (1. bs). Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2016-0-05047-7

Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, *140*(6), 871-882. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.029

Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology 2014 15:7*, *15*(7), 602-611. https://doi.org/10.1038/ni.2921

Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., … Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature Immunology 2017 18:8*, *18*(8), 826-831. https://doi.org/10.1038/ni.3790

Nidorf, S. M., Fiolet, A. T. L., Mosterd, A., Eikelboom, J. W., Schut, A., Opstal, T. S. J., The, S. H. K., Xu, X.-F., Ireland, M. A., Lenderink, T., Latchem, D., Hoogslag, P., Jerzewski, A., Nierop, P., Whelan, A., Hendriks, R., Swart, H., Schaap, J., Kuijper, A. F. M., … Thompson, P. L. (2020). Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine*, *383*(19), 1838-1847. https://doi.org/10.1056/NEJMOA2021372

Nihal, S., Sarfo, D., Zhang, X., Tesfamichael, T., Karunathilaka, N., Punyadeera, C., & Izake, E. L. (2024). Paper electrochemical immunosensor for the rapid screening of Galectin-3 patients with heart failure. *Talanta*, *274*, 126012. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.126012

Noels, H., Weber, C., & Koenen, R. R. (2019). Chemokines as therapeutic targets in cardiovascular disease the road behind, the road ahead. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *39*(4), 583-592. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312037

Nuzzo, R. G., & Allara, D. L. (1983). Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, *105*(13), 4481-4483. https://doi.org/10.1021/JA00351A063/ASSET/JA00351A063.FP.PNG_V03

OECD/European Union. (2022). “Mortality from circulatory diseases”, in Health at a Glance: Europe 2022: State of Health in the EU Cycle. Içinde *OECD Publishing*. Elsevier B.V. https://doi.org/https://doi.org/10.1787/0d0bdc83-en

Ogawa, T., & de Bold, A. J. (2012). Brain Natriuretic Peptide Production and Secretion in Inflammation. *Journal of Transplantation*, *2012*, 962347. https://doi.org/10.1155/2012/962347

Oikonomou, E., Tsalamandris, S., Mourouzis, K., & Tousoulis, D. (2018). Biology of the Vessel Wall. Içinde *Coronary Artery Disease: From Biology to Clinical Practice* (ss. 3-12). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811908-2.00001-5

Olad, A., & Gharekhani, H. (2015). Preparation and electrochemical investigation of the polyaniline/activated carbon nanocomposite for supercapacitor applications. *Progress in Organic Coatings*, *81*, 19-26. https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2014.12.009

Olvera Alvarez, H. A., Kubzansky, L. D., Campen, M. J., & Slavich, G. M. (2018). Early life stress, air pollution, inflammation, and disease: An integrative review and immunologic model of social-environmental adversity and lifespan health. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *92*, 226-242. https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2018.06.002

Omran, F., Kyrou, I., Osman, F., Lim, V. G., Randeva, H. S., & Chatha, K. (2022). Cardiovascular Biomarkers: Lessons of the Past and Prospects for the Future. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 5680*, *23*(10), 5680. https://doi.org/10.3390/IJMS23105680

Osredkar, J., Bajrić, A., Možina, H., Lipar, L., & Jerin, A. (2024). Cardiac Troponins I and T as Biomarkers of Cardiomyocyte Injury—Advantages and Disadvantages of Each. *Applied Sciences 2024, Vol. 14, Page 6007*, *14*(14), 6007. https://doi.org/10.3390/APP14146007

Ozkan, S. A., Uslu, B., & Sezgintürk, M. K. (2022). *Biosensors : Fundamentals, Emerging Technologies, and Applications*. Taylor & Francis Group. http://ebookcentral.proquest.com/lib/trakya/detail.action?docID=7001446

Özcan, B., Demirbakan, B., Yeşiller, G., & Sezgintürk, M. K. (2014). Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: Single frequency impedance analysis for biosensing systems. *Talanta*, *125*. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.067

Öztürk, Ü. (2014). *Koroner Arter Hastalığı Anjiyografik Olarak Gösterilmiş Olgularda Enflamatuvar Belirteçlerin Karşılaştırılması* [Uzmanlık Tezi]. İstanbul Üniversitesi.

