**T.C.**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# OSTEOPOROZ TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

**SEVİLAY İNAL KABALA**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: PROF. DR. HÜLYA YAĞAR**

**EDİRNE-2019**

SEVİLAY İNAL KABALA'nın hazırladığı "OSTEOPOROZ TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

| Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad): | İmza |
|---|---|
| Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL | |
| Prof. Dr. Figen ERTAN | |
| Prof. Dr. Hülya YAĞAR | |
| Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL | |
| Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR | |

Tez Savunma Tarihi:
18/04/2019

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hülya YAĞAR
Tez Danışmanı

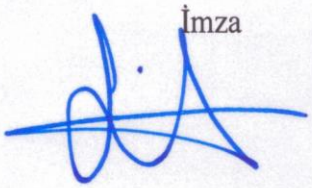
Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
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.

18 / 04 / 2019
Sevilay İNAL KABALA
İmza



Doktora tezi
Osteoporoz Tayinine Yönelik Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi
Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

## ÖZET

Osteoporoz, belirti vermeyen bir hastalık olup birçok kişi hastalığının farkında değildir. Kemikte kırık meydana gelmeden önce sessiz dönemde osteoporoz tanısının konulması son derece önemlidir. Kemik metabolizma ve döngüsünün değerlendirilmesinde kemik döngüsündeki yapım ve yıkım ürünleri biyokimyasal belirteç olarak kullanılmaktadır. Osteoporoz tanısı ve takibinde klinik muayene, görüntüleme yöntemlerinin yanısıra bu biyokimyasal belirteçlerden yararlanılır. Biyobelirteç temelli bu yöntemlerin çoğu özel ekipman ve uzman personel gerektiren, zaman alıcı yöntemler olduğundan, alternatif olarak biyobelirteçlerin tayini için daha duyarlı, daha kısa sürede uygulanabilen biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

Osteokalsin (OCN) ve Osteopontin (OPN) molekülleri bazı metabolik kemik hastalıklarında anormal kemik kaybını öngörebilen biyolojik belirteçlerdendir. Bu tez kapsamında; osteoporoz tanısı, seyri ve tedavi takibinde kullanılmak üzere immünolojik temelli OCN ve OPN biyosensör sistemleri geliştirildi. Geliştirilen OCN ve OPN biyosensörleri ile elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak 10-60 pg/µL tayin aralığında spesifik ve duyarlı OCN ve OPN ölçümleri yapıldı. Geliştirilen biyosensörlerin tekrarlanabilirliklerinin yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca bu biyosensörler, yapay serum örneklerinin analizinde de başarıyla kullanıldı.

Yıl : 2019
Sayfa Sayısı : 96
Anahtar Kelimeler : Osteokalsin, osteopontin, BSP (Kemik Sialoprotein), biyosensör, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, osteoporoz

PhD Thesis

Development of Biosensors System for the Determination of Osteoporosis

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

## ABSTRACT

Osteoporosis is a symptom-free disease and many people are not aware of the disease. The diagnosis of osteoporosis in the silent period before the fracture occurs is extremely important. The production and degradation products in the bone cycle are important in the evaluation of bone metabolism and cycle as biochemical markers. Today, in addition to the clinical examination and imaging methods, these biochemical markers are used in the diagnosis and follow-up of osteoporosis. Since most of these methods based on biomarkers are time-consuming methods that require special equipment and expert personnel, the development of biosensor systems that are more sensitive and fast becomes more important for the determination of biomarkers.

Osteocalcin (OCN) and Osteopontin (OPN) molecules are biomarkers that can predict abnormal bone loss in some metabolic bone diseases. In this thesis, OCN and OPN biosensor systems based on immunoassay were developed for the diagnosis, prognosis and follow-up of osteoporosis. By using the developed OCN and OPN biosensors, the OCN and OPN determinations were performed specifically and sensitively using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) within the concentration range of 10-60 pg/μL. The reproducibilities of the developed biosensors were determined to be high. Also, these biosensors were also used successfully in the analysis of artificial serum samples.

Year : 2019

Number of Pages : 96

Keywords : Osteocalcin, osteopontin, BSP (Bone Sialoprotein) biosensor, electrochemical impedance spectroscopy, osteoporosis

# TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince tez danışmanlığımı üstlenerek gerek bilgi, birikim ve önerilerinden yararlandığım gerekse mental açıdan beni her daim motive eden değerli hocam Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımda tecrübelerini paylaşarak bana destek olan Doç.Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a,

Tezime başlarken yanımda olup deneyimlerini paylaşan arkadaşım Türkkan ÖZTÜRK'e,

Doktora öğrenimim boyunca bana burs imkânı sağlayan TÜBİTAK'a,

Tüm hayatım boyunca benden fedakârlığı ve sevgiyi esirgemeyen, desteklerini her daim hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime,

Tez çalışmam boyunca desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Mehmet Ali KABALA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen 2016/106 nolu ve "Osteoporoz Tayinine Yönelik Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi" adlı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

18 / 04 / 2019

Sevilay İNAL KABALA

# İÇİNDEKİLER

**SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... xi**

**ŞEKİLLER DİZİNİ ..... xii**

**ÇİZELGELER DİZİNİ ..... xiv**

**BÖLÜM 1 ..... 1**

**GİRİŞ ..... 1**

**BÖLÜM 2 ..... 4**

**KAYNAK ARAŞTIRMASI ..... 4**

2.1.Osteoporoz ..... 4

2.1.1. Osteoporoz Tanısı ..... 5

2.2. Osteokalsin ..... 7

2.2.1. Osteokalsinin Fonksiyonu ..... 8

2.3. Osteopontin ..... 10

2.3.2. Osteopontinin Fonksiyonu ..... 12

2.4. Biyosensörler ..... 14

2.4.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması ..... 16

2.4.1.1.Biyoaktif Tabakada Kullanılan Biyobileşen Türüne Göre Biyosensörler ..... 16

2.4.1.2. İletim ve Ölçüm Sistemleri Arasındaki İlişkiye Göre Biyosensörler ..... 16

2.5. Biyosensör Hazırlanmasında Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemleri ..... 17

2.6. Elektrokimyasal Temelli Biyosensörler ..... 18

2.6.1.Amperometrik biyosensörler ..... 18

2.6.2. Potansiyometrik Biyosensörler ..... 18

2.7. Döngüsel Voltametri (CV) ..... 18

2.8. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) ..... 19
2.8.1. SAM ( Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka) ..... 22
2.9. Antikor/Antijen Temelli İmmünosensörler ..... 24
2.10. Literatürde Osteokalsin Biyobelirteci için Geliştirilmiş Biyosensörler ..... 25
2.11. Literatürde Osteopontin Belirteci İçin Geliştirilmiş Biyosensörler ..... 26
2.12. Tez Kapsamında Geliştirilen Osteokalsin Biyosensörünün Dizaynının Kimyası .. 29
2.13. Tez Kapsamında Geliştirilen Osteopontin Biyosensörünün Dizaynının Kimyası . 31
**BÖLÜM 3 ..... 33**
**MATERYAL VE METOT ..... 33**
3.1. Materyal ..... 33
3.1.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ..... 33
3.1.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar ..... 34
3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanışı ..... 34
3.2. Metot ..... 35
3.2.1. Çalışma Elektrodunun (Au) Temizliği ..... 35
3.2.2. Dizayn Edilen Biyosensörlerin Ölçüm Prensipleri ..... 36
3.2.3. Nyquist Eğrilerinden Yük Transfer Direncinin (Rct) Hesaplanması ..... 36
3.2.4. Osteokalsin Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanma Prosedürü ..... 38
3.2.5. Osteokalsin Molekülünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyon Çalışmaları ..... 40
3.2.5.1. SAM yapımında kullanılan 6-MCH konsantrasyonunun optimizasyonu ..... 40
3.2.5.2. 1,4-BDE konsantrasyonunun optimizasyonu ..... 40
3.2.5.3. Etanolamin konsantrasyonunun optimizasyonu ..... 40
3.2.5.4. Anti-OCN konsantrasyonun optimizasyonu ..... 41
3.2.5.5. Osteokalsin molekülünün inkübasyon süre optimizasyonu ..... 41
3.2.6. Osteopontin Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanma Prosedürü ..... 41
3.2.7. Osteopontin (OPN) Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu ..... 43

3.2.7.1. SAM yapımında kullanılan 4-MPA konsantrasyonunun optimizasyonu.....43
3.2.7.2. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu.....43
3.2.7.3. Anti-OPN konsantrasyonu optimizasyonu.....43
3.2.8. Osteokalsin ve Osteopontin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonu .44
3.2.8.1. Doğrusal tayin aralığı.....44
3.2.8.2. OCNve OPN biyosensör yüzey alanının hesaplanması.....44
3.2.8.3. Tekrar üretilebilirlik.....45
3.2.8.4. Yapay serumda uygulama.....45
**BÖLÜM 4.....46**
**DENEYSEL SONUÇLAR.....46**
4.1. Osteokalsin Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular.....46
4.1.1. Osteokalsin Biyosensörünün Dizaynına İlişkin Bulgular.....46
4.1.2. Osteokalsin Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.....49
4.1.2.1. 6-MCH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....49
4.1.2.2. 1,4-BDE konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....51
4.1.2.3. Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....52
4.1.2.4. Anti-OCN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....54
4.1.2.5. OCN inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....55
4.1.3. OCN Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular.....57
4.1.3.1. Doğrusal tayin aralığı.....57
4.1.3.2.OCN biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....59
4.1.3.3. Tekrar üretilebilirlik.....60
4.1.3.4. Yapay serumda uygulama.....61
4.2. Osteopontin Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular.....62
4.2.1. Osteopontin Biyosensörünün Dizaynına İlişkin Bulgular.....62
4.2.2. Osteopontin Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.....65

4.2.2.1. 4-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 65
4.2.2.2. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 66
4.2.2.3. Anti-OPN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 68
4.2.3. OPN Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular ..... 70
4.2.3.1. Doğrusal tayin aralığı ..... 70
4.2.3.2. OPN biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması ..... 72
4.2.3.3. Tekrar üretilebilirlik ..... 72
4.2.3.4. Yapay serumda uygulama ..... 73
**BÖLÜM 5 ..... 75**
**TARTIŞMA ..... 75**
**KAYNAKÇA ..... 82**

# SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**1,4-BDE** : 1,4-Bütandiol diglisidil eter
**BMD** : Kemik Mineral Yoğunluğu
**BSP** : Kemik Sialoprotein
**CPE** : Sabit faz elemanı
**CV** : Döngüsel voltametri
**DEXA** : Çift Enerjili X-ışını Absorpsiyometrisi
**EA** : Etanolamin
**EDC** : 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
**EIS** : Elektrokimyasal impedans spektrokopisi
**ELISA** : Enzim bağlantılı bağışıklık testi
**GLT** : Glutaraldehit
**HPLC** : Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi
**LOD** :Limit of Detection (Algılama limiti- tespit sınırı)
**LOQ** : Limit of Quantitation (Tayin sınırı)
**6-MCH** : 6-Merkaptohekzanol
**4-MPA** : 4-Merkaptofenil asetik asit
**NHS** : N-Hidroksisüksinimit
**OCN** : Osteokalsin
**OP** : Osteoporoz
**OPN** : Osteopontin
**Rct** : Yük transfer direnci
**SAM** : Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
**SIBLING** : Küçük integrin bağlayıcı ligand, N-bağlı glikoprotein

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1.** Sağlıklı bir kemik ile osteoporozlu kemik arasındaki fark ..... 4
**Şekil 2.2.** Kemik metabolizmasının biyokimyasal belirteçleri ..... 6
**Şekil 2.3.** Osteokalsin molekülü ..... 7
**Şekil 2.4.** Osteokalsinin modifikasyonu ..... 8
**Şekil 2.5.** Osteopontin molekülü ..... 11
**Şekil 2.6.** Genel bir biyosensörün yapı ve bileşenleri ..... 15
**Şekil 2.7.** Biyosensör teknolojisinde kullanılan immobilizasyon yöntemleri ..... 17
**Şekil 2.8.** Bu çalışmada geliştirilen OCN biyosensörüne ait döngüsel voltamogram görüntüsü örneği ..... 19
**Şekil 2.9.** Bu tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörüne ait Nyquist eğrisi ..... 20
**Şekil 2.10.** Elektrolit çözeltisi içerisinde bulunan elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli ..... 21
**Şekil 2.11.** Nyquist eğrisinden Rct hesaplanmasında kullanılan impedans elemanları ..... 21
**Şekil 2.12.** SAM (Kendiliğinden toplanan tek tabakalar) oluşumu ..... 23
**Şekil 2.13.** Altın yüzey üzerine tiyol grubu içeren bileşik ile SAM oluşturma ..... 24
**Şekil 2.14.** Patricia Khashayar ve ark. tarafından OCN tayini için geliştirilen biyosensörün immobilizasyon stratejileri ..... 25
**Şekil 2.15.** Sofia G. Meirinho ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörünün dizaynı ..... 27
**Şekil 2.16.** Hongxia Chen ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörü ..... 28
**Şekil 2.17.** Abhinav Sharma ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörü ..... 29
**Şekil 2.18.** Osteokalsin analizi için geliştirilen OCN biyosensörünün SAM oluşum basamağı ..... 30
**Şekil 2.19.** Geliştirilen Osteokalsin biyosensörünün şematik gösterimi ..... 30
**Şekil 2.20.** Geliştirilen OCN biyosensörü üzerine 10-60 pg/µL konsantrasyon aralığında OCN çözeltileri ilave edilerek elde edilen EIS ve CV görüntüleri ..... 31
**Şekil 2.21.** Osteopontin analizi için geliştirilen biyosensördeki SAM tabaka oluşumu ..... 32
**Şekil 2.22.** Geliştirilen Osteopontin biyosensörünün şematik gösterimi ..... 32
**Şekil 3.1.** Hesaplamada kullanılan devre modelleri ..... 37

**Şekil 3.2.** Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı ..... 38
**Şekil 3.3.** Bu tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörünün dizaynı esnasında Anti-OCN molekülünün Au elektrot yüzeyine immobilizasyon basamakları ..... 39
**Şekil 3.4.** Bu tez kapsamında geliştirilen OPN biyosensörünün dizaynı esnasında Anti-OCN molekülünün immobilizasyon basamakları ..... 42
**Şekil 4.1.** OCN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları ..... 47
**Şekil 4.2.** OCN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları ..... 47
**Şekil 4.3.** 6-MCH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 50
**Şekil 4.4.** 1,4-Bütandiol diglisidil eterkonsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi .. 51
**Şekil 4.5.** Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 53
**Şekil 4.6.** Anti-OCN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 54
**Şekil 4.7.** OCN inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi ..... 56
**Şekil 4.8.** 10-60 pg/µL OCN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri ..... 58
**Şekil 4.9.** 10-60 pg/µL OCN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar ..... 58
**Şekil 4.10.** 10-60 pg/µL tayin aralığında OCN biyosensörü kalibrasyon grafiği ..... 59
**Şekil 4.11.** OPN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları ..... 62
**Şekil 4.12.** OPN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları ..... 63
**Şekil 4.13.** 4-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 65
**Şekil 4.14.** EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 67
**Şekil 4.15.** Anti-OPN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi ..... 68
**Şekil 4.16.** 10-60 pg/µL OPN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri ..... 70
**Şekil 4.17.** 10-60 pg/µL OPN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar ..... 71
**Şekil 4.18.** 10-60 pg/µL tayin aralığında OPN biyosensörü kalibrasyon grafiği ..... 71

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 2.1.** Biyosensörlerin iletim ve ölçüm sistemlerine göre sınıflandırılması ..... 16
**Çizelge 4.1.** Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan Rct değerleri ..... 48
**Çizelge 4.2.** 6-MCH konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri ..... 50
**Çizelge 4.3.** 1,4-Bütandiol diglisidil eterkonsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri ..... 52
**Çizelge 4.4.** Etanolamin konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları ..... 53
**Çizelge 4.5.** Anti-OCN konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları ..... 55
**Çizelge 4.6.** OCN inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri ..... 56
**Çizelge 4.7.** OCN biyosensörünün tasarımında kullanılan kimyasal maddelerin optimum değerleri ..... 57
**Çizelge 4.8.** 10-60 pg/µL aralığında OCN biyosensörünün tekrar üretilebilirliği ..... 60
**Çizelge 4.9.** Yapay serum örneklerinde önerilen biyosensörü kullanarak elde edilen OCN ölçümünün sonuçları ..... 61
**Çizelge 4. 10.** Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan Rct değerleri ..... 63
**Çizelge 4.11.** 4-MPA konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri ..... 66
**Çizelge 4.12.** EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri ..... 67
**Çizelge 4.13.** Anti-OPN konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları ..... 69
**Çizelge 4.14.** OPN biyosensörünün tasarımında kullanılan kimyasal maddelerin optimum değerleri ..... 69
**Çizelge 4.15.** 10-60 pg/µL aralığında OPN biyosensörünün tekrar üretilebilirliği ..... 73
**Çizelge 4.16.** Yapay serum örneklerinde önerilen biyosensörü kullanarak elde edilen OPN ölçümünün sonuçları ..... 74

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ

Kemik dokusu aktif ve dinamik özellikleri olan bir dokudur. Kemik dokuda bir yandan yıkım gerçekleşirken, diğer taraftan da yapım işlemi gerçekleşir. Kemik rezorpsiyonunu kemik yapımı takip eder (Parfitt, 1983). Eski kemiğin emilimi ve yeni kemiğin oluşumu (mineralizasyon) yaşam boyunca devam eden bir işlemdir. Kemik doku; organik yapı, inorganik yapı ve hücre dışı matriksi olarak farklı bölümlerden meydana gelir. Kemik, organik yapısında Tip-I Kollajen yapıları ve amorf maddeleri barındırır. İnorganik yapısı hidroksiapatit kristallerinden [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] oluşur. Kristal içerisindeki mineral içeriğinin yaklaşık % 80-90'ı kalsiyum ve fosfordan meydana gelir. Bunların yanı sıra kemikte; sitrat, magnezyum gibi mineraller de bulunmaktadır (Tunçay, 2013). Hücre dışı matriksi içerisinde sialoproteinler, glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi proteinler vardır.

Kemik dokunun yeniden düzenlenmesi farklı hücreler tarafından gerçekleştirilir. Bunlar; kemik oluşumda görevli Osteoblast hücreleri, kemik rezorpsiyonunu sağlayan Osteoklast hücreler ve hücresel bütünlüğü sağlayan mekanosensör görevi üstlenen Osteosit hücreleridir.

Osteoblastlar; kemik yüzeyindeki hücrelerin yaklaşık olarak % 4-6'sını oluşturan ve aynı zamanda kemik yapımını sağlayan hücreler olarak bilinir (Rinaldo, Silva Sasso, Cerri, Simões & Cerri, 2015). Osteoblastlar, kemiğin organik matriksinde yer alan Tip-1 kollajen ve hücre dışı matriks proteinlerinden glikoproteinlerin sentezini sağlarlar.

Osteoblastların etrafında yeni sentezlenen kemik hücreleri, heryeri çevrelediğinde osteoblastlar "lakuna" adı verilen boşluklarının içine girer ve artık "osteosit" olarak adlandırılırlar. Osteositler, kemik dokuda yer alan hücrelerin yaklaşık

olarak % 90-95' ini oluştururlar. Osteositler iletişim kurma ve madde taşıma işlevine sahiptirler. Bu hücrelerin bölünme yetenekleri yoktur (Uchoa, Carneiro & Kelley, 1995). Osteositler, kemik yapım aktivitesinin son safhasını oluştururlar.

Osteoklastlar ise; kemiğin yıkım işleminden (rezorbsiyondan) sorumlu hücreler olup, kandan gelen monosit hücrelerinin birleşmesi ile meydana gelirler. Osteoklastlar çok büyük ve çekirdekli bir yapıya sahiptir, mitokondri ve vakuollerce zengindir (Tresguerres vd., 2006). Osteoklastlar bir takım proteolitik enzimleri (asit kollajenaz) salgılayarak kemik matriksine etki ederler.

Kemik dokusunda bulunan hücreler kemik oluşumunu, rezorpsiyonunu ve korunmasını önemli ölçüde etkiler (Raggatt & Partridge, 2010). Kemik oluşum ve rezorpsiyonu dengede olacak şekilde kemik doku kontrol edilir ve düzenlenir (Seibel, 2005).

Kemik döngüsünün mineralizasyon ve rezorpsiyonu sırasında kana ve idrara bir takım kemik matriks elemanları geçer. Bu elemanlar kemiğin biyokimyasal belirteçleridir. Kemik belirteçleri; osteoblast (yapım) ve osteoklast (yıkım) aktivitesini gösteren belirteçler olarak iki kategoriye ayrılırlar (Seibel, 2005).

Kemik yapım belirteçleri; osteokalsin (OCN), kemiğe özgü alkalen fosfataz (BALP), prokollajen Tip 1 N-Terminal (P1NP), prokollajen Tip 1 C-Terminal (P1CP)'dir.

Kemik yıkım belirteçleri; kemik sialoprotein (BSP), Tip 1 kollajen C-terminal telopeptidi (CTx), Tip 1 kollajenin N-terminal telopeptidi (NTx), hidroksi pirolin, hidroksilizin, deoksipiridinolin (DPD), piridinium çapraz bağlantıları, tartarata dirençli asit fosfataz (TRAP)'dır.