Pang, P. S., Xue, Y., Defilippi, C., Silver, M., Januzzi, J., & Maisel, A. (2012). The Role of Natriuretic Peptides: From the Emergency Department Throughout Hospitalization. *Congestive Heart Failure*, *18*(SUPPL. 1), S5-S8. https://doi.org/10.1111/J.1751-7133.2012.00307.X

Paralkar, V. M., Vail, A. L., Grasser, W. A., Brown, T. A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H. Z., Qi, H., Owen, T. A., & Thompson, D. D. (1998). Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *The Journal of biological chemistry*, *273*(22), 13760-13767. https://doi.org/10.1074/JBC.273.22.13760

Parhi, R., Jena, G. K., Patra, C. N., & Jammula, S. (2025). Biomarkers as Diagnostic and Prognostic Tools in Cardiac Disorders: A Comprehensive Review. *Journal of Bio-X Research*, *8*. https://doi.org/10.34133/JBIOXRESEARCH.0030

Park, Y. K., Bold, B., Lee, W. K., Jeon, M. H., An, K. H., Jeong, S. Y., & Shim, Y. K. (2011). d-(+)-Galactose-Conjugated Single-Walled Carbon Nanotubes as New Chemical Probes for Electrochemical Biosensors for the Cancer Marker Galectin-3. *International Journal of Molecular Sciences 2011, Vol. 12, Pages 2946-2957*, *12*(5), 2946-2957. https://doi.org/10.3390/IJMS12052946

Peplow, P. V., Martinez, B., & Dambinova, S. A. (Ed.). (2020). *Stroke Biomarkers* (C. 147). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9682-7

Pittman, T. W., Zhang, X., Punyadeera, C., & Henry, C. S. (2024). Electrochemical immunosensor for the quantification of galectin-3 in saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *400*, 134811. https://doi.org/10.1016/J.SNB.2023.134811

Primo, E. N., Kogan, M. J., Verdejo, H. E., Bollo, S., Rubianes, M. D., & Rivas, G. A. (2018). Label-Free Graphene Oxide-Based Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Quantification of Galectin-3, a Novel Cardiac Biomarker. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *10*(28). https://doi.org/10.1021/acsami.8b03039

Program in Cardiovascular Health Metrics. (2024). Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). https://www.healthdata.org/research-analysis/cardiovascular-health

Raimond, J., Zimonjic, D. B., Mignon, C., Mattei, M. G., Popescu, N. C., Monsigny, M., & Legrand, A. (1997). Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-22. *Mammalian Genome*, *8*(9), 706-707. https://doi.org/10.1007/s003359900548

Randviir, E. P., & Banks, C. E. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*, *5*(5), 1098-1115. https://doi.org/10.1039/C3AY26476A

Raz, A., Meromsky, L., Zvibel, I., & Lotan, R. (1987). Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *International Journal of Cancer*, *39*(3), 353-360. https://doi.org/10.1002/IJC.2910390314

RCSB PDB. (t.y.). *RCSB PDB - 1A3K: X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-A resolution*. Geliş tarihi 03 Nisan 2025, gönderen https://www.rcsb.org/structure/1A3K

Reali, E., Ferrando-Martinez, S., & Catalfamo, M. (2021). Editorial: The Interplay Between Immune Activation and Cardiovascular Disease During Infection, Autoimmunity and Aging: The Role of T Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.719517/FULL

Renz, H., Holt, P. G., Inouye, M., Logan, A. C., Prescott, S. L., & Sly, P. D. (2017). An exposome perspective: Early-life events and immune development in a changing world. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *140*(1), 24-40. https://doi.org/10.1016/J.JACI.2017.05.015

Rezaei, B., & Irannejad, N. (2019). Electrochemical detection techniques in biosensor applications. Içinde Ensafi Ali A. (Ed.), *Electrochemical Biosensors* (ss. 11-43). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4

Ridker, P. M. (2001). High-sensitivity C-reactive protein: Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*, *103*(13), 1813-1818. https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.13.1813

Ridker, P. M. (2016). From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream to Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circulation Research*, *118*(1), 145-156. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306656

Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., … Glynn, R. J. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*, *377*(12), 1119-1131. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914

Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Burning, J. E., & Rifai, N. (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *The New England journal of medicine*, *342*(12), 1066-1067. https://doi.org/10.1056/NEJM200003233421202

Robertson, M. W., Albrandt, K., Keller, D., & Liu, F. T. (1990). Human IgE-Binding Protein: A Soluble Lectin Exhibiting a Highly Conserved Interspecies Sequence and Differential Recognition of IgE Glycoforms. *Biochemistry*, *29*(35), 8093-8100. https://doi.org/10.1021/bi00487a015

Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, *39*(5), 1747-1763. https://doi.org/10.1039/B714449K

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*, *340*(2), 115-126. https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., … Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, *76*(25), 2982-3021. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010

Ryan, G. B., & Majno, G. (1977). Acute inflammation. A review. *The American Journal of Pathology*, *86*(1), 183. https://doi.org/10.5005/jp/books/12977_3

Saloni Dattani, Fiona Spooner, Hannah Ritchie, & Max Roser. (2023). *ourworldindata.org/causes-of-death*. Published online at OurWorldinData.org. Retrieved from: "https://ourworldindata.org/causes-of-death" [Online Resource]

Sánchez-Salcedo, R., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., & Corrigan, D. K. (2023). Comparing nanobody and aptamer-based capacitive sensing for detection of interleukin-6 (IL-6) at physiologically relevant levels. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *415*(29-30), 7035-7045. https://doi.org/10.1007/S00216-023-04973-4/FIGURES/6

Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., & Liu, F.-T. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*(4), 2156-2164. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.165.4.2156

Sarraju, A., & Nissen, S. E. (2024). Atherosclerotic plaque stabilization and regression: a review of clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology 2024 21:7*, *21*(7), 487-497. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00979-8

Sawalha, K., Norgard, N. B., Drees, B. M., & López-Candales, A. (2023). Growth Differentiation Factor 15 (GDF-15), a New Biomarker in Heart Failure Management. *Current Heart Failure Reports*, *20*(4), 287-299. https://doi.org/10.1007/s11897-023-00610-4

Schwarz, A., Kinscherf, R., Bonaterra, G. A., Djuric, D. M., & Jakovljevic, V. (2023). Role of the Stress-and Inflammation-Induced Cytokine GDF-15 in Cardiovascular Diseases: From Basic Research to Clinical Relevance. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, *24*(3), 81. https://doi.org/10.31083/j.rcm2403081

Sciacchitano, S., Lavra, L., Morgante, A., Ulivieri, A., Magi, F., De Francesco, G. P., Bellotti, C., Salehi, L. B., & Ricci, A. (2018). Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 379. https://doi.org/10.3390/IJMS19020379

Seetharaman, J., Kfanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S. H., & Rini, J. M. (1998). X-ray Crystal Structure of the Human Galectin-3 Carbohydrate Recognition Domain at 2.1-Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(21), 13047-13052. https://doi.org/10.1074/JBC.273.21.13047

Senf, B., Yeo, W. H., & Kim, J. H. (2020). Recent Advances in Portable Biosensors for Biomarker Detection in Body Fluids. *Biosensors 2020, Vol. 10, Page 127*, *10*(9), 127. https://doi.org/10.3390/BIOS10090127

Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A. J., Perretti, M., Rossi, A. G., & Wallace, J. L. (2007). Resolution of in flammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB Journal*, *21*(2), 325-332. https://doi.org/10.1096/FJ.06-7227REV

Shakeri, A., Jarad, N. A., Leung, A., Soleymani, L., & Didar, T. F. (2019). Biofunctionalization of Glass- and Paper-Based Microfluidic Devices: A Review. *Advanced Materials Interfaces*, *6*(19). https://doi.org/10.1002/admi.201900940

Shanmugam, N. R., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2016). Ultrasensitive and low-volume point-of-care diagnostics on flexible strips – a study with cardiac troponin biomarkers. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/srep33423

Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology 2011 11:11*, *11*(11), 762-774. https://doi.org/10.1038/nri3070

Shi, Y., Dong, G., Liu, J., Shuang, X., Liu, C., Yang, C., Qing, W., & Qiao, W. (2022). Clinical Implications of Plasma Galectin-3 in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Meta-Analysis. *Frontiers in cardiovascular medicine*, *9*. https://doi.org/10.3389/FCVM.2022.854501

Silah, H., Erkmen, C., Demir, E., & Uslu, B. (2021). Modified indium tin oxide electrodes: Electrochemical applications in pharmaceutical, biological, environmental and food analysis. Içinde *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (C. 141). https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116289

Singer, K., & Lumeng, C. N. (2017). The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(1), 65. https://doi.org/10.1172/JCI88882

Singh, M., Kaur, N., & Comini, E. (2020). The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *Journal of Materials Chemistry C*, *8*(12), 3938-3955. https://doi.org/10.1039/D0TC00388C