Kemik döngüsünde yaygın olarak kullanılan bu biyokimyasal belirteçler, tedavi sürecinin izlenmesinde ve ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilirler. Kemik metabolizmasının biyokimyasal belirteçleri, kemik dokusunun enzim ve proteinleridir (Vasikaran vd., 2011). Genellikle kan veya idrarda ölçülmektedirler (Hart & Eastell, 1999). Bu belirteçler kemik oluşum ve rezorpsiyonu hakkında da bilgi verirler (Hannon & Eastell, 2006).

Kemiğin dinamik döngüsünde herhangi bir aksaklık söz konusu olduğunda, çeşitli metabolik kemik hastalıkları ortaya çıkmaktadır. Osteoporoz, osteomalazi, paget hastalığı, raşitizm, hipertiroidizm, hiperkalsemi, primer ve sekonder hiperparatiroidi metabolik kemik hastalıkları veya ilişkili hastalıklar arasında yer alır (Albright & Reifenstein, 1948).

Osteoporoz vücuttaki kemikleri etkileyen, en yaygın metabolik kemik hastalıklarından biridir. Osteoporoz herhangi bir belirti vermeden gelişen ve kırık oluşumu ile sonuçlanan bir kemik hastalığıdır. Osteoporoza bağlı olarak meydana gelen kırıkların görülme sıklığı nedeniyle, osteoporoz toplum sağlığı açısından önemli bir hastalıktır. Kırıkların oluştuğu bölgeye göre sakat kalma ve ölümcül kırıkların meydana gelme olasılığı yüksektir. Osteoporoz tedavi edilebilen bir hastalıktır. Bu sebeple tedavi süresince takibinin sağlanması büyük önem taşır.

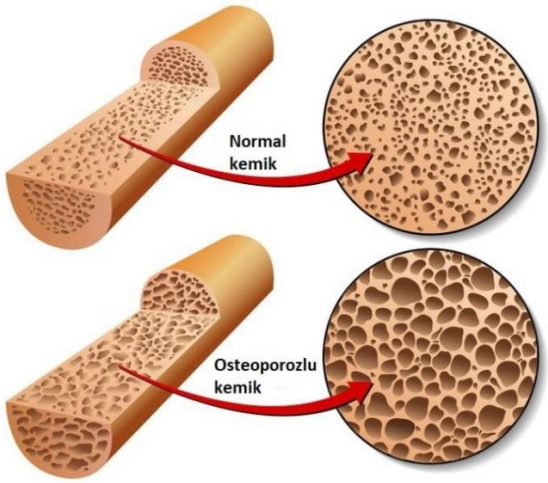
Bu tez çalışmasında; osteoporozun tedavi takibinde kullanılmak üzere alternatif bir yöntem olarak, kemik biyomoleküllerinden osteokalsin ve osteopontin tayini için impidimetrik esaslı osteokalsin ve osteopontin biyosensör sistemleri geliştirilmiştir.

# BÖLÜM 2

# KAYNAK ARAŞTIRMASI

## 2.1.Osteoporoz

Osteoporoz düşük kemik kütlesi, kemiğin mikro-yapısında bozulma ile karakterize edilen ve buna bağlı olarak kırık olasılığında artışa neden olan bir kemik hastalığıdır (Favus, 1993; Edwards, Dennison, Aihie Sayer, Fielding & Cooper, 2015).




**Şekil 2.1.** Sağlıklı bir kemik ile osteoporozlu kemik arasındaki fark ("Kemik erimesi," 2019)

Osteoporoz gerçekleştiğinde Şekil 2.1'de gösterildiği gibi kemik mikroyapısında değişimlerle kemik kütlesinde azalmalar meydana gelir. Fakat bu durum belirti vermeden sessizce gelişir, buna bağlı olarak kemik kayıpları başlar ve kırıklar oluşur.

Osteoporozun dünya çapında yaklaşık 200 milyon insanı etkilediği düşünülmektedir (Khashayar, Aghaei Meybodi, Homami, Heshmat & Larijani, 2010). Dünyada her üç kadından biri, 50 yaşın üzerindeki beş erkekten biri osteoporotik kırık yaşamaktadır (Odén, McCloskey, Kanis, Harvey & Johansson, 2015). Özellikle post-menapozal dönemdeki kadınlar ve yaşlı erkekler riskli gruplar içerisinde yer alır (Okano vd., 1998; Cosman vd., 2014). Yaş ve cinsiyetin yanısıra önceden geçirilmiş kırık öyküsü, sigara içme, aşırı alkol tüketimi, osteoporoza neden olabilecek bir takım ilaçların kullanımı, düşme yatkınlığı, fiziksel aktivite seviyesi, beslenme bozuklukları, kas zaafiyeti, D vitamini eksikliği olanlar da riskli gruplar içerisinde sınıflandırılır (Raisz, 2005).

Kemik kütlesi çocukluktan ergenlik dönemine kadar şekillenmektedir. Çocukluk çağındaki kemik mineralizasyonu kritik bir dönemdir. Bu dönemdeki çocukların, dinamik döngüdeki herhangi bir olumsuzluk (yanlış beslenme, bazı ilaçların tüketimi, sigara-alkol tüketimi vs) yaşaması, onları osteoporoz ve kemik kırklarına eğilimli yapabilir (Kokabu, Lowery & Jimi, 2016). Türkiye'de yapılmış olan bir çalışmaya (FRAKTÜRK) göre 50 yaş ve üzerindeki bireylerin % 25'inde osteoporoz saptanmıştır (Tüzün, Eskiyurt, Akarırmak, Sarıdoğan & Şenocak, 2012).

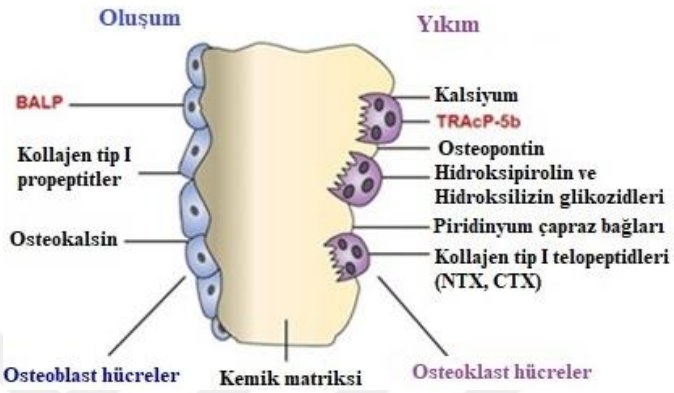
Osteoporoz hastalığının en önemli belirtisi kemik kırıkları olup, bu durum ölümcül olabilmektedir. Erken teşhis edildiği takdirde önlenebilir ve tedavi edilebilir olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

### 2.1.1. Osteoporoz Tanısı

Osteoporoz tanısında kemik mineral yoğunluğu (BMD) ölçümü ve Çift enerjili X-ışını absorpsiyometrisi (DEXA) sık kullanılan yöntemlerdir (Luting & Thomas, 2016). Fakat bu tekniklerin bir takım sınırlamaları mevcuttur. Teknolojilerinin maliyetli oluşu ve zaman alıcı olması bu sınırlamalardandır. Bu durum; hızlı bir kemik metabolizması ölçüm yönteminin önemini açığa çıkarır (Pagani, Francucci & Moro, 2005).

Kemik döngüsünün durumu, biyokimyasal belirteçler ölçülerek takip edilir. Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri, kemik metabolizmasının durumunu

yansıtarak gerçek zamanlı olarak kemik durumunu gösterebilir. Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerinin seviyeleri, primer ve sekonder osteoporozun ayırıcı tanısını yapmak, tedavi yöntemini belirlemek ve özellikle antirezorbtif tedavinin etkinlik sürecini değerlendirmek amacıyla ölçülür (Seibel, Robins & Bilezikian, 2006).




**Şekil 2.2.** Kemik metabolizmasının biyokimyasal belirteçleri (Fohr, Dunstan & Seibel, 2003)

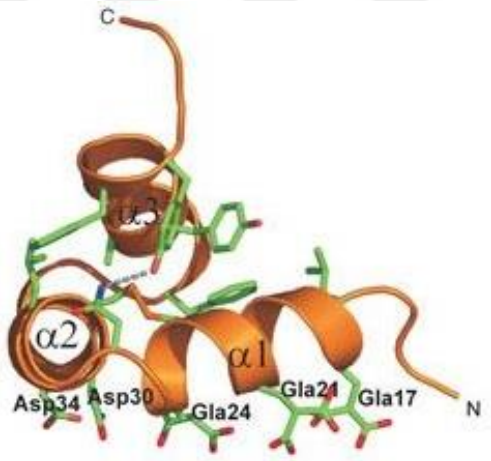
Kemik döngüsünün yapım ve rezorbsiyonundan sorumlu biyokimyasal belirleyicileri Şekil 2.2'de verilmiştir. Bu biyokimyasal belirteçler, kemiğin yeniden şekillenmesinin dinamik (anlık) ölçümünü sağlayarak kemik kütlesindeki değişimlerin seyrini tahmin etmede yararlanılacak yüksek potansiyele sahiptirler. Bu belirteçlerin miktarlarının tayini, tek başlarına tanı koymada yeterli değildir ancak tedavinin takibinde oldukça kullanışlı olabilirler. Ayrıca tedaviye karşı alınan cevabı değerlendirmede BMD'ye nazaran daha kısa sürede yanıt alınmasını sağlarlar.

Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerinin miktar tayinini gerçekleştirmek için günümüzde yaygın olarak kullanılan ELISA, RIA, HPLC gibi yöntemler mevcuttur. Yüksek doğruluklarına rağmen bu teknikler hem maliyetli hem de büyük (hantal) cihazlarla yapılmaktadır. Aynı zamanda zaman alıcıdırlar ve teknik eğitimli personele ihtiyaç duyarlar. Son zamanlarda biyosensörlerdeki teknolojik ilerlemeler, kemiğin metabolik durumunun değerlendirilmesinde biyosensör teknolojisinin potansiyelini ortaya koymaktadır. Böylece kemiğin takibi için hızlı, güvenilir ve yüksek hassasiyetli biyosensörler geliştirilmektedir.

Bu tez kapsamında kemik belirteçlerinden Osteokalsin (OCN) ve Osteopontin (OPN) molekülü tayini için hassas, hızlı ölçüm yapabilen biyosensörler geliştirmek amaçlanmıştır.

## 2.2. Osteokalsin

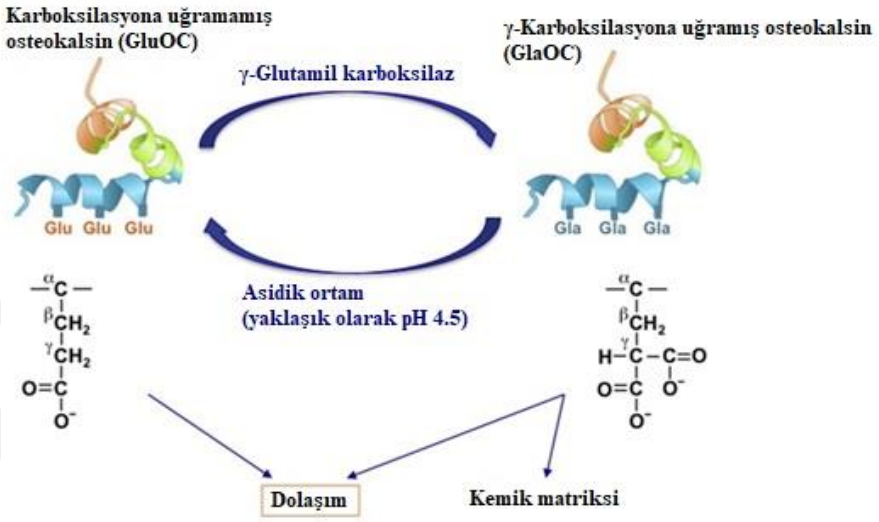
Osteokalsin (OCN) kemikte en bol bulunan, kollajen olmayan bir proteindir (Hauschka, Lian, Cole, Gundberg, 1989). Şekil 2.3'te yer alan osteokalsin osteoblastlar tarafından sentezlenen 49-aminoasit (5.8 kDa) uzunluğuna sahip bir proteindir (Hoang, Sicheri, Howard & Yang, 2003).




**Şekil 2.3.** Osteokalsin molekülü (Hoang vd., 2003)

Osteokalsin sentezi için D3 vitamini tarafından uyarılarak ortama gelen K vitamini gereklidir (Hauschka vd., 1989). Şekil 2.4'te görüldüğü gibi, K vitaminine bağlı olarak "γ-glutamil karboksilaz" katalizörlüğünde osteokalsinin 17, 21 ve 24. pozisyonlardaki glutamat (GluOc) kalıntıları γ-karbonlarından karboksillenir (Şekil 2.4). Yeni sentezlenen osteokalsinin küçük bir kısmı dolaşıma sekrete edilir ve moleküllerinin çoğu kemiğin inorganik kısmına (hidroksiapatite) bağlanarak kemik matriksinin içine girer (Colford, Sailer & Langman, 1997). Bu γ-karboksilasyon modifikasyonuyla artan negatif yük, proteinin α-heliks yapılarını daha kararlı hale getirir, kalsiyum ve hidroksiapatit için yüksek afinite sağlar. Bu durumun tersine, düşük

pH matriksteki karboksillenmiş osteokalsin (GlaOc) molekülünün dekarboksilasyonuna izin verir. Elde edilen dekarboksile osteokalsin (GluOc) genel dolaşıma girer (Mizokami vd., 2017).




**Şekil 2.4.** Osteokalsinin modifikasyonu (Mizokami, Kawakubo-Yasukochi & Hirata, 2017)

### 2.2.1. Osteokalsinin Fonksiyonu

Osteokalsin D vitamini sentezini arttırır. Kalsiyum iyonlarını bağlayarak kemik kalsifikasyonunda rol oynar. Kemik rezorpsiyonu sırasında matriksten dolaşıma salınır ve bu nedenle bir kemik döngüsü işareti olarak kabul edilir (Nimptsch vd., 2007). Osteokalsin belirtecinin serumdaki seviyesi bazı patolojik durumlarda artıp azalabilmektedir.

Menopozda osteokalsin miktarında da artış gözlemlenir. Menopozda kemik kaybının artışının temel nedeni östrojen eksikliğinden kaynaklanır. Yumurtalık fonksiyonlarının yitirilmesi sonucu sonraki yıllarda meydana gelen kemik rezorbsiyonu ile formasyonu (yapımı) arasındaki dengesizlik, kemik rezorbsiyonunda belirli bir artıştan sorumludur. Bu durum özellikle postmenopozal kemik kaybına neden olur ve OCN seviyesi kanda artar (Garnero, Rendu, Chapuy & Delmas, 1996).

Hipertiroidizmdeki yapısal ve işlevsel kemik değişiklikleri biyokimyasal kemik oluşum belirteçlerinden osteokalsin ve alkalin fosfataz (ALP)'nin serumda artan seviyeleri ile ilişkilidir (MacLeod vd., 1993). Osteoblast hücrelerinin yüzeyinde tiroid hormonları tarafından uyarılan ve Nükleer T3 olarak adlandırılan reseptörler bulunmaktadır. Tiroid hormonlarının normalden daha yüksek düzeyde çalışmaları durumunda, osteoblastların da uyarılıp aktivitelerinin arttığı ve buna bağlı olarak OCN salınımının da artacağı bildirilmektedir (Rizzoli, Poser & Bargi, 1986). Başka çalışmalarda da hipertiroidi hastalarında anlamlı bir osteokalsin artışı olduğu bildirilmiştir (Siddiqi vd., 1997; Lee vd., 1990).

Yüksek miktardaki osteoklastik rezorpsiyon, Multiple Miyeloma (MM) hastalığının olağan özelliğidir. Osteoklastik aktivitenin olduğu durumlarda, kollajen sentezi inhibe edilir. Kollajen sentezini inhibe eden faktörlerin, aynı zamanda osteoklastları aktive eden faktörlerler olduğu tespit edilmiştir (Bataille, Delmas & Sany, 1987). Multiple Miyeloma'lı hastalarının büyük çoğunluğunda yüksek osteoklastik aktivite mevcutken, osteoblastik aktivitenin de inhibe edilebileceği düşünülmektedir. Yapılan analizlerde OCN miktarının da düşmesi bu düşünceyi doğrulamaktadır.

Akromegali, kemik metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan büyüme hormonunun (GH) ve hipofiz tümörüne bağlı büyüme faktörü-I'in (IGF-1) aşırı salgılanmasından kaynaklanan kronik bir hastalıktır. Büyüme hormonu çocuklarda kemik doku büyümesini uyarırken, erişkinlerde metabolizmayı kontrol eder. Büyüme hormonu fazlalığı, kemik belirteçlerinin değişmesiyle tanımlanan kemik dönüşümünün artmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda büyüme hormonu eksikliği olan yetişkinlere uygulanan tedavi süresince osteokalsin düzeylerinin anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir (Killinger, Kužma, Sterančáková & Payer, 2012).

Osteokalsin, P1NP ve kemiğe özgü alkalen fosfataz (B-ALP) dahil olmak üzere, dolaşımdaki biyokimyasal belirteçlerin Tip 2 diyabette azaldığı görülmüştür. Bu belirteçlerin kemik mineral yoğunluğundan (BMD) bağımsız olarak kemikteki kırılmaları öngördükleri belirlenmiştir (Rubin, 2015). Başka çalışmalarda da Tip 2 diyabette osteokalsin miktarının azaldığı belirlenmiştir (Ardawi vd., 2013).

Cushing Sendromu'nda iskelet sisteminin yapısal ve fonksiyonel olarak bozulması sözkonusudur. Cushing Sendrom'lu hastaların yaklaşık olarak % 30-50'si

osteoporoz hastalarının % 50'siyle uyumlu kırıklar yaşadığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu Cushing Sendrom'lu hastaların serum osteokalsin ve alkalin fosfataz seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Mancini, Doga, Mazziotti & Giustina, 2004).

Paget hastalığı (Osteitis deformans) yaşlılıkla ortaya çıkan bir kemik hastalıktır. Genellikle belirti vermeyen sessiz seyreden bir hastalık olmasına karşın kemik büyümesi veya etkilenen bölgelerdeki deformasyon sonucu ağrıya neden olabilir. Yapılan çalışmalar Paget hastalarında, serum osteokalsin seviyelerinin 3 kat arttığını göstermektedir (Gundberg, Lian, Gallop & Steinberg, 1983).

Patolojik durumların dışında sağlıklı bir bireyde serum osteokalsin seviyesi cinsiyete ve yaşa göre değişkenlik göstermektedir.

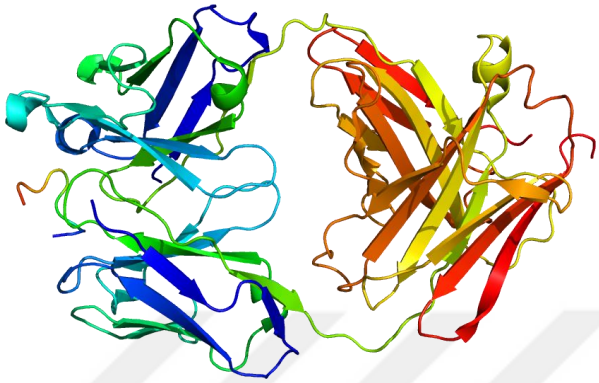
Osteokalsinin doku özgünlüğünün olması, kemik döngüsünün değerlendirilmesinde kullanılması için avantajdır (Power & Fottrell, 1991). Bu nedenle OCN osteoporoz riskini değerlendirmek ve tedavi yanıtlarını izlemek için kullanılacak spesifik ve duyarlı bir belirteçtir (Jagtap, Ganu & Nagane, 2011).

### 2.3. Osteopontin

Osteopontin ilk kez 1979'da Senger tarafından tanımlanmış (Senger, Wirth & Hynes, 1979), hücre dışı yapısal bir proteindir. Kollajen olmayan önemli bir kemik matriks proteinidir (Rittling & Chambers, 2004). Kemiğin organik bir bileşeni olup kemiklerde ve dişlerde bulunan SIBLING (küçük integrin bağlayıcı ligand, N-bağlı glikoprotein) ailesine ait mineral bağlayıcı matriks proteinleri sınıfından bir proteindir. SIBLING protein ailesi, mineralleşmiş dokularda yer alan kollajen olmayan protein grubudur. Beş SIBLING gen aile üyesi bulunmaktadır. Bunlar; kemik sialoprotein (OPN), osteopontin (OPN), dentin matris proteini 1 (DMP1), matris hücre dışı fosfoglikoprotein (MEPE) ve dentin sialofosfoprotein (DSPP).

Osteopontin; 314 aminoasitten (32.5 kDa) oluşan bir protein olup (Sivakumar & Devaraj, 2014), yapısında yüksek oranda aspartik asit ve glutamik asit gibi negatif yüklü aminoasitler ihtiva eder (Fisher & Fedarko, 2003). Aktive edilmiş makrofajlar, T lenfositler ve lökositler tarafından salgılanan fosforillenmiş bir glikoproteindir (Rodrigues vd., 2007).Vücutta salgılanan OPN, değişken olarak fosforile edilir ve vücut

sıvılarında birikir. Kemiğin inorganik kısmı olan hidroksiapatite yüksek afinitesinin olması, kemikte ve diğer mineralizasyon bölgelerinde birikimine neden olur (Rittling & Chambers, 2004).