Sitkov, N., Ryabko, A., Moshnikov, V., Aleshin, A., Kaplun, D., & Zimina, T. (2024). Hybrid Impedimetric Biosensors for Express Protein Markers Detection. *Micromachines 2024, Vol. 15, Page 181*, *15*(2), 181. https://doi.org/10.3390/MI15020181

Smutok, O., & Katz, E. (2023). Biosensors: Electrochemical Devices—General Concepts and Performance. Içinde *Biosensors* (C. 13, Sayı 1). https://doi.org/10.3390/bios13010044

Soehnlein, O., & Libby, P. (2021). Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights to the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery 2021 20:8*, *20*(8), 589-610. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00198-1

Song, Y., Ma, Y., Wang, Y., Di, J., & Tu, Y. (2010). Electrochemical deposition of gold–platinum alloy nanoparticles on an indium tin oxide electrode and their electrocatalytic applications. *Electrochimica Acta*, *55*(17), 4909-4914. https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2010.03.089

Sorriento, D., & Iaccarino, G. (2019). Inflammation and Cardiovascular Diseases: The Most Recent Findings. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 3879*, *20*(16), 3879. https://doi.org/10.3390/IJMS20163879

Stadler, A. (2012). Transparent Conducting Oxides—An Up-To-Date Overview. *Materials 2012, Vol. 5, Pages 661-683*, *5*(4), 661-683. https://doi.org/10.3390/MA5040661

Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L. K., & Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clinical Science (London, England : 1979)*, *137*(15), 1067. https://doi.org/10.1042/CS20220531

Suetomi, T., Miyamoto, S., & Brown, J. H. (2019). Inflammation in nonischemic heart disease: initiation by cardiomyocyte CaMKII and NLRP3 inflammasome signaling. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *317*(5), H877. https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00223.2019

Suhito, I. R., Koo, K. M., & Kim, T. H. (2021). Recent advances in electrochemical sensors for the detection of biomolecules and whole cells. Içinde *Biomedicines* (C. 9, Sayı 1). https://doi.org/10.3390/biomedicines9010015

Suthahar, N., Meijers, W. C., Silljé, H. H. W., Ho, J. E., Liu, F. T., & de Boer, R. A. (2018). Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics*, *8*(3), 593. https://doi.org/10.7150/THNO.22196

Sygitowicz, G., Maciejak-Jastrzębska, A., & Sitkiewicz, D. (2021). The Diagnostic and Therapeutic Potential of Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. *Biomolecules 2022, Vol. 12, Page 46*, *12*(1), 46. https://doi.org/10.3390/BIOM12010046

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.022

Tang, Z., He, J., Chen, J., Niu, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., & Yu, C. (2018). A sensitive sandwich-type immunosensor for the detection of galectin-3 based on N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs nanocomposites and a novel AuPt-methylene blue

nanorod. *Biosensors and Bioelectronics, 101*, 253-259. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2017.10.026

Tania Séverin, Borjana Pervan, & Lisa Hadeed. (2022). *World Heart Vision 2030: Driving Policy Change*. https://world-heart-federation.org/wp-content/uploads/World-Heart-Vision-2030.pdf

Tardif, J.-C., Kouz, S., Waters, D. D., Bertrand, O. F., Diaz, R., Maggioni, A. P., Pinto, F. J., Ibrahim, R., Gamra, H., Kiwan, G. S., Berry, C., López-Sendón, J., Ostadal, P., Koenig, W., Angoulvant, D., Grégoire, J. C., Lavoie, M.-A., Dubé, M.-P., Rhainds, D., … Roubille, F. (2019). Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, *381*(26), 2497-2505. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1912388

Taylor, M. E., Drickamer, K., Schnaar, R. L., Etzler, M. E., & Varki, A. (2017). Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. Içinde A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Ed.), *Essentials of Glycobiology* (3. bs, ss. 361-372). Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.028

Tedgui, A. (2011). Focus on inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(5), 958-959. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.227355

Tejerina-Miranda, S., Pérez-Ginés, V., Torrente-Rodríguez, R. M., Pedrero, M., Montero-Calle, A., Pingarrón, J. M., Barderas, R., & Campuzano, S. (2024). Magneto-controlled electrochemical immunosensing platform to assess the senescence-associated GDF-15 marker in colorectal cancer. *Sensors & Diagnostics*, *3*(2), 238-247. https://doi.org/10.1039/D3SD00311F