**Şekil 2.5.** Osteopontin molekülü (“Osteopontin”, 2018.)

Osteopontin’in kemik dokusunun yeniden düzenlenmesinde görev aldığı, epitel dokulardaki kalsiyum kristallerinin büyümesini ve birikmesini azalttığı bildirilmektedir (Wesson vd., 2003). Kemiğin tanımlanmasından bu yana osteopontin biyomolekülünün, tümör ilerlemesi ve metastazını kontrol eden hücre sinyal düzenlemesinde de önemli bir rolü olduğu belirtilmektedir (Rangaswami, Bulbule & Kundu, 2006). Şekil 2.5’te OPN molekülünün üç boyutlu gösterimi yer almaktadır.

Osteopontin; hücre dışı sıvılarda, iltihaplanmanın bulunduğu bölgelerde ve hücre dışı mineral matrislerinde bulunur (Rodrigues vd., 2007). OPN, hücre dışı matrisinin bileşenlerinden biri olmasının yanısıra çözünür bir sitokin olarak da kabul edilmektedir.

Osteopontin, CD44 gibi çeşitli hücre yüzey reseptörleri ve birkaç integrin ile etkileşime girer. Osteopontin’in hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması ve etkileşime girmesi ile hücre yapışması, hücre göçü ve spesifik sinyal fonksiyonlarının uyarılmasına neden olduğu bildirilmektedir (Rodrigues vd., 2007).

### 2.3.2. Osteopontinin Fonksiyonu

Kemikte osteopontin; monomer ve yüksek molekül ağırlıklı polimer olarak bulunur. Osteopontin kemik rezorpsiyonu, immün hücrelerin aktivasyonu ve apoptozu inhibe etme gibi birçok hücresel olayda rol oynamaktadır (Kazanecki, Uzwiak & Denhardt, 2007). Osteopontin monomerik durumda mineralizasyon alanlarında bolca bulunan güçlü bir mineralizasyon inhibitörüdür. Bunun dışında farklı yerlerde osteopontinin post-translasyonel modifikasyonu sonucu hücre yapışmasını, kalsiyum sekresyonunu, hücre göçünü ve kristal büyümesini düzenleme gibi rolleri de vardır (Sodek, Ganss & McKee, 2000; Hunter, 2013).

Osteopontin, farklı morfolojik biçimlerde olabilen yani pleomorfik ve immünolojik aktiviteye sahip bir proteindir (Forton, Petri, Goldman & Sullivan, 2002). OPN, iltihaplanma ve enfeksiyöz hastalıklara bağışıklık sağlamada rol oynayan pleiotropik fonksiyonlar sergiler (Denhardt vd.,1993; O'Regan vd., 2000). Pleiotropik fonksiyonlar (tek bir genin birden fazla karakterden sorumlu olması) sergileyen OPN için çok sayıda transkripte multipl sklerozlu (MS) hastaların beyinlerinde rastlanmıştır (Niino, Kikuchi, Fukazawa, Yabe & Tashiro, 2003). Literatürde yer alan çalışmalar OPN'nin ayrıca doku onarımı ve inflamasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan anahtar bir sitokin olarak görev yaptığını tespit etmişlerdir (Fisher, Torchia, Fohr, Young & Fedarko, 2001). OPN geni, bakteriyel enfeksiyonlar sırasında (48 saat içinde) T hücrelerinde erken eksprese edilir ve protein ürününün makrofajlarla etkileşimi, enflamatuar tepkilere neden olabilir (Singh, Patarca, Schwartz, Singh & Cantor, 1990).

OPN, kemiğin yeniden yapılanması işleminde görev alır (Dodds vd., 1995). Kemik hücreleri, kemiğin yeniden yapılanması işlemi sırasında OPN salgılarlar (Choi vd., 2008). OPN'nin osteoklastlardaki görevi, osteoklast hücrelerini, kemiklerin mineral matriksine tutturmasını teşvik eder (Reinholt, Hultenby, Oldberg & Heinegård, 1990). Aynı zamanda kemik yıkımı sırasında hücre yapışmasını ve kemotaksiyi arttırmayı sağlamaktadır (Chellaniah vd., 2003).

Osteopontin tüm vücut sıvılarında bulunur ve aşırı ekspresyonu meme kanseri ve metastaz ile de ilişkilidir (Macrì vd., 2009). OPN'nin aşırı ekspresyonu, metastatik olmayan iyi huylu hücrelere metastatik fenotip verebilir. OPN ekspresyonunun artışı tümör ilerlemesi ile bağlantılıdır. Tümör oluşumu ve metastaz durumlarında OPN'nin

ciddi miktarlarda arttığı görülmüştür. Bu nedenle, OPN'nin göç ve matris parçalanmasını uyarma kabiliyeti, tümör hücrelerinin metastatik potansiyeline katkıda bulunabilir (Lund, Giachelli & Scatena, 2009). OPN ayrıca, tümör hücrelerinin apoptozunu inhibe ederek tümör oluşumunu ve metastazı da teşvik edebilir (Zhao vd., 2008).

Lökositler tarafından eksprese edilen birçok integrin reseptörüne bağlanan OPN'ler; makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler ve değişen kinetikleri olan T ve B hücreleri de dahil olmak üzere bir dizi immün hücrede eksprese edilir (Wang & Denhardt, 2008). OPN'nin farklı şekillerde immün modülatör olarak hareket ettiği gözlemlenmiştir (Wang & Denhardt, 2008).

OPN, T hücrelerinin ve makrofajların aktivasyonundan kaynaklanan hücre ölümlerini, bunun yanısıra zararlı uyaranlara maruz kalan fibroblastları ve endotelyal hücreleri bloke eder (Denhardt, Noda, O'Regan, Pavlin & Berman, 2001).

OPN'nin makrofaj kemotaktik faktör olarak da rol oynadığı belirlenmiştir (Burdo, Wood & Fox, 2007). Bu çalışmada, araştırmacılar, rhesus maymunlarının beynindeki makrofajların birikimini incelemiş ve OPN'nin makrofajların birikim bölgesinden ayrılmasını önlediğini ve daha yüksek bir kemotaksis seviyesine işaret ettiğini belirlemişlerdir.

Yapılan bazı çalışmalar OPN'nin aterosklerotik lezyonlarda makrofaj birikimini ve tutulmasını desteklediğini, böylece hastalığın kronikliğine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Matsui vd., 2003).

OPN, implantasyon sırasında endometrial hücrelerde eksprese edilir. İmplantasyon sırasında salgılanan progesteron, gebelik süresince salgılanmaya devam eder. Progesteron salgılanmasının nedeni, rahimi gebelik boyunca korumaktır. OPN'nin düzenlenerek bu sürece yardımcı olduğu tespit edilmiştir (Johnson, Burghardt, Bazer & Spencer, 2003).

OPN, bağışıklık sistemini birçok farklı seviyede düzenler. OPN, inflamatuar hücrelerin hasarlı (yara) bölgesine göçünü arttırmak için kemotaktik bir molekül görevi görür ve hücreleri göç ettikleri bölgede tutmak için yapışkan bir protein görevi görür (Weber vd., 2002).

Tüm bu bilgilerin ışığında, çeşitli hastalıklar durumunda potansiyel bir belirteç olarak kullanılabilen OPN belirtecinin serumdaki düzeyinin tespiti çok önemli bir yer tutmaktadır. Klinik olarak osteopontin tayini ELISA metodu ile yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında Osteokalsin ve Osteopontin moleküllerinin miktar tayini için elektrokimyasal impedans esaslı (EIS) iki farklı biyosensör geliştirilmiştir.

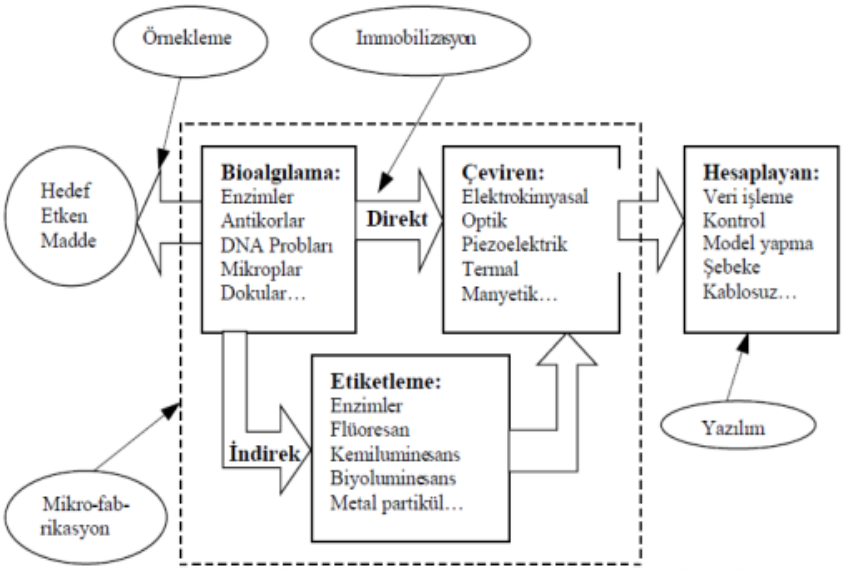
## 2.4. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik yanıtı fizikokimyasal dedektör yardımı ile algılanabilecek elektriksel bir sinyal haline dönüştürmeyi sağlayan ölçüm sistemleridir (Şekil 2.6).

Biyosensörler, analizlenecek madde ile spesifik olarak reaksiyona giren biyoaktif bileşenin etkileşmesi sonucu ortaya çıkan sinyali ileten ve bir dönüştürücü (transduser) düzenek yardımıyla sinyali güçlendirerek ölçen sistemlerin birleştirilmesiyle oluşur. Dönüştürücünün amacı, biyolojik tanıma olayını ölçülebilir elektrik sinyaline dönüştürmektir (Tüylek, 2017).

Tasarlanan biyosensörler biyobileşen ve fiziksel bileşenler olarak bünyelerinde farklı madde ve sistemler barındırırlar. Biyoreseptör olarak; antikor, enzim, protein, nükleik asitler gibi biyolojik moleküller ya da hücre, doku ve mikroorganizma gibi canlı biyolojik sistemler kullanılabilir (Scott, Wolchok & Old, 2012).

Biyoaktif bileşenleri tespit eden ve onlara özgü ilgileri olan maddelerin etkileşimi sonucu açığa çıkan sinyallerin ölçülmesi ve iletilmesi sırasında bir takım elektronik düzenekler kullanılır.




**Şekil 2.6.** Genel bir biyosensörün yapı ve bileşenleri (Li, 2006)

Biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyalleri, fiziksel bileşene tespit edilebilir sinyal gönderir. Bazı uygulamalarda biyolojik sinyalleri güçlendirmek adına, etiketlere ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu etiketler; enzimler, floresan (kimyasal, biyolojik ışıma) ve metal partiküller olabilir.

Biyoalgılama materyalini fiziksel bileşene bağlamak için etkin bir immobilizasyon tekniğinin kullanılması gerekir.

Ayrıca teknolojinin gelişmesiyle birlikte, mikro seviyede fabrikasyon ve yazılıma ihtiyaç duyulmaktadır. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi biyosensörlerde örnekleme, dönüştürme, algılayıcı ve hesaplama ara yüzeyi içeren sistemler olmalıdır.

Biyosensör teknolojisi, sağlık, kimya, biyoloji, mühendislik gibi disiplinler arası bir yaklaşım üzerine inşa edilmiştir.

Herhangi bir biyosensör sisteminde analit tanıma, sinyal iletimi ve okuma işlemleri sıralı olarak gerçekleşir. Özgünlüğü, hızı, taşınabilirliği, düşük maliyeti, doğru ve hassas ölçüm sistemleri olmaları nedeniyle biyosensörler; acil servis taraması, yatak başı hasta izleme veya evde kendi kendine test yapabilme gibi çok sayıda merkezi olmayan klinik uygulamalar için fırsatlar sunmaktadır.

### 2.4.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

#### 2.4.1.1.Biyoaktif Tabakada Kullanılan Biyobileşen Türüne Göre Biyosensörler

1. Enzim temelli
2. Doku temelli
3. DNA temelli
4. Antikor/Antijen temelli (immünobiyosensörler)
5. Mikrobiyal kökenli

#### 2.4.1.2. İletim ve Ölçüm Sistemleri Arasındaki İlişkiye Göre Biyosensörler

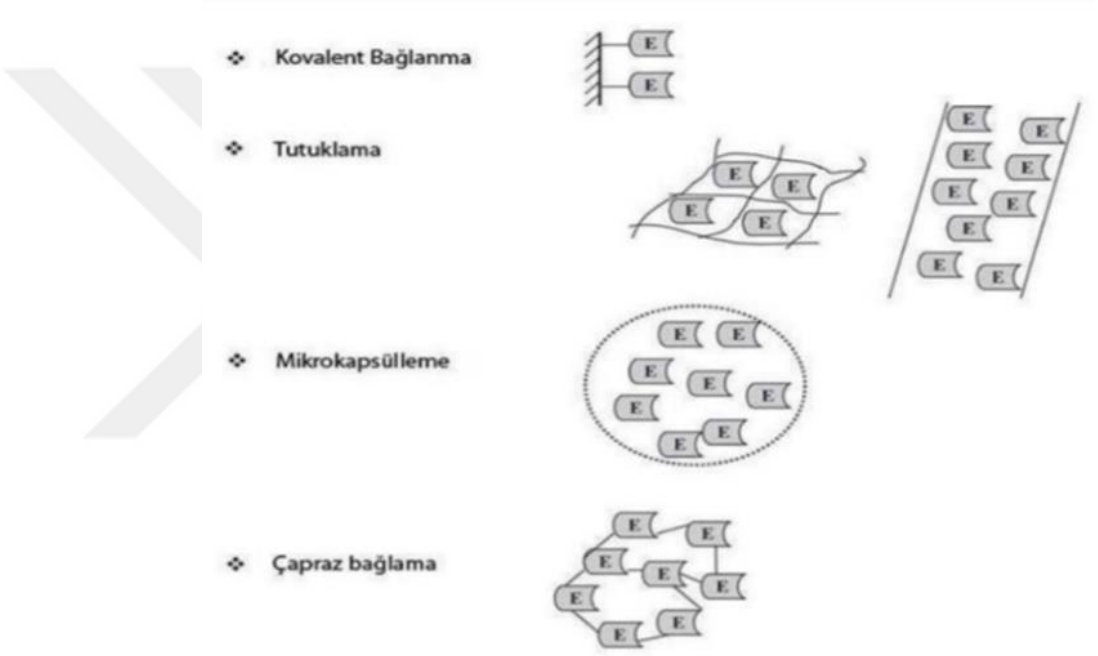
İletim ve ölçüm sistemlerine göre Optik, Elektrokimyasal, Kütle hassasiyeti temelinde sınıflandırılabilirler (Gutés, Céspedes, Alegret & del Valle, 2005). Bu ölçüm esasları doğrultusunda, biyosensör sistemleri iletim ve ölçüm sistemleri arasındaki ilişkiye bağlı olarak Çizelge 2.1'deki gibi ayrıntılı olarak sınıflandırılır.

**Çizelge 2.1.** Biyosensörlerin iletim ve ölçüm sistemlerine göre sınıflandırılması (Tüylek, 2017)

| **Biyosensörler** | **Sınıflandırma** |
|---|---|
| Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler | Amperometrik Esaslı Biyosensörler (Elektrotlar) |
| | Potansiyometrik Esaslı Biyosensörler (Elektrotlar) |
| | Yarı İletken (Kondüktometri) Esaslı Biyosensörler (Transistörler) |
| Optik Esaslı Biyosensörler | Fotometri Esaslı Biyosensörler (Optik Lifler) |
| | Fluorometri Esaslı Biyosensörler (Optik Lifler) |
| | Biyolüminesans Esaslı Biyosensörler (Optik Lifler) |
| Kalorimetri Esaslı Biyosensörler | Termistörler (Isı, İzotermal, İzoperibol) |
| Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler | Piezoelektrik Kristaller |

## 2.5. Biyosensör Hazırlanmasında Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemleri

Analizi yapılacak olan örneğe uygun biyoreseptör ve fiziksel bileşen seçildikten sonra biyoreseptör fiziksel bileşene sabitlenmelidir. Bu amaçla, bilinen immobilizasyon yöntemleri kullanılır. Biyosensör teknolojisinde biyoreseptörü immobilize etmek için kullanılan temel yöntemler Şekil 2.7'de görüldüğü gibi; Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama), Kovalent Bağlama, Tutuklama ve Çapraz Bağlama yöntemleridir (Guisán, 2006).




**Şekil 2.7.** Biyosensör teknolojisinde kullanılan immobilizasyon yöntemleri (Brena, González-Pombo & Batista-Viera, 2013)

Biyosensörün kullanım ömrü immobilizasyon işlemiyle biyoreseptörün fiziksel bileşen yüzeyinde ne kadar süre tutulabildiğine bağlı olduğundan, seçilen immobilizasyon yöntemi biyoreseptörün uzunca bir süre iletici yüzeyden ayrılmasını engelleyebilecek güçte bağlanma sağlamalıdır.

## 2.6. Elektrokimyasal Temelli Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanıma elemanını uygun bir fiziksel bileşene immobilize edip, gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar sonucu analitin konsantrasyonu ile ilgili elektrik sinyali üreterek biyolojik tanıma olayını anlamlı bir cevaba dönüştüren biyosensör çeşididir. Genel olarak biyokimyasal reaksiyonlar sonucu meydana gelen biyolojik tanıma olayını kantitatif amaçlı amperometrik veya potansiyometrik bir cevaba dönüştürür.

### 2.6.1.Amperometrik biyosensörler

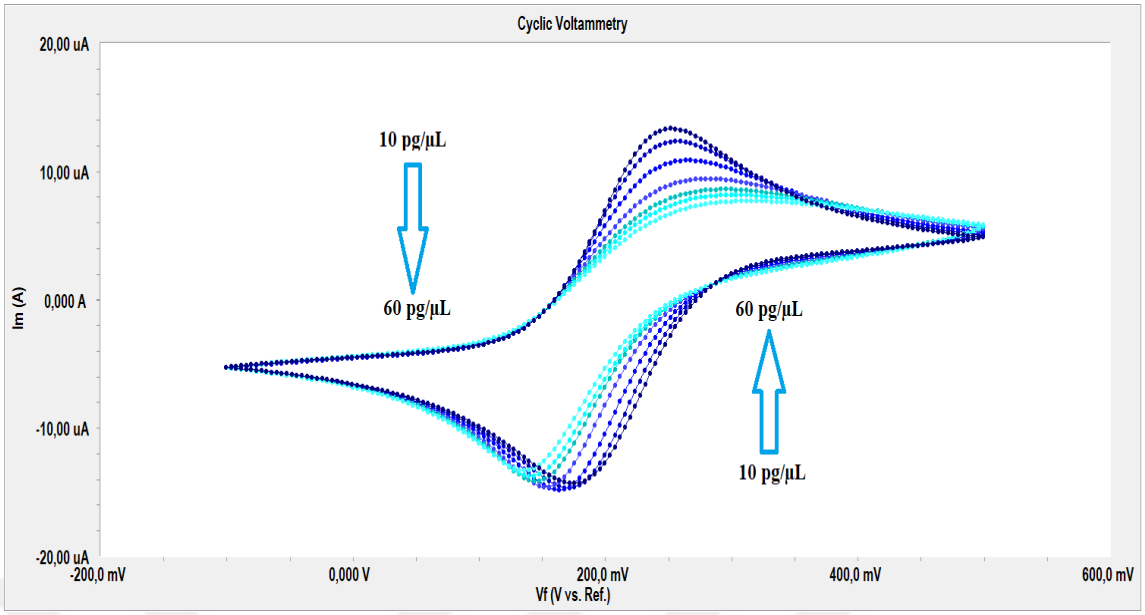
Amperometrik biyosensörler sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanmaktadır. Sabit bir potansiyelde yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak akımın değişimini ölçen sistemlerdir (Uyar, Güven, Artıktay, 2018).

### 2.6.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörler çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümü esasına dayanmaktadır. Elektrot potansiyeli belirlendiğinde analit konsantrasyonu da belirlenmiş olur. Potansiyometrik bir biyosensör eldesi için çalışma elektroduna apolar membran ile biyolojik bir bileşen eklenmelidir (Ege Üniversitesi, 2017).

## 2.7. Döngüsel Voltametri (CV)

Döngüsel voltametri durgun bir çözeltideki elektrodun akım cevabının, dalga şekilli potansiyel ile uyarılıp ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Potansiyel tarama Şekil 2.8'deki gibi döngüsel olarak gerçekleştirilir. Bu işlem uygulanırken, akım zamanının bir fonksiyonu olarak kaydedilip ve tarama defalarca tekrarlanabilir.




**Şekil 2.8.** Bu çalışmada geliştirilen OCN biyosensörüne ait döngüsel voltamogram görüntüsü örneği

## 2.8. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

İmpedans, akıma karşı gösterilen direnç olarak tanımlanır. İmpedans genellikle küçük genlikli bir potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. Bir sistemin impedansı (Z) aşağıda verilen formüldeki gibi belirlenir:

$$\boldsymbol{Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi f t)}{I_0 \sin(2\pi f t + \emptyset)} = \frac{1}{Y}}$$

Formülde ;

Z : İmpedans

V (t) : Potansiyel

I (t) : Akım

*f* : Frekans

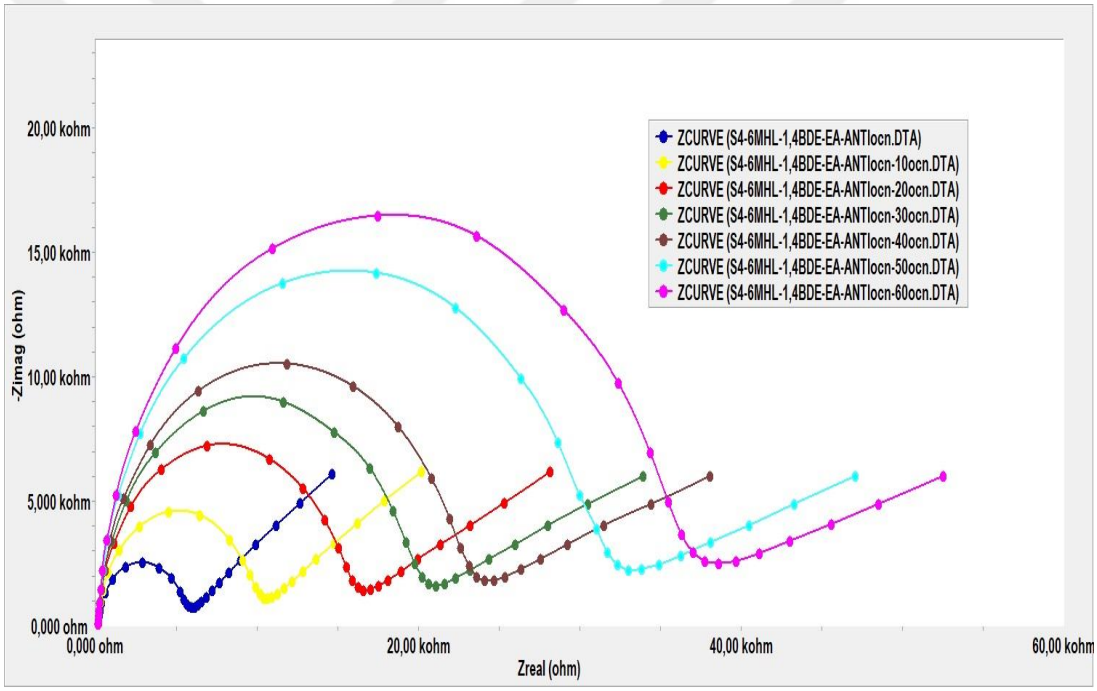
*t* : Zaman

φ : Potansiyel-akım arasındaki faz kayması

Y : Kompleks iletkenlik (Telefoncu, 1999)

İmpedans spektroskopisi, impedansın farklı frekansları tayin edebilme durumundan oluşmaktadır. Bu sayede bir impedans spektrumundan, yüzeylerin ve tabakaların karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır.

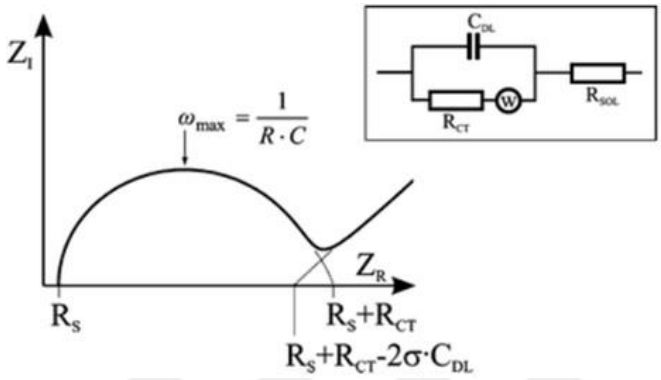
Bir impedans ölçümünün sonuçları Nyquist eğrisi kullanılarak yapılabilir. Şekil 2.9'da bu tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörü ile ilgili çalışmadan elde edilen bir Nyquist eğrisi örnek olarak verilmiştir. İmpedans, gerilim (zaman) ve akım (zaman) fonksiyonlarına bağlı olarak tanımlanan karmaşık bir parametredir. Böylece, yüzeylerin karakterizasyonunun yanı sıra değişim ve yayılma süreçlerini takibe izin veren bir impedans spektrumu elde edilir.




**Şekil 2.9.** Bu tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörüne ait Nyquist eğrisi

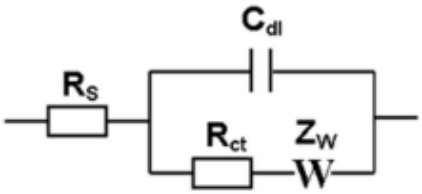
İmpedans spektrumu için sıklıkla eşdeğer bir devre modeli kullanılarak analiz gerçekleştirilir. Genellikle direnç ve kapasitanslardan meydana gelen bu devre, araştırılan sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini temsil eder (Instrumentation and Electroanalytical Chemistry, 2003).

Elektrolit çözelti ile temas halinde olan bir elektrotun durumu için, Randles devresi kullanılır (Şekil 2.10). Şekilde yer alan R: Çözelti direnci, Rct: Yük transfer direnci, Cdl: Çift katman kapasitansı ve W: Warburg impedansını ifade etmektedir.




**Şekil 2.10.** Elektrolit çözeltisi içerisinde bulunan elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli (Sezgintürk, 2012)

Rs ve Rct değerlerinin Nyquist eğrisinden hesaplanmasında kullanılan impedans elemanları Şekil 2.11'de yer almaktadır.




**Şekil 2.11.** Nyquist eğrisinden Rct hesaplanmasında kullanılan impedans elemanları (Zia & Mukhopadhyay, 2016)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) moleküler etkileşimlerin elektrokimyasal ölçümleri için ve çeşitli biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılır. EIS'nin geleneksel uygulamaları, protein-protein etkileşimlerini kaydetmek için elektro-immobilize edilmiş antikorları kullanan (Barton, Davis & Higson, 2008) veya karmaşık biyolojik ortamlarda antibiyotikler gibi daha küçük molekülleri (Tsekenis vd., 2008) saptamak için hazırlanan immünosensör protokollerini kapsar.

İmpedans spektroskopisi, bir sistemin karmaşık elektrik direncini analiz etmek için kullanılan güçlü bir yöntemdir ve yüzeydeki değişimlere duyarlıdır. Biyosensörler alanında, fiziksel bileşen yüzeyindeki bağlanma olaylarının saptanması için özellikle uygundur. Biyolojik tanıma işlemlerinin saptanmasının yanı sıra, fiziksel bileşen üzerindeki biyomoleküllerin immobilizasyonu sırasında ortaya çıkan yüzey modifikasyonlarını karakterize etmek için de değerli bir araçtır.

EIS'in başlıca avantajları, gerçek zamanlı algılama kabiliyetinin olması, yüzeylere uygulanan potansiyel sonucu bütünlüğü bozmayan çok küçük bir elektroanalitik ölçüm tekniğidir. Kapasitans veya iletkenliğe dayalı ölçüm teknikleri ile karşılaştırıldığında çok daha fazla bilgi sağlar.

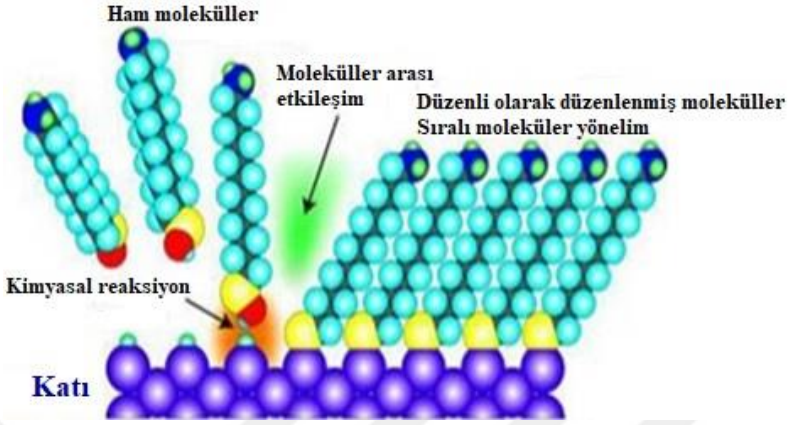
Elektroanalizde fiziksel bileşen olarak altın elektrot çokça tercih edilmektedir. Altının popularitesinin ana nedeni, inert olması aynı zamanda biyo-uyumlu olmasıdır. Örneğin, farklı tiyol bazlı immobilizasyon kimyasallarından yararlanarak moleküller çapraz bağlanabilir (Lucarelli, Marrazz, Turner & Mascini, 2004).

Bu tez kapsamında iki adet elektrokimyasal esaslı impidimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Tüm elektrokimyasal biyosensörler gibi, impedimetrik sensörler de biyomoleküllerin iletken (veya yarı iletken) transdüser yüzeyi ile etkileşimlerini kullanan biyoelektronik cihazlardır. Bu çalışmada geliştirilen OCN ve OPN biyosensörlerinin cevaplarının belirlenmesi için impedans ölçümleri oda sıcaklığında (25 °C) Ferri/Ferro redoks prob çözeltisi içinde, üç elektrotlu sistemde çalışma elektrodu olarak altın (Au) elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel, referans elektrot olarak Ag/AgCl kullanılarak gerçekleştirildi. Nyquist eğrileri, Randles eşdeğer devre modeli kullanılarak elde edildi.

### 2.8.1. SAM ( Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka)

Altın elektrot yüzeyinde tek tip, kararlı ve dayanıklı kendiliğinden toplanan tek tabakalar oluşturmak için uygun fonksiyonel gruba sahip bazı kimyasallardan yararlanılır. Sülfür içeren moleküllerin altın yüzeye kendiliğinden bağlanması Nuzzo ve Allara tarafından bulunmuştur (Nuzzo & Allara, 1983). Şekil 2.12’deki gibi

kendiliğinden toplanan tek tabakalar (SAM), istenen elemanın hareketsizleştirilmesini desteklemek için sıklıkla kullanılır.



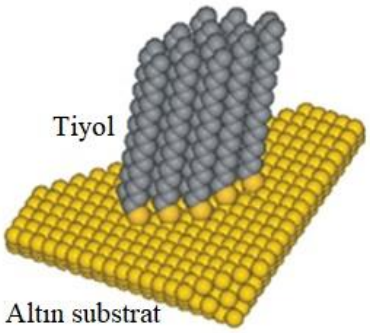

**Şekil 2.12.** SAM (Kendiliğinden toplanan tek tabakalar) oluşumu (Harvard Üniversitesi, 2019)

Bu tür filmler kendiliğinden çözelti içinde oluşturulmaktadır (Mirsky, Riepl & Wolfbeis, 1997). Elektrot yüzeyi metal olmayan yüzeylerden oksitlerden oluşuyorsa, SAM'ler alkil siloksanlar bulunduran kimyasallarla da hazırlanır.

Uzun zincirli tiyoller kullanılarak hazırlanan SAM'lerde, elektrot yüzeyi istenmeyen reaksiyonlardan etkili bir şekilde bloke edebilir ve bu nedenle sıklıkla kullanılır.

Şekil 2.12'de görüldüğü üzere disülfürler, sülfitler ve tiyoller, çeşitli metaller (altın, gümüş, platin veya bakır) üzerinde çok kuvvetli bir şekilde koordine edilir. Şekil 2.13'de görülen bir tiyol bileşiği ve bir altın alt tabaka arasındaki varsayılan tepkime;

$$RSH + Au \leftrightarrow RS\text{-}Au + e + H^{+}$$ şeklindedir.




**Şekil 2.13.** Altın yüzey üzerine tiyol grubu içeren bileşik ile SAM oluşturma (Lindemann, t.y.)

Yoğun monotabakalar 1 saatten az bir sürede toplansa da, iyi düzenlenmiş tek tabakaların oluşması 12-72 saat sürebilir (Bain & Whitesides, 1989). Altın elektrotlar, genellikle, alümina ile mekanik olarak temizlenir, olası kontaminantları uzaklaştırmak için asidik veya alkali solüsyonlarda sonike edilir.

## 2.9. Antikor/Antijen Temelli İmmünosensörler

Biyoreseptör olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler "antikor temelli biyosensörler ya da immünosensörler" olarak adlandırılır.

Biyolojik kompleks reseptörleri kullanan en gelişmiş biyosensör örnekleri immünokimyasal reaksiyonlara dayanmaktadır. Kısacası antijenin spesifik bir antikora bağlanması ile karakterize edilmektedir. Bilindiği üzere antikor ve onlara ait antijenleri arasında spesifik bir etkileşim immünosensörler ile son derece özgül ve duyarlı analizler yapılabilmesine olanak sağlamaktadır.

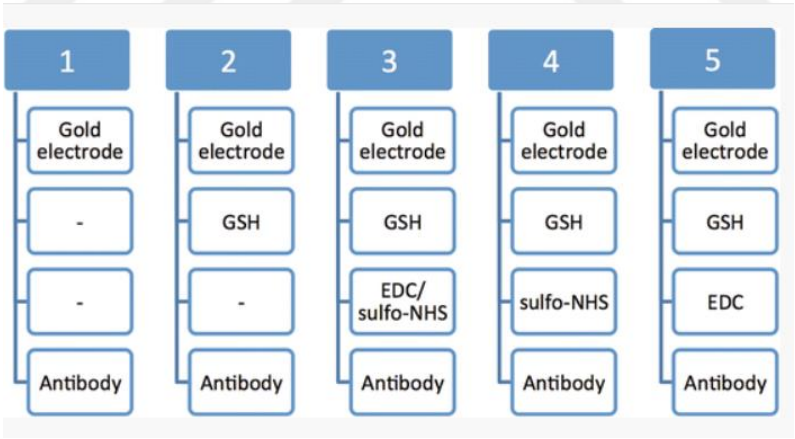
Tez kapsamında tasarlanan Osteokalsin ve Osteopontin biyosensörleri immünosensör temelinde hazırlanmıştır. Anti-OCN ve Anti-OPN antikor prorteinleri altın elektrod yüzeyine immobilize edilerek Osteokalsin ve Osteopontin miktar tayininde kullanılmıştır.

## 2.10. Literatürde Osteokalsin Biyobelirteci için Geliştirilmiş Biyosensörler

Klinik olarak osteokalsin tayini ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) metodu kullanılarak yapılmaktadır.

Literatürde OCN tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri incelendiğinde 3 adet çalışmaya rastlanmıştır.

Patricia Khashayar ve ark. tarafından geliştirilen elektrokimyasal biyosensörde OCN'nin tayini için cam elektrot yüzeyi; siklik voltametri ile elektrobiriktirme yöntemi ile altın nanopartiküllerle kaplandı. Ardından Au elektrot yüzeyine glutatyon tripeptidi immobilize edildi. Glutatyonun sistein amino asidi artıklarının tiyol grupları üzerinden Au elektroda kovalent olarak bağlandı. Glutatyonun açıkta kalan karboksilli asit uç grupları EDC/NHS ile aktifleştirildikten sonra anti-OCN molekülü immobilize edildi ve OCN biyosensörünün dizaynı tamamlandı (Şekil 2.14). Geliştirilen OCN biyosensöründe ölçüm yöntemi olarak Diferansiyel Pulse Voltametri (DPV) kullanıldı (Khashayar vd., 2017a).




**Şekil 2.14.** Patricia Khashayar ve ark. tarafından OCN tayini için geliştirilen biyosensörün immobilizasyon stratejileri (Khashayar vd., 2017a)

Şekil 2.14'te görüldüğü üzere modifiye 5 protokol kullanılarak OCN biyosensörleri üretilmiştir. Birinci protokolde, anti-OCN molekülleri direkt altın yüzeye pipetlenmiş, kovalent bağ yapacak grup içermedikleri için pasif adsorbsiyon gerçekleşecek ve zamanla antikor molekülleri yüzeyden desorbe olacaktır. Bu nedenle

ikinci protokolünde, tripeptit glutatyon (GSH) kullanılarak anti-OCN molekülü altın yüzeye bağlanmış ancak yeterince güçlü bağlanma olmadığı yıkama adımları sırasında antikorun yüzeyden ayrıldığı tespit edilmiştir. Üçüncü ve diğer protokollerde, GSH üzerine EDC, NHS ve EDC/NHS çözeltileri kullanılarak üzerlerine antikor pipetlenmiş, 60 dakika inkübe edilmiştir. En başarılı biyosensör beşinci protokol ile geliştirilmiştir, tüm protokollerde ölçüm yöntemi olarak DPV kullanılmıştır.

Patricia Khashayar ve ark. başka bir çalışmalarında bu beşinci protokolü modifiye ederek osteokalsinin serum seviyesinin ölçümü için AuNP-GSH-EDC/NHS-AntiOCN dizaynında altın nanoproblar geliştirmişlerdir. Bu altın nanoproblarda osteokalsin proteininin üçüncül yapısının korunduğu, bu nedenle de antikorun, sonraki adımlarda aktif kaldığı belirtilmiştir. Bu altın nanoprobların elektrokimyasal esaslı immünolojik testlerde kullanılma potansiyellerinin olduğu görülmüştür (Khashayar, Amoabediny, Larijani, Hosseini & Vanfleteren, 2017b).

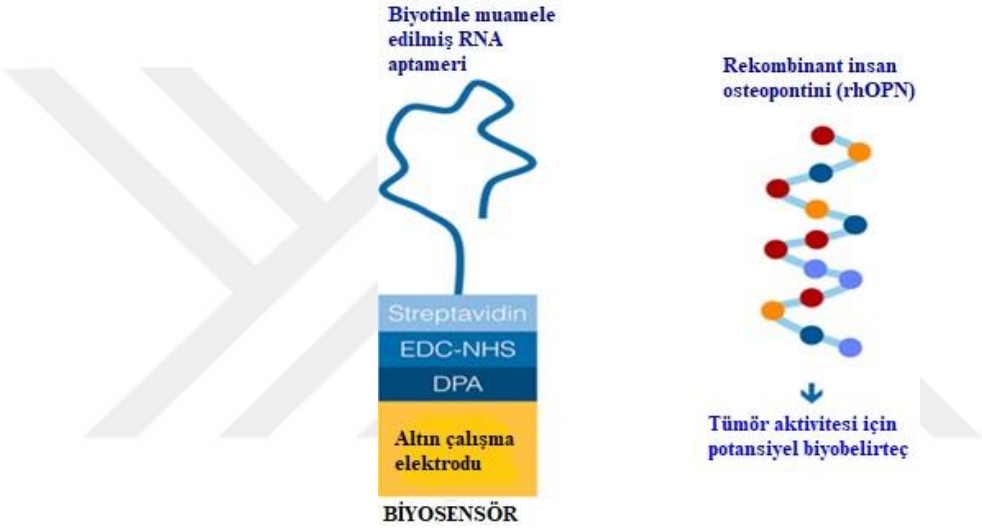
Min-Ho Lee ve ark. tarafından geliştirilen elektrokimyasal biyosensörde OCN'nin tayini için amperometrik esaslı bir biyosensör tasarlanmıştır (Lee, Kim, Seo, & Lee, 2014). Au elektrot yüzeyine SAM stratejisi yöntemiyle Ditiyobis-N-süksinimidil propiyonat (DTSP) düzenli tabakaları oluşturulmuş, anti-OCN molekülü peroksidaz enzimiyle karıştırılarak bir enzim elektrotu elde edilmiştir. Geliştirilen elektrotlarla ölçümler bir aracı olarak hidrokinon bileşiği varlığında azalan $H_2O_2$ miktarı ile OCN seviyeleri ilişkilendirilerek osteokalsin seviyeleri için daha hızlı ve hassas amperometrik ölçüme dayalı cevaplar elde edilmiştir. Osteokalsin antikorunun altın elektrot üzerinde kovalent olarak immobilizazyonunda; elektrot 4 mM DTSP içeren DMSO çözeltisine daldırılıp 15 saat inkübe edilmiş, sonrasında DMSO ve aseton ile yıkanarak 1 saat PBS içinde bırakılmıştır. Sonrasında, elektrot antikor ve perksidaz enzimi karışımı ile kaplanmıştır.

### 2.11. Literatürde Osteopontin Belirteci İçin Geliştirilmiş Biyosensörler

Osteopontin belirtecinin pleomorfik immünolojik aktiviteye sahip olmasından dolayı bazı tümörlerle yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kemik hastalıkları için OPN biyosensörleri literatürde mevcut değildir, ancak meme, prostat gibi çeşitli kanser

türleri için biyobelirteç olarak öngörülen OPN için çeşitli OPN biyosensörleri tasarlanmıştır.

Literatürde OPN tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri incelendiğinde Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2015 ve 2017 yılında, hem RNA aptasensörü hem de DNA aptasensörü kullanılarak geliştirilen iki biyosensöre rastlanmaktadır (Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2015; Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2017).