Thermo Fisher. (t.y.). *Human GDF15 ELISA Kit - Invitrogen*. Thermo Fisher Scientific. Geliş tarihi 27 Mayıs 2025, gönderen https://www.thermofisher.com/elisa/product/Human-GDF15-ELISA-Kit/EHGDF15

Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(1-2), 121-131. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4

Thiriet, M. (2018). Cardiovascular Disease: An Introduction. Içinde M. Thiriet (Ed.), *Vasculopathies: Behavioral, Chemical, Environmental, and Genetic Factors* (ss. 1-90). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89315-0_1

Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., & on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction, T. E. G. (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, *138*(20), e618-e651. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617

Toikka, A., Ilin, M., & Kamanina, N. (2024). Perspective Coatings Based on Structured Conducting ITO Thin Films for General Optoelectronic Applications. *Coatings*, *14*(2). https://doi.org/10.3390/coatings14020178

Törer, H., Aydın, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2018). A label-free electrochemical biosensor for direct detection of RACK 1 by using disposable, low-cost and reproducible ITO based electrode. *Analytica Chimica Acta*, *1024*, 65-72. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2018.04.031

Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E., & Blaxall, B. C. (2016). Cardiac fibrosis: The fibroblast awakens. *Circulation Research*, *118*(6), 1021-1040. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306565

Tuegel, C., Katz, R., Alam, M., Bhat, Z., Bellovich, K., de Boer, I., Brosius, F., Gadegbeku, C., Gipson, D., Hawkins, J., Himmelfarb, J., Ju, W., Kestenbaum, B., Kretzler, M., Robinson-Cohen, C., Steigerwalt, S., & Bansal, N. (2018). GDF-15, Galectin 3, Soluble ST2, and Risk of Mortality and Cardiovascular Events in CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, *72*(4). https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.03.025

Türk Kalp Vakfı. (2020). https://tkv.org.tr/saglikli-bilgiler/makaleler/atriyum-fibrilasyonunu-tespit-eden-ve-kan-oksijenini-olcen-saatler

Türkiye İstatistik Kurumu. (2024, Haziran 14). *Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2023*. TÜİK. https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2023-53709

Tymińska, A., Kapłon-Cieślicka, A., Ozierański, K., Budnik, M., Wancerz, A., Sypień, P., Peller, M., Balsam, P., Opolski, G., Filipiak, K. J., & Berezin, A. (2019). Association of Galectin-3 and Soluble ST2, and Their Changes, with Echocardiographic Parameters and Development of Heart Failure after ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Disease Markers*, *2019*(1), 9529053. https://doi.org/10.1155/2019/9529053

Ueland, T., Gullestad, L., Nymo, S. H., Yndestad, A., Aukrust, P., & Askevold, E. T. (2015). Inflammatory cytokines as biomarkers in heart failure. *Clinica Chimica Acta*, *443*, 71-77. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.09.001

Ulman, A. (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, *96*(4), 1533-1554. https://doi.org/10.1021/CR9502357/ASSET/CR9502357.FP.PNG_V03

Unsicker, K., Spittau, B., & Krieglstein, K. (2013). The multiple facets of the TGF-β family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *24*(4), 373-384. https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2013.05.003

Valapil, K. K., Filipiak, M. S., Rekiel, W., Jarosińska, E., Nogala, W., Jönsson-Niedziółka, M., & Witkowska Nery, E. (2023). Fabrication of ITO microelectrodes and electrode arrays using a low-cost CO2 laser plotter. *Lab on a Chip*, *23*(17), 3802-3810. https://doi.org/10.1039/D3LC00266G

Vasan, R. S. (2006). Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations. *Circulation*, *113*(19), 2335-2362. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570

Vasan, R. S., Sullivan, L. M., Roubenoff, R., Dinarello, C. A., Harris, T., Benjamin, E. J., Sawyer, D. B., Levy, D., Wilson, P. W. F., & D'Agostino, R. B. (2003).

Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*, *107*(11), 1486-1491. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000057810.48709.F6

Vericat, C., Vela, M. E., Benitez, G., Carro, P., & Salvarezza, R. C. (2010). Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chemical Society Reviews*, *39*(5), 1805-1834. https://doi.org/10.1039/B907301A

Wang, J., Tan, G. J., Han, L. N., Bai, Y. Y., He, M., & Liu, H. Bin. (2017). Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *Journal of Geriatric Cardiology : JGC*, *14*(2), 135. https://doi.org/10.11909/J.ISSN.1671-5411.2017.02.008

Welsh, P., Kimenai, D. M., Marioni, R. E., Hayward, C., Campbell, A., Porteous, D., Mills, N. L., O'Rahilly, S., & Sattar, N. (2022). Reference ranges for GDF-15, and risk factors associated with GDF-15, in a large general population cohort. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *60*(11), 1820. https://doi.org/10.1515/CCLM-2022-0135

Wilson, R., & Schiffrin, D. J. (1995). Use of fluorescamine for the spectrofluorimetric investigation of primary amines on silanized glass and indium tin oxide-coated glass. *Analyst*, *120*(1), 175-178. https://doi.org/10.1039/AN9952000175

Witucki, G. L. (1992). A Silane Primer: Chemistry and Applications of AIkoxy Silanes. *Journal of Coatings Technology*, *65*(822).

Wolf, D., & Ley, K. (2019). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation Research*, *124*(2), 315-327. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591

Wollert, K. C., Kempf, T., & Wallentin, L. (2017). Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clinical Chemistry*, *63*(1), 140-151. https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.255174

Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine 2012 18:7*, *18*(7), 1028-1040. https://doi.org/10.1038/nm.2807

Yang, L., & Li, Y. (2005). AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of Escherichia coli O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*(7), 1407-1416. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2004.06.024

Yılmaz, N., Aydın, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2019). An epoxysilane modified indium tin oxide electrode for the determination of PAK 2: Application in human serum samples. *Analytica Chimica Acta*, *1062*, 68-77. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.02.020

Zaborska, B., Sikora-Frąc, M., Smarż, K., Pilichowska-Paszkiet, E., Budaj, A., Sitkiewicz, D., & Sygitowicz, G. (2023). The Role of Galectin-3 in Heart Failure—The Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential—Where Do We Stand? *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(17), 13111. https://doi.org/10.3390/IJMS241713111

Zamani, M., Klapperich, C. M., & Furst, A. L. (2023). Recent advances in gold electrode fabrication for low-resource setting biosensing. *Lab on a Chip*, *23*(5), 1410-1419. https://doi.org/10.1039/D2LC00552B

Zamzami, M., Ahmad, A., Alamoudi, S., Choudhry, H., Hosawi, S., Rabbani, G., Shalaan, E. S., & Arkook, B. (2024). A highly sensitive and specific Gold Electrode-Based electrochemical immunosensor for rapid On-Site detection of Salmonella enterica. *Microchemical Journal*, *199*, 110190. https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2024.110190

Zhao, X., Gao, C., Chen, H., Chen, X., Liu, T., & Gu, D. (2024). C-Reactive Protein: An Important Inflammatory Marker of Coronary Atherosclerotic Disease. *Angiology*. https://doi.org/10.1177/00033197241273360

Zhou, J., Li, Y. S., & Chien, S. (2014). Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *34*(10), 2191-2198. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303422

Zipes, D. P. (2018). Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 11th Edition. Içinde P. Libby, R. O. Bonow, D. Mann, G. F. Tomaselli, & E. Braunwald (Hon) (Ed.), *BMH Medical Journal - ISSN 2348–392X* (11. bs, C. 5, Sayı 2).

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimimi İpsala Atatürk İlkokulu'nda tamamladım. Lise eğitimimi Edirne Anadolu Lisesi'nde, 2004 yılında tamamladım. 2005 yılında Ege Üniversitesi Kimya Bölümü'nde başladığım lisans eğitimini 2009 yılında tamamladım. 2010-2011 yıllarında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Fizikokimya Yüksek Lisans Programında ders aşamasını tamamlayıp Nükleer Kimya alanında çalışmalarda bulundum. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı'nda Biyokimya alanında yüksek lisans programına başladım, ders aşamamı tamamlayıp, 2013 yılında Erasmus Programıyla Köln Üniversitesi'nde tez çalışmamı gerçekleştirdikten sonra 2014 yılında mezun oldum. 2014 yılında Koçak Farma'da Ar-Ge Birimi ve sonrasında Biyoteknoloji Birimi'nde çalıştım. 2015 yılında Edirne Belediyesi AB & Uluslararası İlişkiler Birimi'nde çalışmaya başladım, 2024 yılından itibaren İleri Biyolojik Atık Su Arıtma Tesisi'nde çalışmaya devam etmekteyim. 2018 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı'nda Biyokimya alanında doktora programına başladım ve halen devam etmekteyim.

Gözde Fatma SARICAN