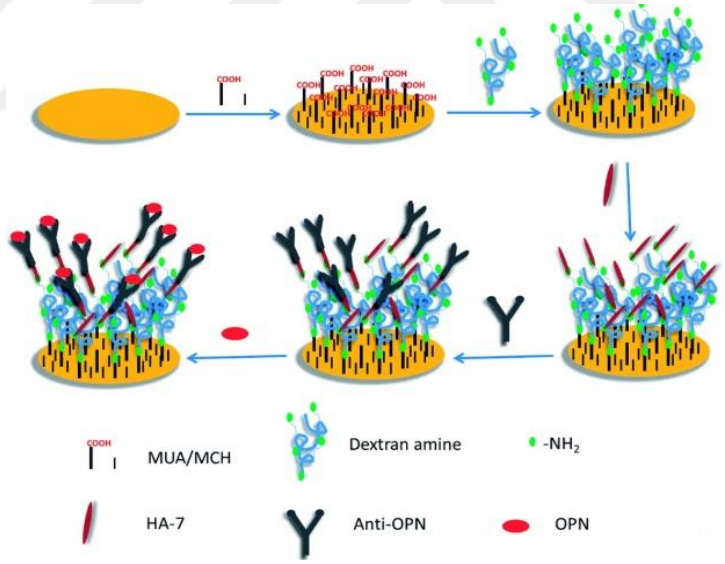

**Şekil 2.15.** Sofia G. Meirinho ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörünün dizaynı (Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2015)

Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2015 yılında meme kanserinin prognozu ve metastazında potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilen OPN'nin tayini için Şekil 2.15'te görüldüğü gibi RNA aptasensörü geliştirilmiştir. Tasarlanan RNA aptasensörünün her aşamasından sonra elektrot yüzeyinin elektrokimyasal davranışı, döngüsel voltametri ve kare dalga voltametrisi kullanılarak incelenmiştir (Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2015).

Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2017 yılında gerçekleştirilen çalışmada; OPN potansiyel bir meme kanseri belirteci olarak kabul edilerek, OPN miktar tayini için DNA aptasensörü kullanarak OPN biyosensörü tasarlanmıştır. Bu aptamerin, OPN'ye

karşı tatmin edici bir afinite gösterdiği ve elektrokimyasal yöntemle kare dalga voltametrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Ön sonuçlar, DNA aptasensörünün standart ELISA yöntemine benzer şekilde gerçek insan plazmasında OPN'yi saptayabildiğini göstermiştir (Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2017).

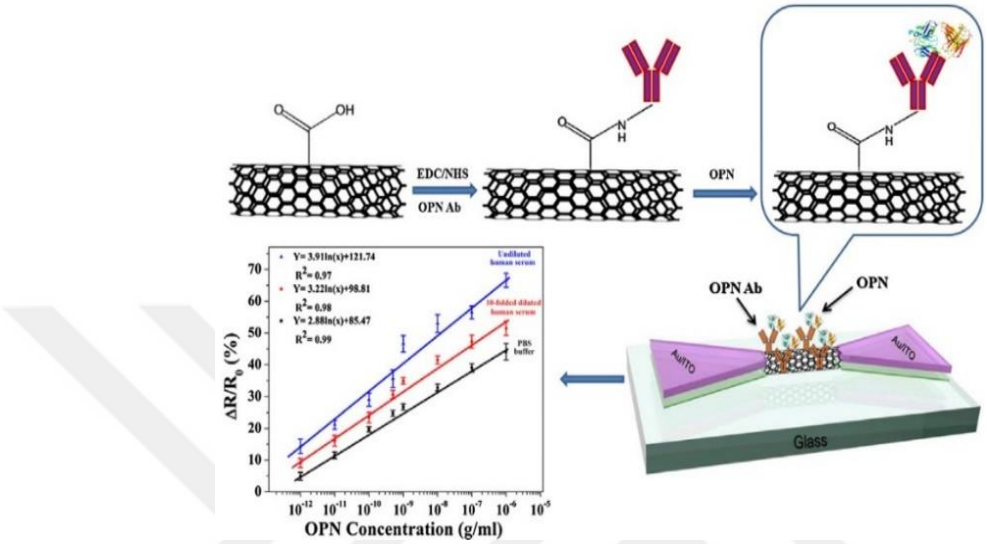
Hongxia Chen ve arkadaşları tarafından elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tekniği kullanılarak antikor immobilizasyonu ve OPN tespiti için bir biyosensör geliştirilmiştir. Altın elektrot yüzeyinde MUA/MCH (11-merkapto undekanoik asit / 6-merkapto-1 hekzanol) karışık çözeltisiyle SAM tabaka oluşturulmuş, oluşan tek tabakalar üzerine sırasıyla; Dextran amin- HA-7(sentetik peptit)-Anti-OPN immobilize edilerek biyosensör dizaynı tamamlanmıştır (Şekil 2.16). Siklik voltammetri, atomik kuvvet mikroskobu ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi kullanılarak yüzey değişimleri incelenmiş ve karakterize edilmiştir (Chen vd., 2014).




**Şekil 2.16.** Hongxia Chen ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörü (Chen vd., 2014)

Diğer bir çalışmada, Abhinav Sharma ve ark. Tarafından prostat kanserinin tanı ve prognozu için potansiyel bir biyobelirteç olarak kabul edilen Osteopontin (OPN) için bir immünosensör tasarlanmıştır (Sharmaa, Hong, Singh & Jang, 2015). Bir cam

substrat üzerinde iki altın/indiyum kalay oksit elektrotu arasında tek tabakalı karbon nanotüplere (SWCNT'ler) biriktirilmiştir. SWCNT'lerin karboksil uç grupları EDC/NHS ile aktive edildikten sonra anti-OPN molekül immobilize edilmiştir (Şekil 2.17).

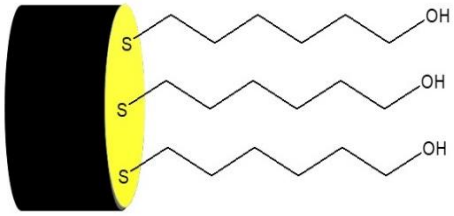



**Şekil 2.17.** Abhinav Sharma ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörü (Sharmaa vd., 2015)

Bu tez çalışmasında, altın elektrot yüzeyinde tiyol grubu içeren kimyasallar kullanılarak Osteokalsin ve Osteopontin analizi yapabilecek elektrokimyasal impedans esaslı biyosensörler tasarlanmıştır. Her işlem sonrasında EIS ve CV ölçümleri alınarak yüzey karakterizasyonu ve yüzeydeki impedans değişiminden yararlanarak analit molekül OCN ve OPN'nin miktar tayinleri yapılmıştır.

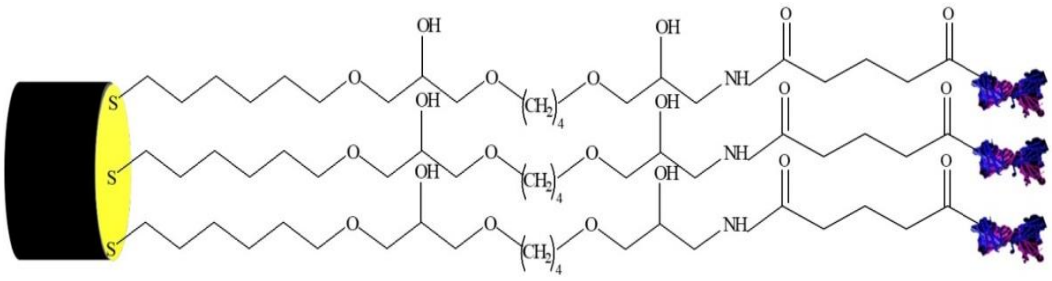
## 2.12. Tez Kapsamında Geliştirilen Osteokalsin Biyosensörünün Dizaynının Kimyası

Osteokalsin biyosensörü tasarımında altın elektrot yüzeyinde iki ucu reaktif grup içeren 6-merkaptohekzanol (6-MCH) kullanılarak SAM oluşturuldu. 6-MCH molekülünün tiyol ucu, altın yüzey ile kovalent bağ yaparak kendiliğinden düzgün tek tabakalar yani SAM'ler elde edildi (Şekil 2.18).




**Şekil 2.18.** Osteokalsin analizi için geliştirilen OCN biyosensörünün SAM oluşum basamağı

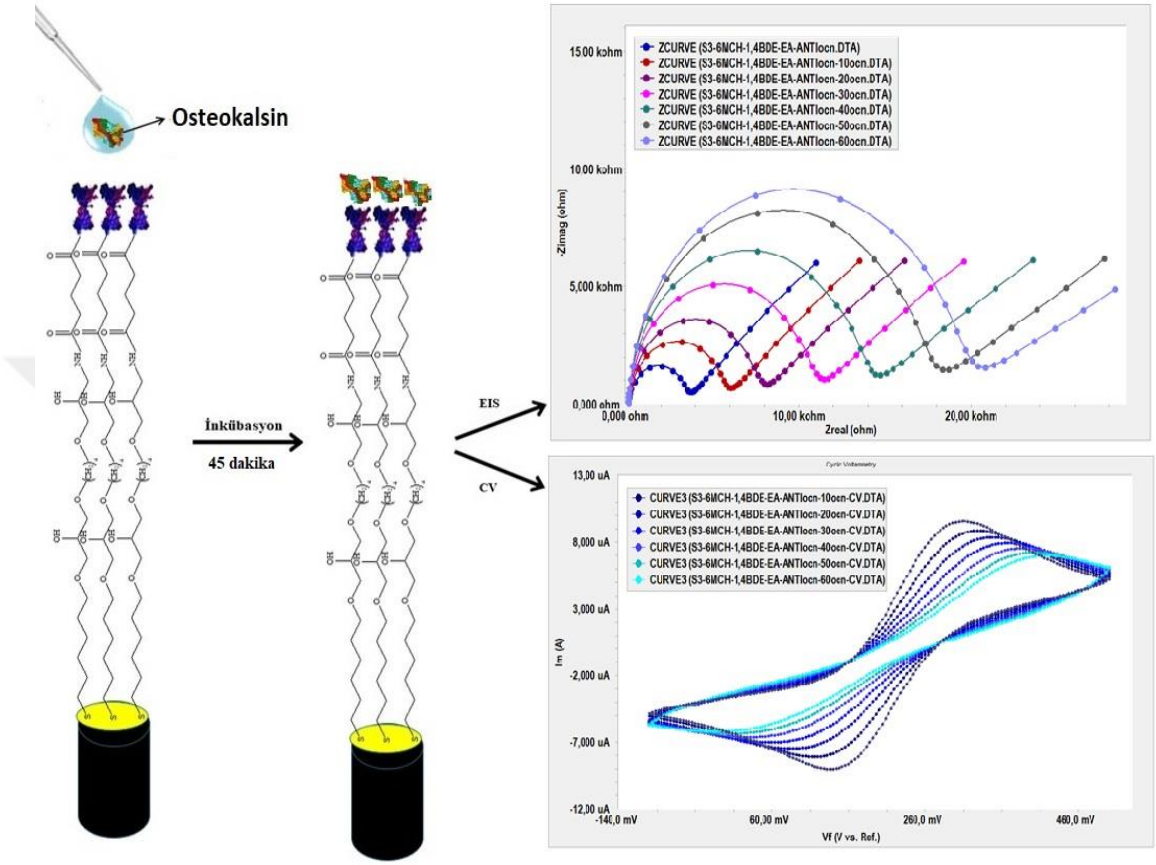
SAM stratejisi kullanılarak altın elektrot yüzeyinde düzgün tek tabakalar elde edildikten sonra ara ara kol molekülü olarak 1,4-BDE (1,4-bütandioldiglisidil eter) kullanıldı. 1,4-bütanediol diglisidil eter yaygın olarak kullanılan homobifonksiyonel epoksit bileşiğidir. 1,4-BDE eter, sekonder amin veya tiyoeter bağları üretmek için hidroksillerle, sülfhidril grupları veya aminler ile reaksiyona girebilmektedir (Sharifi, Robatjazi, Sadri & Mosaabadi, 2019). 1,4-BDE moleküllerinin epoksit uçları ile 6-MCH moleküllerinin açıkta kalan hidroksil grupları arasında stabil kovalent bağlar oluştu. 1,4-BDE'nin diğer epoksit ucu ile reaksiyon vermek üzere EA (etanolamin çözeltisi elektrot yüzeyine eklendi. Etanolamin ile osteokalsin antikoru (Anti-OCN) arasında çapraz bağlayıcı olarak yüzeye Glutaraldehit (GLT), ardından son olarak Anti-OCN antikoru eklenerek OCN biyosensör dizaynı tamamlandı (Şekil 2.19).




**Şekil 2.19.** Geliştirilen Osteokalsin biyosensörünün şematik gösterimi

İmmobilizasyon basamakları gerçekleştirildikten sonra Şekil 2.20'deki gibi elektrot yüzeyine, fosfat tamponunda hazırlanmış 10 pg/µL OCN içeren 5'er µL'lik osteokalsin protein çözeltileri ardarda gerçekleştirişlen 6 ayrı pipetleme halinde

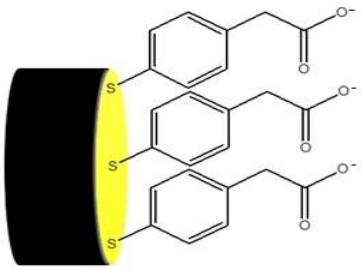
eklenerek her ekleme sonrasında OCN biyosensörünün cevapları EIS ve CV ölçümleri şeklinde alındı.




**Şekil 2.20.** Geliştirilen OCN biyosensörü üzerine 10-60 pg/µL konsantrasyon aralığında OCN çözeltileri ilave edilerek elde edilen EIS ve CV görüntüleri

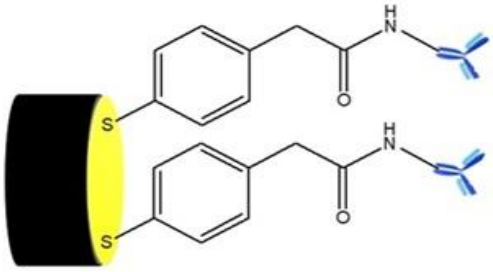
## 2.13. Tez Kapsamında Geliştirilen Osteopontin Biyosensörünün Dizaynının Kimyası

Osteopontin biyosensörü için elektrot yüzeyinde SAM tabaka oluşturmak üzere iki ucu reaktif grup içeren 4-Merkaptofenilasetik asit (4-MPA) kullanıldı (Şekil 2.21). 4-MPA elektrot yüzeyindeki altın ile tiyol grubu üzerinden bağlanırken bifonksiyonel bu molekülün karboksil uç grupları daha sonra ilave edilecek kimyasal moleküllerle reaksiyon vermek üzere serbest kalır.



**Şekil 2.21.** Osteopontin analizi için geliştirilen biyosensördeki SAM tabaka oluşumu

4-MPA (Nguyen, Kaulen, Simon & Schnakenberg, 2017) molekülünün tiyol ucu, altın ile kovalent bağ yaparak kendiliğinden oluşan düzgün tek tabakalar elde edildikten sonra diğer ucu (–COOH grupları ), 1-Etil-3-(3-dimetil amino propil) karbodiimit (EDC)/N-Hidroksi süksinimit (NHS) karışımı eklenerek aktifleştirildi. EDC/NHS; Anti-OPN molekülünün amin gruplarının, 4-MPA'nın karboksilik gruplarına bağlanmasını kolaylaştırmak üzere –COOH gruplarını reaktif hale dönüştürdü. Anti-OPN antikoru aktifleştirilen bu yüzeye eklenerek Osteopontin biyosensör tasarımı tamamlandı (Şekil 2.22).



**Şekil 2.22.** Geliştirilen Osteopontin biyosensörünün şematik gösterimi

İmmobilizasyon basamakları gerçekleştirildikten sonra elektrot yüzeyine, fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanıp, porsiyonlara ayrılmış osteopontin protein çözeltileri 5'er µL olarak eklenerek biyosensör cevapları EIS ve CV ölçümleri ile takip edildi.

# BÖLÜM 3

# MATERYAL VE METOT

## 3.1. Materyal

### 3.1.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasallar

Aşağıdaki kimyasal maddelerin tamamı Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)'den temin edilmiştir:

Dizayn edilen OCN biyosensöründe; analit olarak kullanılan Osteokalsin (osteocalcin fragment (1-49) human), Osteokalsin molekülüne özgü sentezlenmiş antikor olan Anti-Osteokalsin (monoclonal Anti-BGLAP),

OCN biyosensöründe; SAM oluşumunda kullanılan ara kol 6-Merkapto hekzanol, 1,4-bütandiol diglisidil eter (≥ 95 %), Etanolamin (99.0 %), Glutaraldehit (% 25, v/v),

Dizayn edilen OPN biyosensöründe ise; analit olarak kullanılan Osteopontin (osteopontin human), Osteopontin molekülüne özgü sentezlenmiş antikor olan Anti-Osteopontin (monoclonal Anti-SPP1),

OPN biyosensöründe; SAM oluşumunda kullanılan 4-Merkapto fenilasetikasit, 1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimit metiodit, N-Hidroksi süksinimit (% 98),

Her iki biyosensör hazırlığı ve ölçümlerinde kullanılan diğer kimyasallar; Potasyum Ferrisiyanat, Etanol (≥99.8 %), potasyum klorür, Dipotasyum hidrojen fosfat, Potasyum Ferrosiyanat, monosodyum dihidrojen fosfat ve yapay serum hazırlanmasında kullanılan serum çözeltisi (serum replacement)

### 3.1.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Her iki biyosensör ölçümleri; bir elektrokimyasal hücredeki Ferri/Ferro redoks prob çözeltisinin içinde üçlü elektrot sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Üçlü elektrot olarak, çalışma elektrodu olarak altın elektrot, referans elektrot olarak KCl ile doygunlaştırılmış Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanıldı. Elektrotların tümü Warwickshire, BASi, UK firmasından temin edildi.

Tasaralanan biyosensör ölçümleri; döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopi (EIS) yazılımı olan Echem Analyst yazılımı içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayar destekli Gamry Potentiostate/Galvanostate, Reference 600 cihazında alındı.

Deneysel çalışmalar sırasında Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland), ultrasonik temizleyici (Wise Clean DAIHAN, Kore), mikropipetler (10µL, 200 µL, 1000 µL eppendorff mikropipet), pH metre (6173 pH, made in China for USA) , manyetik karıştırıcı (Biosan magnetc stirrer MSH 300) kullanıldı.

### 3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanışı

**50 mM fosfat tamponu (pH 7.0):** Hassas terazide 7.089 g $Na_2HPO_4$ tartılıp destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Farklı bir balon jojede 6.803 g $KH_2PO_4$ tartılıp, destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu iki çözelti kullanılarak pH 7.0 olacak şekilde fosfat tamponu hazırlandı.

**5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$:** Hassas terazide 1.0560 g $K_4[Fe(CN)_6]$ tartılarak daha önce hazırlanan 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile 500 ml'ye tamamlandı.

**5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$:** Hassas terazide 0.8231 g $K_3[Fe(CN)_6]$ tartılarak daha önce hazırlanan 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile 500 ml'ye tamamlandı.

**Redoks prob çözeltisi:**5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltileri (1:1) 1 L olacak şekilde karıştırıldı, bu çözeltinin içerisine 3.72 mg KCl (0.1M) eklendi.

**20 mM 6-MCH:** 600 µL 6-MCH alınıp son hacim 15 ml olacak şekilde absolut (saf) etanolde çözüldü.

**% 2.5 Glutaraldehit (v/v):** Ana stoktan (% 25) 10 µL çekilip 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile 100 µL'ye tamamlandı.

**0.5 M Etanolamin:** 21.11 µL EA çekilerek 50 mM' lık pH 7.0 fosfat tamponu ile 1 ml'ye tamamlandı.

**% 7 1,4-BDE (w/v):** 36.84 µL 1,4-BDE alınarak 50 mM' lık pH 7.0 fosfat tamponu ile 500 µL'ye tamamlandı.

**5 mM 4-MPA (w/v):** 0.0084g 4-MPA tartılarak 10 ml saf (absolut) etanolde çözüldü.

**0.2 M EDC (w/v):** 5.94 mg EDC tartılarak 100 µL'ye hazırlanmış olan 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile tamamlandı.

**0.05 M NHS (w/v):** 2.88 mg NHS tartılarak 500 µL'ye hazırlanmış olan 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile tamamlanır.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Çalışma Elektrodunun (Au) Temizliği

Çalışma elektrodu (Au elektrot) yüzeyinde bir önceki denemelerden kaynaklı ya da dış ortamdan gelen safsızlıkların ölçüm sonuçlarına önce etki etmesini önlemek için her çalışmadan önce elektrod temizliği yapılması çok önemlidir. Bu amaçla çalışma elektrodu yüzeyine tutunmuş olan safsızlıklardan arındırmak için her çalşıma öncesinde mekanik temizlik işlemi uygulandı.

Mekanik temizlik için spatula yardımıyla bir miktar Alüminyum Oksit ($Al_2O_3$ < 50 nm partikül büyüklüğü), sentetik ipek (Buehler Microcloth PSA, Buehleri UK) üzerine alındı. $Al_2O_3$ üzerine birkaç damla ultrasaf su damlatıldı. Viskoz kıvama gelene kadar karıştırıldı. Daha sonra elektrot yüzeyi pelte kıvamındaki $Al_2O_3$üzerinde yavaşça ve aynı yönde gezdirilerek bu işlem yaklaşık olarak 5 dakika tekrarlandı ve yüzeydeki kirlilik mekanik olarak giderildi. Sonrasında, elektrot yüzeyinde kalan $Al_2O_3$ partiküllerinin giderilmesi için altın elektrot önce saf su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 5 dk süre ile saf su ve 5 dk süreyle de absolut etanol (% 99.9) içerisinde

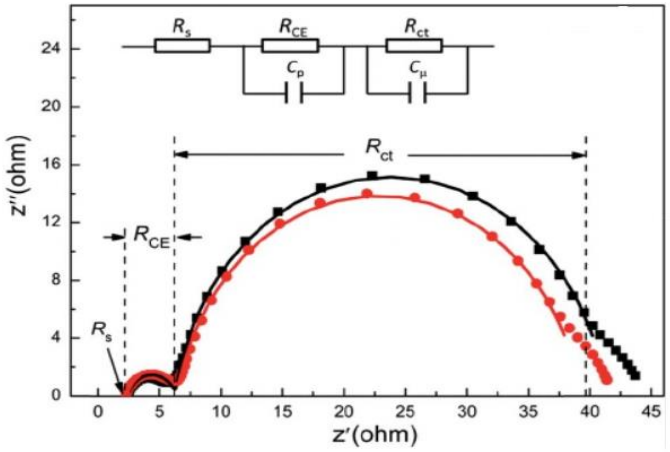
sonikatörde sonike edildi. Son olarak, çalışma elektrodu saf su ile yıkandı ve saf argon gazı ile kurutuldu. Yalın elektrodun EIS alınarak temizliği konrol edildi.

### 3.2.2. Tasarlanan İki Biyosensörün Ölçüm Prensipleri

Osteokalsin ve osteopontin biyosensörlerinin tasarımları; osteokalsin ve osteopontin antikorlarının farklı kimyasal stratejilerle modifiye edilmiş altın elektrot yüzeyine immobilize edilmesi ile tamamlandı. Sonrasında analit OCN ve OPN'nin miktar analizlerine geçildi. Bu amaçla; standart analit çözeltilerinin 5'er µL'lik porsiyonları (10 pg/µL osteokalsin ve 10 pg/µL osteopontin içeren) elektrot yüzeylerine mikropipet yardımıyla eklendi ve 45 dakika inkübe edildi. Sonra elektrot yüzeyine bağlanmamış OCN ve OPN proteinlerini uzaklaştırmak için ultra saf su ile elektrot yüzeyi yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elektrolit çözeltisinin bulunduğu hücrede CV ve EIS ölçümleri alındı. Bu 5'er µL'lik standart çözelti (10 pg/µL osteokalsin ve 10 pg/µL osteopontin içeren) ilavesi ve yıkama işlemleri, ardından CV-EIS ölçümleri 6 kez tekrarlandı. Böylece, 10-60 pg/µL OCN ve OPN konsantrasyon aralığında geliştirilen biyosensörlerin cevapları elde edildi.

### 3.2.3. Nyquist Eğrilerinden Yük Transfer Direncinin (Rct) Hesaplanması

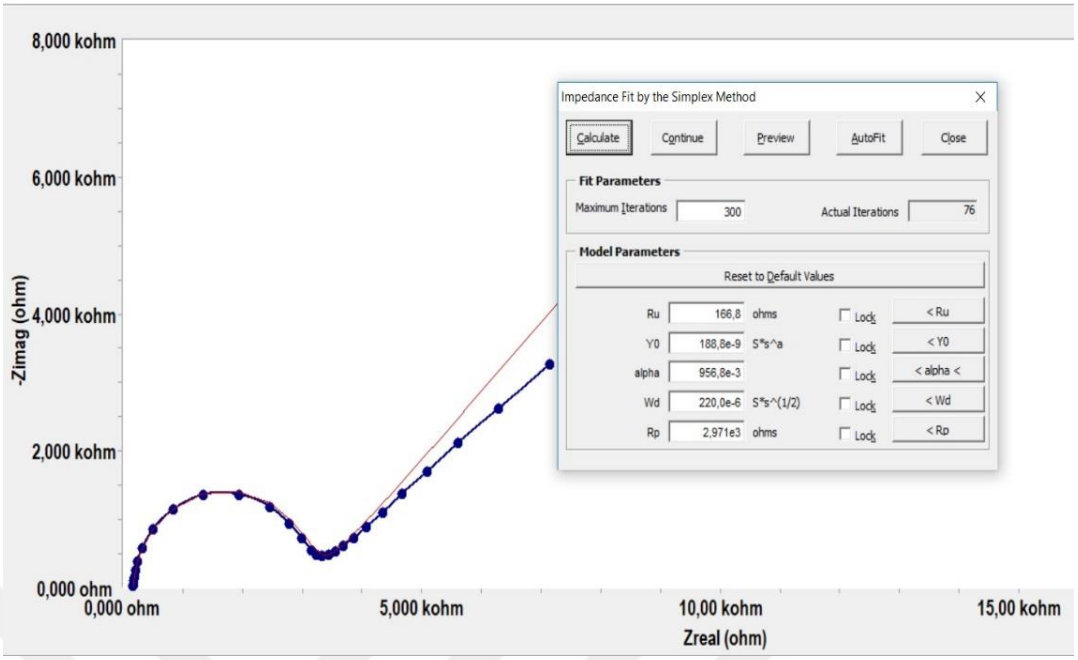
Osteokalsin ve osteopontin biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının karakterizasyonu, OCN ve OPN proteinlerinin miktar tayinlerinin ölçülmesi için kullanılan EIS'den elde edilen Nyquist eğrileri bir eşdeğer devre vasıtası ile anlamlı sayısal verilere dönüştürüldü (Şekil 3.1). Nyquist Eğrisinin çap değerine denk gelen yük transfer direnci (Rct) hesaplamaları Gamry Analyst® yazılımı ile yapıldı. Elektrot yüzeyinde bulunan madde miktarı ile Rct arasında doğru orantı olup, bir devredeki bütün toplam direnç impedans olarak adlandırılmaktadır. Elektriksel direnç ise, bir elektrokimyasal hücre elemanının verilen elektriksel akıma karşı gösterdiği dirençtir. İmpedans ile direnç arasında farklılık mevcuttur. İmpedans, direncin sahip olduğu basit özellikler ile sınırlandırılamamaktadır. EIS verilerinin doğruluğu, denk olabileceği düşünülen elektriksel bir devre ile birleştirilerek kontrol edilir. Yapılan bu çalışmalar Gamry Potentiostate/Galvanostate cihazı ve Gamry Analyst® yazılımı aracılığıyla gerçekleştirildi.




**Şekil 3.1.** Hesaplamada kullanılan devre modelleri (Tao vd., 2015)

Rct değerinin Gamry Analyst® yazılımı ile belirlenmesi için; Rct değeri hesaplanılacak Nyquist eğrisi Gamry Analyst® yazılımında açıldı. Üst menüde yer alan impedance sekmesinden "Fit A Model (Simplex Method)" seçildi. Ekrandan bu çalışmaya uygun olan "CPE with Diffusion" devresi seçildi (Şekil 3.2).

"CPE with Diffusion devresi"seçildikten sonra açılan hesaplama ekranındaki önceden kullanılmış verilerin sıfırlanma işlemi için Şekil 3.2'de gösterilen ekranda "Reset to Default Values" sekmesi seçilerek sıfırlanma işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında hesaplama için aynı ekran üzerinde bulunan "Calculate" sekmesine basıldı. Açığa çıkan hesaplama eğrisi, uygulanan deneysel prosedürler sonucu oluşan Nyquist eğrisine uyana kadar "Calculate" düğmesine basılmaya devam edildi. Hesaplama ekranında bulunan, Rct'ye karşılık gelen Rp değerleri her bir Nyquist eğrisi için kaydedildi. Daha önce de belirtildiği gibi yük transfer direnci ile yüzeye bağlanan madde miktarı arasında doğru orantı olduğu için tüm kantitatif tayinlerde hesaplanan Rp değerleri kullanıldı.

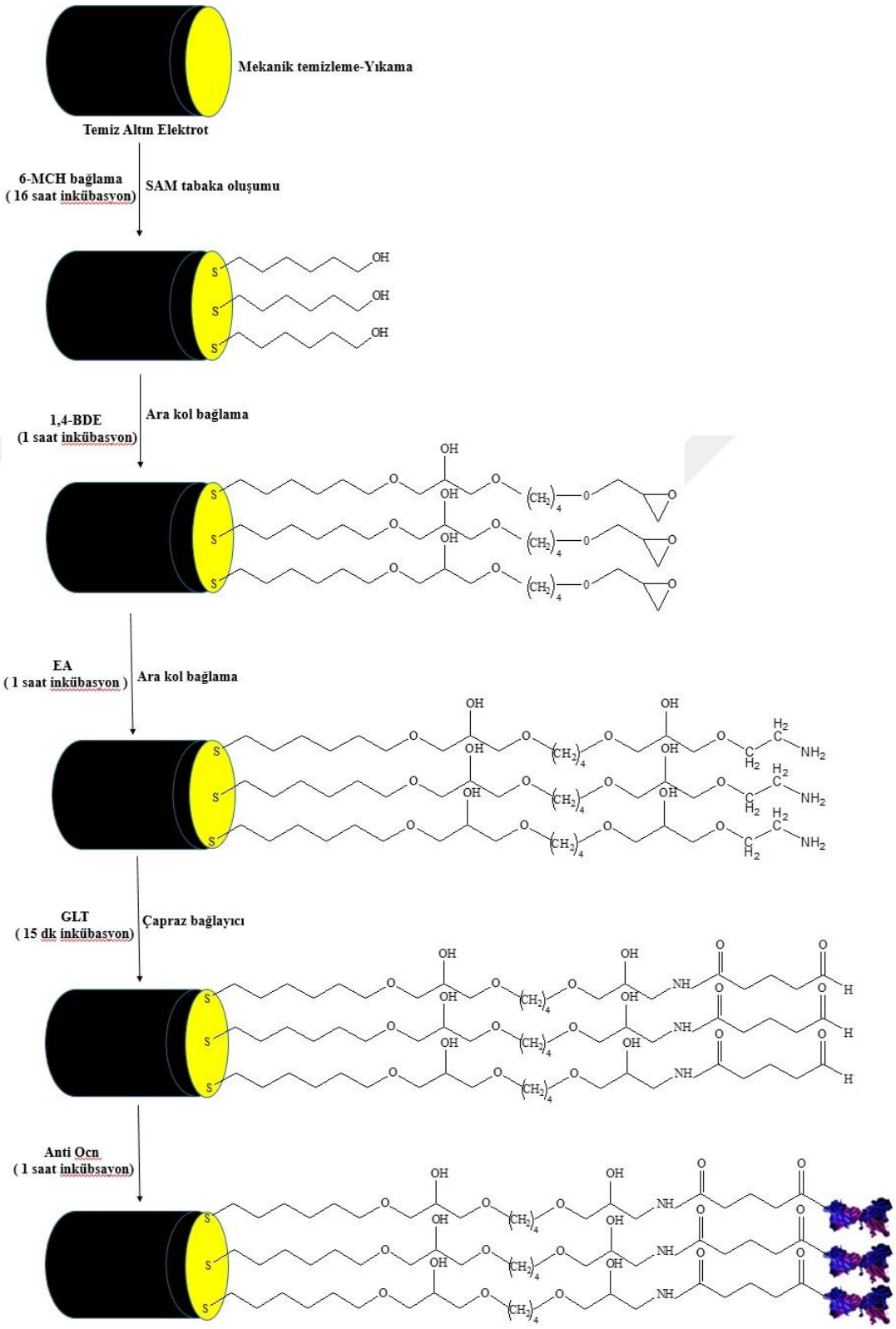



**Şekil 3.2.** Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı

Tez kapsamındaki biyosensörlerin hazırlanma ve immobilizasyon prosedürlerinin her aşamasında, OCN ve OPN miktar tayinlerinde elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi kullanıldı.

### 3.2.4. Osteokalsin Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanma Prosedürü

OCN biyosensörünün tasarımı için; Anti-OCN molekülünün altın elektrot yüzeyine immobilizasyonuna ait işlemler Şekil 3.3'te belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Öncelikle temiz altın elektrot 20 mM'lık 6-MCH çözeltisine daldırılıp 16 saat bekletilerek SAM tabaka oluşumu gerçekleştirildi. 6-MCH ile SAM tabaka oluşturulmuş elektrot yüzeyine % 7'lik1,4-BDE (w/v) çözeltisinden 5 µL ekleyerek 1 saat bekletildi. 1,4-BDE ile ara kol immobilize edilen elektrot yüzeyine 0.5M etanolamin çözeltisinden 5 µL eklenip 1 saat bekletildi. Etanolamin ile Anti-OCN molekülü arasında çapraz bağlama yapmak amacıyla % 2.5'luk Glutaraldehit (v/v) çözeltisinden 5 µL damlatılıp 15 dakika bekletildi. Sonra 10 ng/µL Anti-OCN antikoru 5 µL'lik porsiyonu halinde elektrot yüzeyine pipetlendi ve 45 dakika inkübe edildi. Biyosensör tasarımı [Au-6MCH-1,4BDE-EA-Glutaraldehit-AntiOCN] olarak tamamlanmış oldu (Şekil 3.3).




**Şekil 3.3.** Bu tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörünün tasarımı esnasında Anti-OCN molekülünün Au elektrot yüzeyine immobilizasyon basamakları

### 3.2.5. Osteokalsin Molekülünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyon Çalışmaları

#### 3.2.5.1. SAM yapımında kullanılan 6-MCH konsantrasyonunun optimizasyonu

OCN biyosensörünün hazırlanmasında SAM oluşturmak için kullanılan 6-merkaptohekzanol'ün optimum konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla 10 mM, 20 mM, 30 mM ve 40 mM konsantrasyonlarında hazırlanan 6-merkapto hekzanol çözeltileri ile SAM oluşturularak dört farklı biyosensör hazırlandı. Biyosensörün hazırlanmasında kullanılan diğer kimyasal bileşenlerin konsantrasyonları 1,4-BDE (% 4) (w/v), EA (0.5 M), Glutaraldehit (% 2.5) (v/v), Anti-OCN (10 ng/µL) ve OCN (10 pg/µL) olarak sabit tutuldu.

#### 3.2.5.2. 1,4-BDE konsantrasyonunun optimizasyonu

Altın elektrot yüzeyine Anti-OCN molekülü kararlı olarak immobilize etmek üzere bir önceki adımda oluşturulan SAM tabaka üzerinde 1,4-BDE ara kolu (1,4-Bütandiol diglisidil eter) kullanıldı. 1,4-Bütandiol diglisidil eterin % 1, % 4, % 7 ve % 10'luk konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. 1,4-BDE konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisini belirlemek için gerçekleştirilen bu çalışmada biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları 6-MCH (20 mM), EA (0.5 M), Glutaraldehit (% 2.5), Anti-OCN (10 ng/µL) ve OCN (10 pg/µL) olarcak şekilde sabit tutuldu.

#### 3.2.5.3. Etanolamin konsantrasyonunun optimizasyonu

Etanolamin'in 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M ve 1.5 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileriyle biyosensörler hazırlandı. Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisini belirlemek için gerçekleştirilen bu çalışmada biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları 6-MCH (20 mM), 1,4-BDE (% 7), Glutaraldehit (% 2.5), Anti-OCN (10 ng/µL) ve OCN (10 pg/µL) olacak şekilde sabit tutulmuştur.

### 3.2.5.4. Anti-OCN konsantrasyonun optimizasyonu

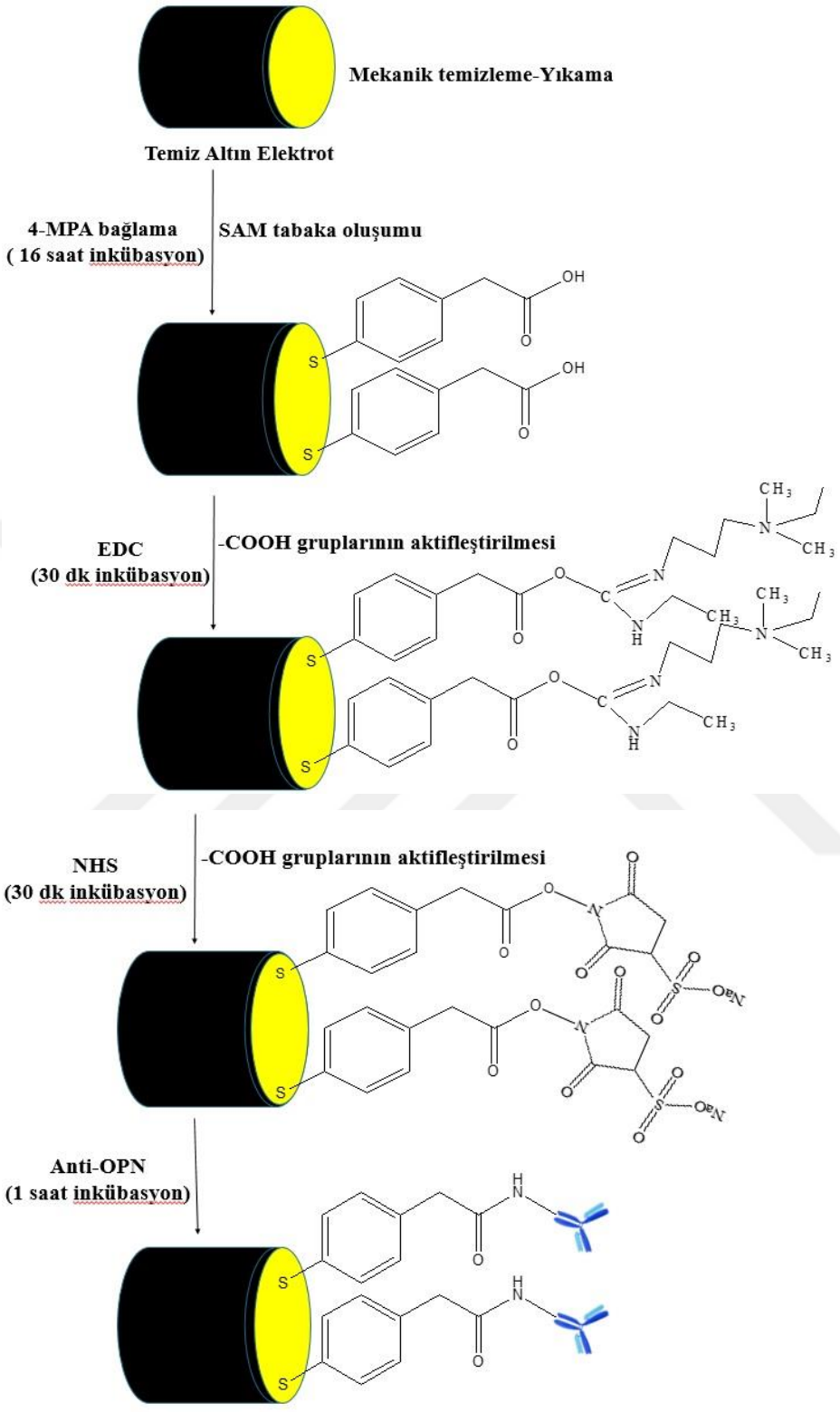
Anti-OCN'nin 5 ng/µL, 10 ng/µL, 20 ng/µL ve 30 ng/µL olacak şekilde farklı konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltileriyle biyosensörler hazırlandı. Biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları 6-MCH (20 mM), 1,4-BDE (% 7), EA (0.5 M), Glutaraldehit (% 2.5) ve OCN (10 pg/µL) olarak sabit tutuldu.

### 3.2.5.5. Osteokalsin molekülünün inkübasyon süre optimizasyonu

İmmobilizasyon işlemleri sırasında antikor ile antijenin etkileşme süresi, bağlanma verimi ve bunun yanında oluşan bağın dayanıklılığı üzerine etki eder. Bu nedenle, immobilizasyon basamağında yer alan tüm moleküllerin optimum konsantrasyonları belirlendikten sonra daha yüksek biyosensör cevapları elde edebilmek amacıyla 10 pg/µL konsantrasyonundaki OCN porsiyonlarının 30 dk, 45 dk, 60 dk ve 90 dk olacak şekilde farklı inkübasyon sürelerinde bekletilerek hazırlanan biyosensörlerin impedans eğrileri ve CV ölçümleri alındı. OCN inkübasyon süresinin immobilizasyona etkisinin belirlenmesi amaçlanan bu çalışmada, biyosensörlerin yapımı önceki deneylerde belirlenen optimum koşullarda 6-MCH (20 mM), 1,4-BDE (% 7) (w/v), EA (0.5 M), Glutaraldehit (% 2.5) (v/v), Anti-OCN (5 ng/µL) ve OCN (10 pg/µL) gerçekleştirildi.

### 3.2.6. Osteopontin Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanma Prosedürü

Temiz altın elektrot 5 mM'lık 4-MPA çözeltisine daldırılıp 16 saat bekletilerek SAM tabaka oluşumu gerçekleştirildi. 4-MPA ile SAM tabaka oluşturulmuş elektrot yüzeyine 0.2 M/0.05 M EDC/NHS çözeltisinden 5 µL ekleyerek 30 dk bekletildi. Daha sonra 10 ng/µL Anti-OPN antikorunun 5 µL'lik porsiyonu elektrot yüzeyine damlatılarak 1 saat inkübe edildi ve OPN biyosensör tasarımı tamamlandı (Şekil 3.4).




**Şekil 3.4.** Bu tez kapsamında geliştirilen OPN biyosensörünün dizaynı esnasında Anti-OCN molekülünün immobilizasyon basamakları

### 3.2.7. Osteopontin (OPN) Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

#### 3.2.7.1. SAM yapımında kullanılan 4-MPA konsantrasyonunun optimizasyonu

OPN biyosensörünün hazırlanmasında SAM oluşturmak için 4-merkapto fenilasetik asit kullanıldı ve 4-MPA'nın biyosensör tasarımında kullanılacak optimum konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM konsantrasyonlarında hazırlanan 4-MPA çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. 4-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisini belirlemek için gerçekleştirilen bu çalışmada biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları EDC/NHS (0.2 M/0.05 M), Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/µL) olarak sabit tutuldu.

#### 3.2.7.2. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu

SAM tabaka olarak kullanılan 4-merkaptofenilasetik asitin açıkta kalan karboksil uç gruplarını Anti-OCN moleküllerinin amino gruplarıyla kovalent bağ yapabilmek üzere aktifleştirmek için EDC/NHS çözelti karışımı kullanıldı. Optimum EDC/NHS konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 2 M/0.5 M, 1 M/0.25 M, 0.2 M/0.05 M ve 0.02 M/0.005 M konsantrasyonlarında hazırlanan EDC/NHS karışımları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. İmmobilizasyon işleminde kullanılacak EDC/NHS çözelti karışımlarının konsantrasyonlarının belirlemek için gerçekleştirilen bu çalışmada; biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları 4-MPA (5 mM), Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/µL) şeklinde sabit tutuldu.

#### 3.2.7.3. Anti-OPN konsantrasyonu optimizasyonu

Anti-OPN konsantrasyonun biyosensör cevabına etkisini belirlemek amacıyla 5 ng/µL, 10 ng/µL, 20 ng/µL, 30 ng/µL ve 40 ng/µL konsantrasyonlarında hazırlanan Anti-OCN çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasal bileşenlerin konsantrasyonları 4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2M/0.05M) ve OPN (10 pg/µL) olarak sabit tutuldu.

### 3.2.8. Osteokalsin ve Osteopontin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonu

#### 3.2.8.1. Doğrusal tayin aralığı

Optimum immobilizasyon koşullarında elde edilen sonuçlar kullanılarak [6-MCH (20 mM), 1,4-BDE (% 7)(w/v), EA (0.5M), Glutaraldehit (% 2.5)(v/v), Anti-OCN (5 ng/µL) veOCN (10 pg/µL)(45dk)] hazırlanan biyosensör ile OCN (10-60 pg/µL) için; [4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2M/0.05M) Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/µL)] hazırlanan biyosensör ile OPN (10-60 pg/µL) için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

#### 3.2.8.2. OCNve OPN biyosensör yüzey alanının hesaplanması

Biyosensörün elektrot yüzeyinde meydana gelen antikor molekülü ile kaplanma ölçüsünü belirlemek amacıyla; 10 farklı tarama hızında (10-100 mV) CV ölçümleri alındı. Elde edilen döngüsel voltamogramlardan yararlanılarak elde edilen veriler, aşağıda belirtilen Laviron Eşitliğine uygulandı:

$$\mathbf{Q = n \times F \times A \times \Gamma}$$

Formülde;
Q: yük miktarı
A: elektrot alanı (0.0201 $cm^2$)
n: 10 farklı tarama hızında elde edilen CV'lerden belirlenen, akımlara karşı çizilen grafiklerin eğimi
F: Faraday sabiti (96485 C/mol)
Γ: Kaplanan yüzey alanı (mol/$cm^2$)'dır.

Laviron eşitliği kullanılarak yalın elektrot ve Antikor kaplanmış biyosensörün yüzey alanları belirlendi.

### 3.2.8.3. Tekrar üretilebilirlik

OCN için optimize edilmiş değerleri kullanılarak [6-MCH (20 mM), 1,4-BDE (% 7), EA (0.5M), Glutaraldehit (% 2.5), Anti-OCN (5 ng/µL) ve OCN (10 pg/µL)(45dk)] hazırlanan farklı biyosensörlerle; OPN için de optimize edilmiş olan değerler kullanılarak [4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2M/0.05M) Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/µL)] hazırlanan biyosensörlerde EIS ve CV ölçümleri alındı ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği araştırıldı.

### 3.2.8.4. Yapay serumda uygulama

Osteokalsin ve osteopontin çözeltileri 10-60 pg/µL konsantrasyon aralığında olacak şekilde şartlarında yapay serum çözeltisinde hazırlandı. Yapay serum çözeltisi serum replacement çözeltisine (S2640- Sigma Aldrich Co.) 50 kat seyreltilerek 4.5 mM KCl, 5 mM $CaCl_2$ ve 145 mM NaCl olacak şekilde tuz ilaveleri yapılarak hazırlandı. Hazırlanan OCN ve OPN biyosensörlerinin yapay serumda hazırlanan OCN ve OPN porsiyonları ile EIS ve CV ölçümleri alınarak biyosensör cevabı üzerinde yapay serum bileşenlerinin etkisinin olup olmadığı belirlendi.

# BÖLÜM 4

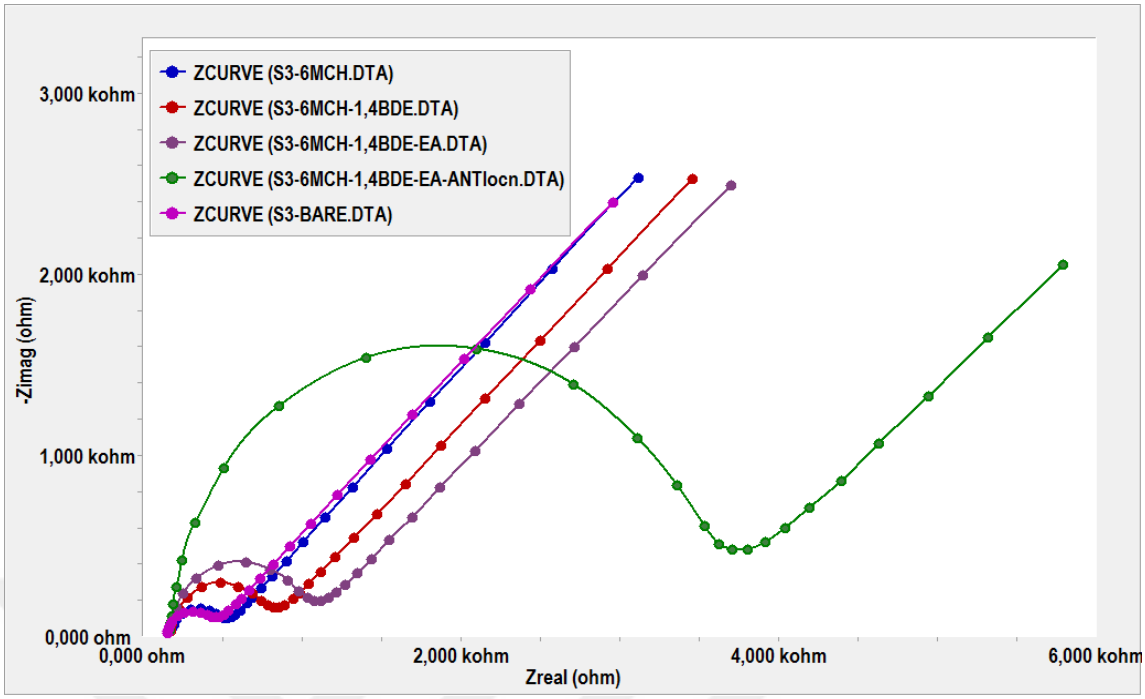
# DENEYSEL SONUÇLAR

## 4.1. Osteokalsin Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular

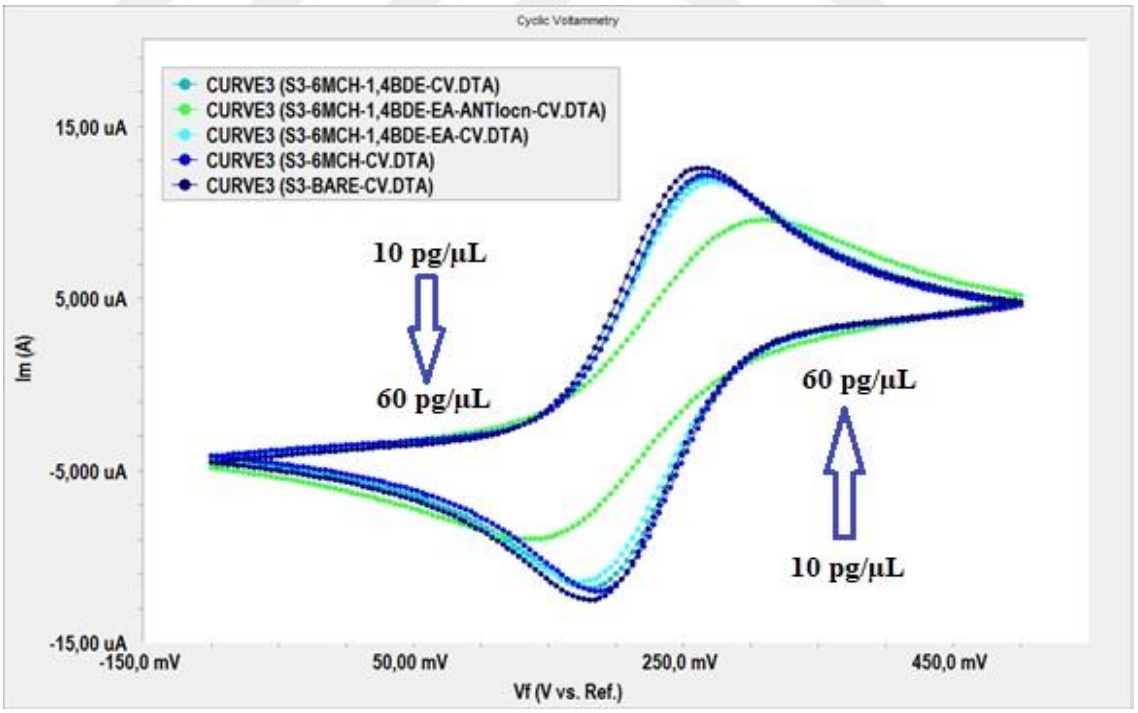
### 4.1.1. Osteokalsin Biyosensörünün Dizaynına İlişkin Bulgular

Osteokalsin biyosensörünün her bir immobilizasyon basamağından sonra elektrot yüzeyindeki değişimler EISve CV ölçümleri ile incelendi. Sonuçlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 olarak verildi. OCN biyosensörünün tasarımındaki her bir immobilizasyon adımı aşağıda verilen kısaltmalarla isimlendirildi:

1. Au-Bare: Temiz Altın elektrot yüzeyi
2. Au-6MCH: 6-MCH ile kaplanmış elektrot yüzeyi
3. Au-6MCH-1,4BDE: 1,4BDE ile aktive edilerek kaplanan elektrot yüzeyi
4. Au-6MCH-1,4BDE-EA: EA bağlanmış aktif elektrot yüzeyi
5. Au-6MCH-1,4BDE-EA-GLT: Glutaraldehit çapraz bağlaması sonrası elektrot yüzeyi
6. Au-6-MCH-1,4BDE-EA-GLT-Anti OCN: Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi olarak ifade edilmiştir.




**Şekil 4.1.** OCN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları




**Şekil 4.2.** OCN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

Her immobilizasyon basamağı sonrasında EIS analizleri yapıldı, elde edilen Nyquist impedans eğrileri Gamry Echem Analyst® yazılımı kullanılarak Bölüm 3.2.3'te verilen hesaplama yöntemine göre analiz edilerek Rct değerleri hesaplandı. Hesaplama sonuçları Çizelge 4.1'de verildi.

**Çizelge 4.1.** Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan Rct değerleri

| **Elektrot yüzeyi** | **Rct (kΩ)** |
|---|---|
| Au-Bare | 0.2820 |
| Au-6MCH | 0.3162 |
| Au-6MCH-1,4BDE | 0.6138 |
| Au-6MCH-1,4BDE -EA | 0.8573 |
| Au-6MCH-1,4BDE –EA-AntiOCN | 3.3550 |

Elde edilen değerler Au elektroda 6-MCH bağlanması ile elektrodun yüzey direncinin 0.2820 kΩ'dan 0.3162 kΩ'a arttığını göstermektedir (Şekil 4.1). Burada 6-MCH'lerin düzenli yapılar olan SAM'leri oluşturmasıyla, yüzeye bağlanan 6-MCH'nin hidrokarbon zincirlerinin elektron transferini engellediği ve yüzeyi daha yalıtkan yaptığı düşünülmektedir. Bu düzenli yapı bir taraftan elektron transferini engelleyerek yüzeyi daha yalıtkan yaparken diğer taraftan da 6-MCH moleküllerinin uçlarındaki iletkenlik veren serbest hidroksil grupları nedeniyle de elektron iletimini azaltalarak Rct değerini dengelediği düşünülmeltedir, bu nedenle impedans artışının çok olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak bu dengede yalıtkanlığın kazandığı görülmektedir. Elde edilen döngüsel voltamogramlar (CV) incelendiğinde; yalın Au elektroda göre 6-MCH bağlanması ile elde edilen voltamogramların karakteristik piklerinde de bu durum gözlendi. Yüzeyin bir miktar yalıtkan hale gelmesiyle yüzeye daha az redoks probu ulaştığı ve ölçülen akım miktarının da bir miktar azaldığı görüldü (Şekil 4.2).

Sonrasında altın elektrot yüzeyinde SAM formundaki 6-MCH'lerin yüzeyine ara kol olarak 1,4BDE immobilize edildi. 1,4BDE immobilizasyonun elektrot yüzeyinin Rct değerini arttırdığı gözlendi (Çizelge 4.1). Rct değerlerinin 0.3162 kΩ'dan 0.6138k Ω'a arttığı gözlendi. Bu artışın nedeninin 6-MCH'nin hidroksil grubu ile 1,4-BDE arasında oluşan ara ürünün pozitif yüklü olup, redoks probunu elektrot yüzeyine doğru

çekememesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. Bunun sonucu olarak yüzeye daha az redoks probu ulaşmış ve daha az dönüşüme uğramıştır. Elektrot yüzeyine daha az yük ulaşması Rct'nin de yükseldiğini gösterir ki bu sonuç Nyquist eğrisinden de gözlemlenmektedir (Şekil 4.1). Ayrıca daha az elektrolitin dönüşüme uğraması CV'de ölçülen akımın da azalmasına sebep olmuştur (Şekil 4.2). CV'deki bu azalma EIS ölçümlerinden elde edilen sonuçları desteklemektedir.

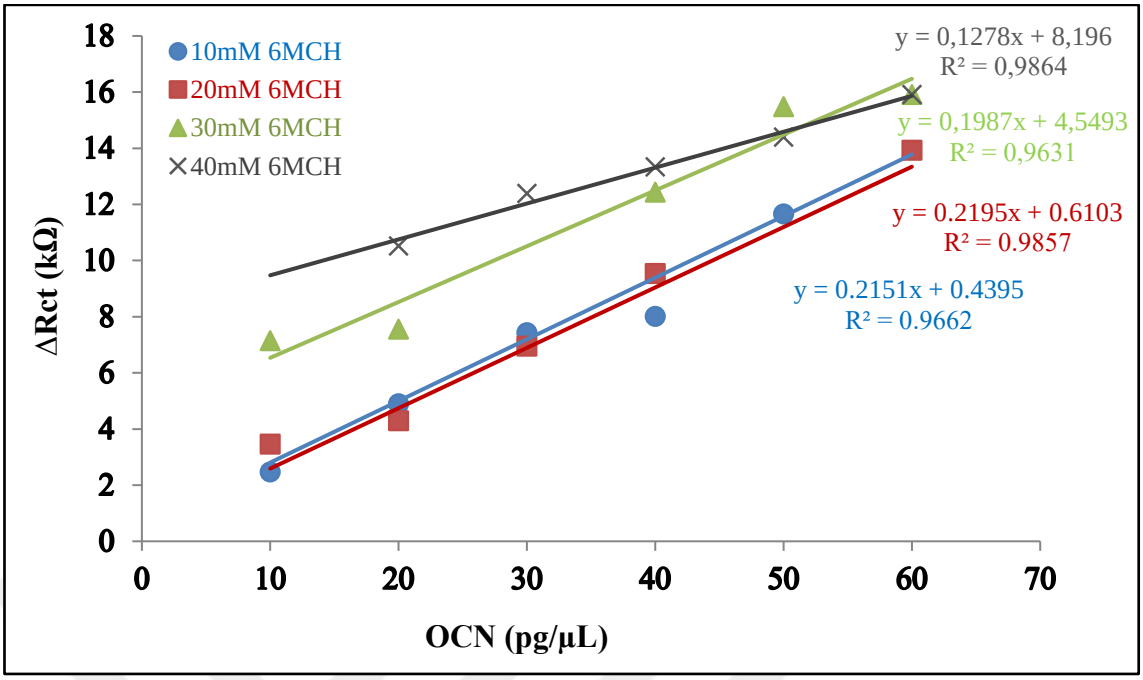
Altın elektrot yüzeyine 1,4BDE immobilizasyonunun ardından Etanloamin immobilize edildi. Etanolamin moleküllerinin serbest uçlarındaki $–NH_2$ gruplarının iletkenlik üzerinde bir miktar etkisi olacağı düşünülür. Ancak elektrot yüzeyinde oluşturulan tabakanın uzunluğu arttığı için yüzeye daha az redoks probu ulaşarak elektrot yüzeyine daha az yük ulaşmasına neden olmuştur. Buna bağlı olarak da Rct'nin 0.6138 kΩ'dan 0.8573 kΩ'a az miktarda yükseldi (Çizelge 4.1).

OCN biyosensörünün dizaynının son aşamasında yüzeye Anti-OCN molekülü immobilize edildi. Bu immobilizasyonla, Rct değeri 0.8573 kΩ'dan 3.3550 kΩ'a yükseldi. Proteinler oluşturulan immobilizasyon hattına nazaran daha büyük moleküller oldukları için elektrot yüzeyine redoks probu transferini büyük ölçüde bloke ederler. EIS spektrumlarından elde edilen Rct değerindeki bu büyük artış (Çizelge 4.1), döngüsel voltamogramlarda da pik akımın değerinde belirgin bir azalmaya neden oldu (Şekil 4.2).

### 4.1.2. Osteokalsin Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

#### 4.1.2.1. 6-MCH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

6-merkaptohekzanol'ün 10 mM, 20 mM, 30 mM ve 40 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileriyle biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile OCN konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.




**Şekil 4.3.** 6-MCH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

**Çizelge 4.2.** 6-MCH konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

| 6-MCH konsantrasyonu | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi |
|---|---|---|
| 10 mM | 0.9662 | y = 0.2151x+0.4395 |
| 20 mM | 0.9857 | y = 0.2195x+0.6103 |
| 30 mM | 0.9631 | y = 0.1987x + 4.5493 |
| 40 mM | 0.9864 | y = 0.1278x + 8.196 |

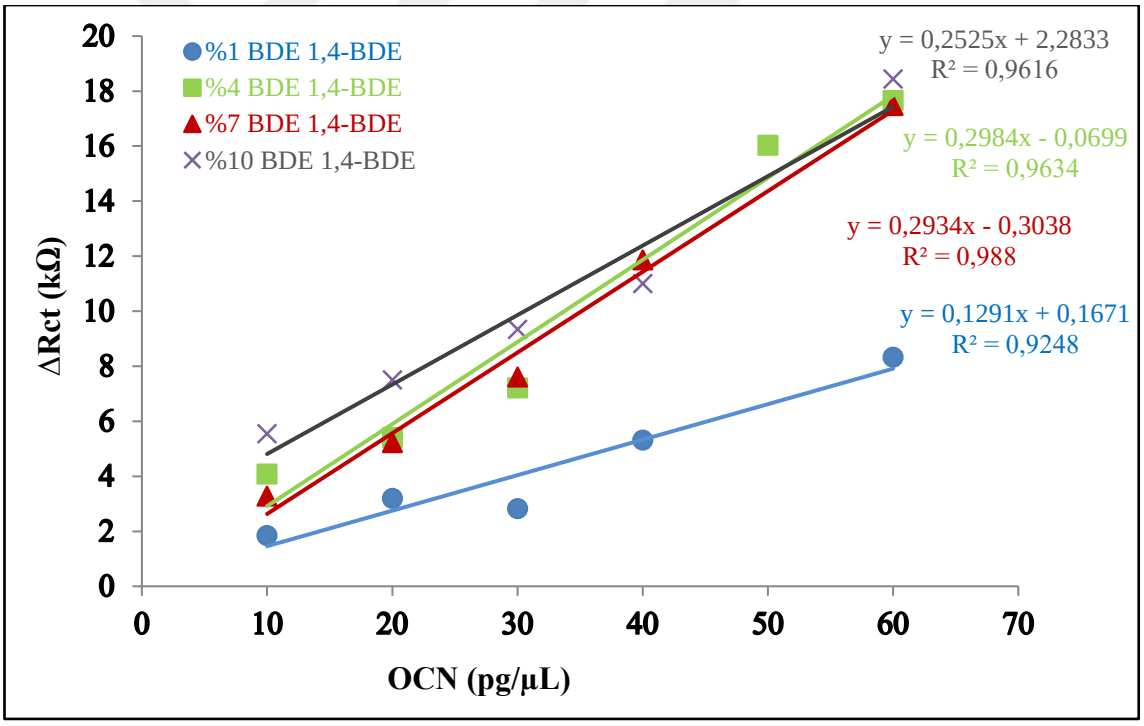
Çalışmadaki tüm biyosensör sonuçları incelenirken, hesaplanılan Rct değerleri ile çalışılan parametrenin verileri arasında oluşturulan standart grafiklerin doğrusallık katsayısı 1'e en yakın ve biyosensör cevabı en yüksek olan konsantrasyon o çalışmada optimum konsantrasyon olarak seçilmiştir.

Şekil 4.3'te görüldüğü üzere 30 mM'lık 6-MCH'nin kullanıldığı biyosensörün verdiği cevabın diğer biyosensörlere göre daha yüksek olmasına rağmen lineerliğinin

düşük olması nedeniyle doğrusallık katsayısının en yüksek olduğu 20 mM'lık 6-MCH optimum konsantrasyon olarak belirlendi. 10 ve 20 mM'lık 6-MCH'nin kullanıldığı biyosensörlerin verdiği cevaplar birbirine çok yakın olmasına rağmen doğrusallık katsayısı nedeniyle 20 mM seçilmiştir. 40 mM'lık 6-MCH'nin kullanıldığı biyosensörün verdiği cevap düşüktür.

#### 4.1.2.2. 1,4-BDE konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

1,4-Bütandiol diglisidil eter % 1, % 4, % 7 ve % 10 olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile OCN konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.3'de verilmiştir.




**Şekil 4.4.** 1,4-Bütandiol diglisidil eterkonsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

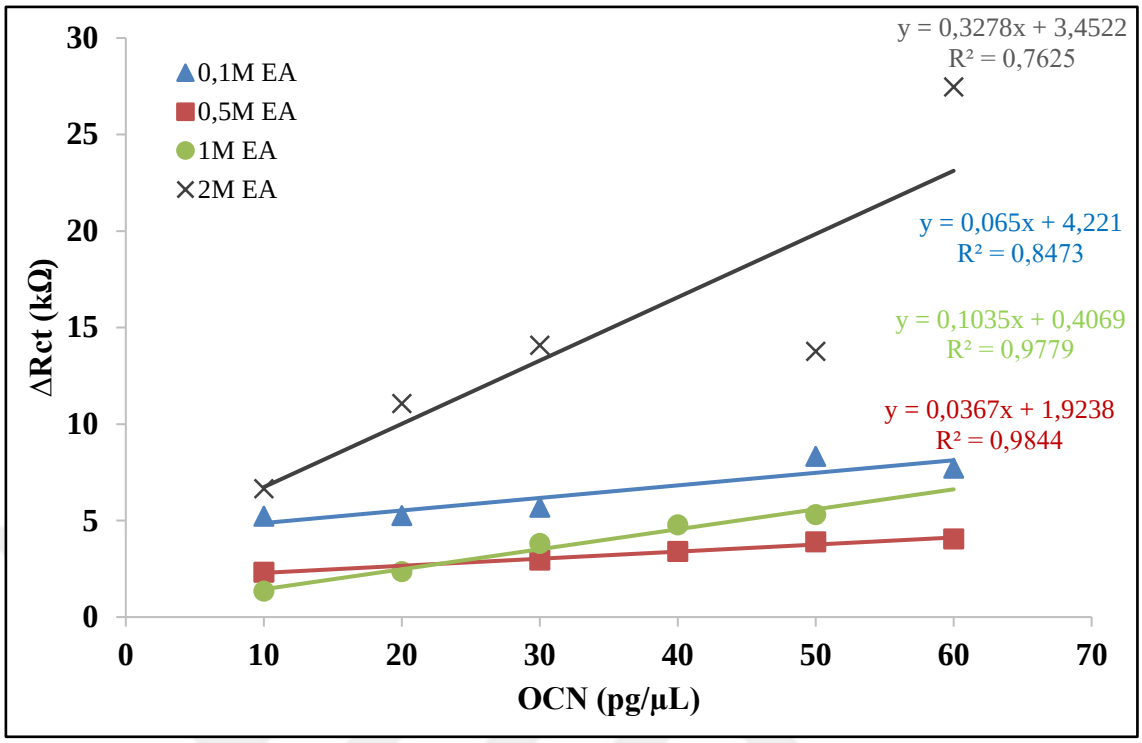
**Çizelge 4.3.** 1,4-Bütandiol diglisidil eterkonsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

| **1,4-BDE konsantrasyonu (w/v)** | **Doğrusallık katsayısı ($R^2$)** | **Doğru denklemi** |
|---|---|---|
| % 1 | 0.9248 | y = 0.1291x+0.1671 |
| % 4 | 0.9634 | y = 0.2984x-0.0699 |
| % 7 | 0.988 | y = 0.2934x - 0.3038 |
| % 10 | 0.9616 | y = 0.2525x + 2.2833 |

Şekil 4.4'deki kalibrasyon grafiği göz önüne alındığında % 1'lik 1,4-BDE'nin kullanıldığı biyosensörün verdiği cevap ve doğrusallık katsayısı düşük olduğu, diğer üç biyosensörün verdiği cevapların birbirine yakın olduğu görüldü. Elde edilen veriler göz önüne alındığında doğrusallık katsayısı ve biyosensör cevabı en yüksek konsantrasyon olan % 7'lik 1,4-BDE konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak seçildi.

#### 4.1.2.3. Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Etanolamin 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M ve 1.5 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile osteokalsin konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'de elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.4'de verilmiştir.




**Şekil 4.5.** Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

**Çizelge 4.4.** Etanolamin konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

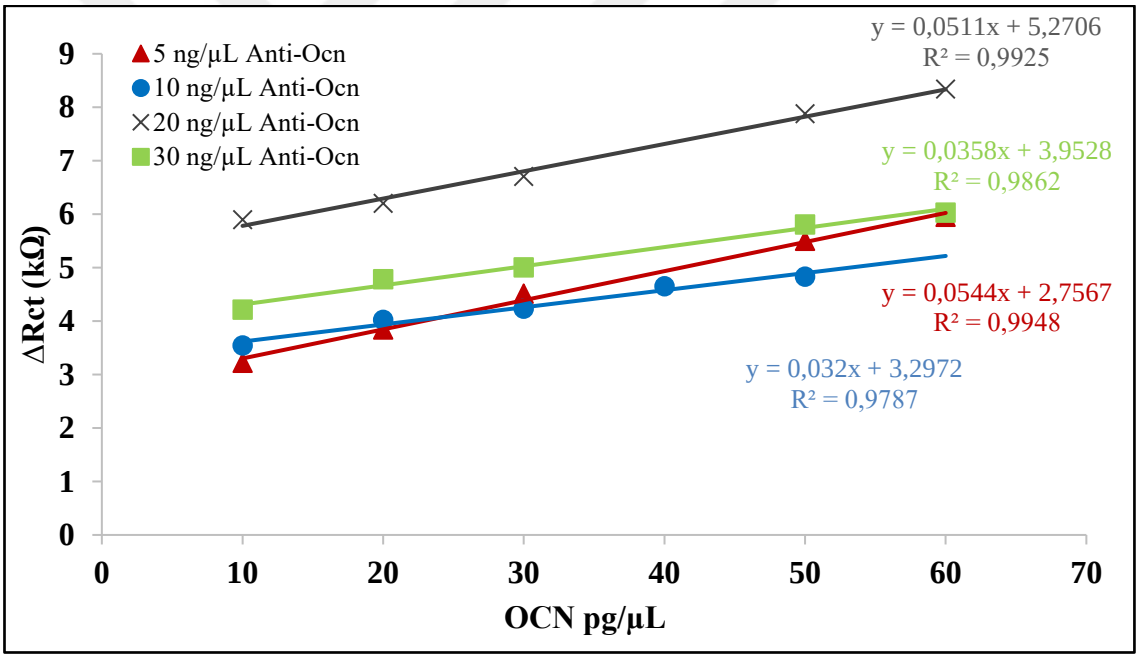
| EA konsantrasyonu | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi |
|---|---|---|
| 0.1 M | 0.8473 | y = 0.065x+4.221 |
| 0.5 M | 0.9844 | y = 0.0367x+1.9238 |
| 1 M | 0.9779 | y = 0.1035x + 0.4069 |
| 2 M | 0.7625 | y = 0.3278x + 3.4522 |

Elde edilen veriler göz önüne alındığında doğrusallık katsayısı ve biyosensör cevabı en yüksek olan konsantrasyon optimum konsantrasyon olarak seçildi. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere 40 mM EA kullanılan elektrot hariç diğer biyosensörlerin

cevaplarının birbirine yakın olduğu görüldü. Doğrusallık katsayısı en yüksek olan ve maliyet açısından en az kimyasal madde kullanılarak hazırlanılan 0.5 M EA optimum konsantrasyon olarak belirlendi. 2 M EA kullanıldığında en yüksek biyosensör cevabı alınmasına rağmen doğrusallık katsayısı çok düşük olduğu görülmektedir.

#### 4.1.2.4. Anti-OCN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

5 ng/µL, 10 ng/µL, 20 ng/µL ve 30 ng/µL olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki Anti-OCN porsiyonlarıyla hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile Osteokalsin konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6'da, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.5'te verilmiştir.




**Şekil 4.6.** Anti-OCNkonsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

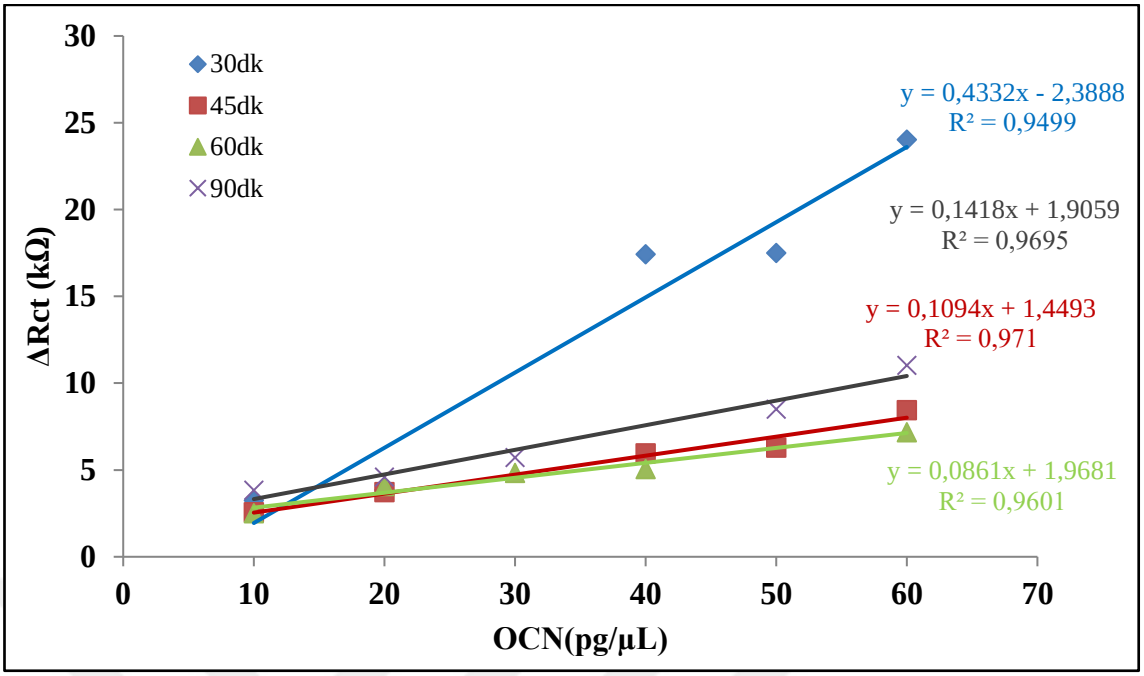
**Çizelge 4.5.** Anti-OCN konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

| Anti-OCN konsantrasyonu | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi |
|---|---|---|
| 5 ng/µL | 0.9948 | y = 0.0544x+2.7567 |
| 10 ng/µL | 0.9787 | y = 0.0320x+3.2972 |
| 20 ng/µL | 0.9925 | y = 0.0511x + 5.2706 |
| 30 ng/µL | 0.9862 | y = 0.0358x + 3.9528 |

Şekil 4.6 ve Çizelge 4.5 incelendiğinde, 5 ng/µL ve 20 ng/µL anti-OCN kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin en yüksek cevabı verdiği görüldü. Bu iki konsantrasyonda hazırlanan biyosensörler için hazırlanan standart grafiklerin doğrusallık katsayıları birbirine yakın olduğu için biyosensör hazırlama maliyeti gözönüne alındı ve 5 ng/µL optimum anti-OCN konsantrasyonu olarak seçildi.

#### 4.1.2.5. OCN inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

10 pg/µL konsantrasyonundaki OCN porsiyonlarının 30 dk, 45 dk, 60 dk ve 90 dk olacak şekilde farklı inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile OCN konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.7'de; elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.6'da verilmiştir.




**Şekil 4.7.** OCN inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

**Çizelge 4.6.** OCN inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

| OCN inkübasyon süresi | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi |
|---|---|---|
| 30 dakika | 0.9499 | y = 0.4332x – 2.3888 |
| 45 dakika | 0.971 | y = 0.1094x + 1.4493 |
| 60 dakika | 0.9601 | y = 0.0861x + 1.9681 |
| 90 dakika | 0.9695 | y = 0.1418x + 1.9059 |

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi OCN analitinin 30 dk inkübasyonu sonucu biyosensör cevabının en iyi olduğu tespit edildi fakat doğrusallık katsayısı düşüktü. Bu nedenle diğer üç konsantrasyonda hazırlanan biyosensör grafiklerinin doğrusallık katsayısı en yüksek olan 45 dk optimum inkübasyon süresi olarak belirlendi.

Geliştirilen OCN biyosensörün dizaynında kullanılan immobilizasyon basamakları için elde edilen optimum değerler Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7.** OCN biyosensörünün tasarımında kullanılan kimyasal maddelerin optimum değerleri

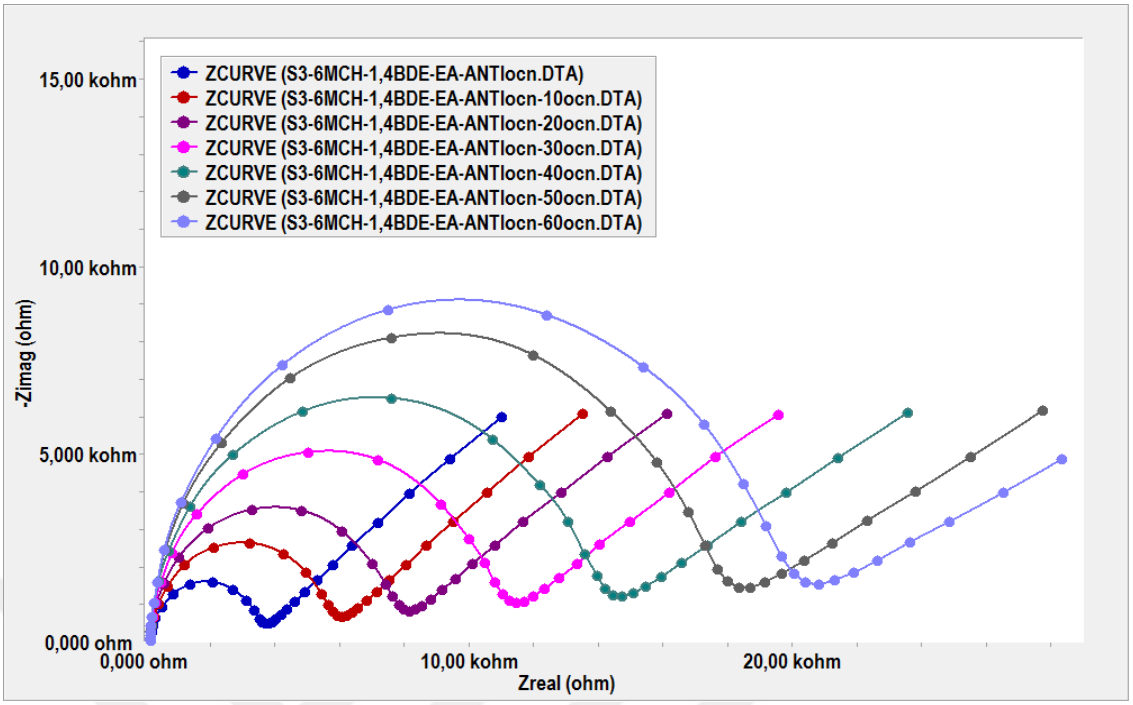
| İmmobilizasyon adımları | Optimum değerler |
|---|---|
| 6-MCH konsantrasyonu | 20 mM |
| 1,4-BDE konsantrasyonu | % 7 |
| EA konsantrasyonu | 0.5 M |
| Glutaraldehit konsantrasyonu | % 2.5 |
| Anti-OCN konsantrastyonu | 5 ng/µL |
| OCN inkübasyon süresi | 45 dk. |

### 4.1.3. OCN Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

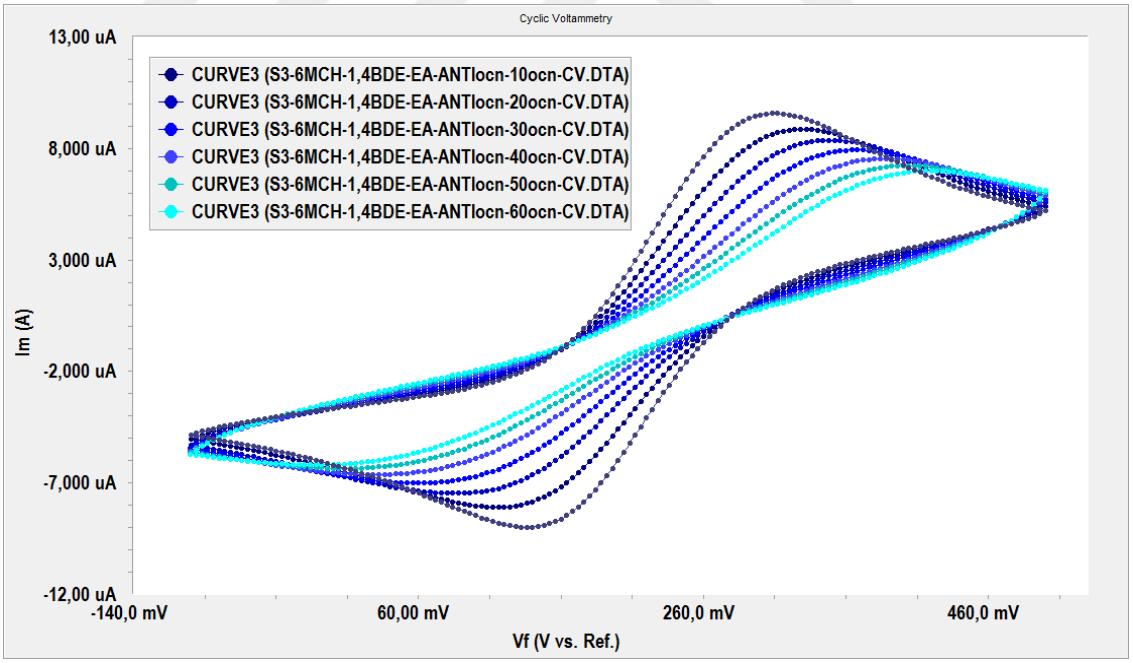
#### 4.1.3.1. Doğrusal tayin aralığı

OCN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının optimizasyonu çalışmalarında elde edilen değerler kullanılarak [6-MCH (20 mM), 1,4BDE (% 7), glutaraldehit (% 2.5), Anti-OCN (10 ng/µL ) ve OCN (5 pg/ µL) 45dk] hazırlanan biyosensörler ile biyosensörün doğrusal tayin aralığını belirlemek için 10-60 pg/µL OCN konsantrasyonu aralığında biyosensör cevapları ölçüldü. 10-60 pg/µL OCN aralığında çalışılan biyosensörlerden elde edilen Nyquist eğrileri ve CV eğrileri alındı ve Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan ΔRct değerleri ile OCN konsantrasyonu arasında standart kalibrasyon eğrileri çizildi. Elde edilen Nyquist eğrileri ve CV eğrileri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verildi.

Şekil 4.8'de görüldüğü üzere yüzeye OCN antijeni bağlandığında elektronların yüzeye ulaşması zorlaşmış, her OCN ilavesinde bu engelleme durumu lineer olarak artarak devam ettiği görüldü. Sonuç olarak her OCN antijeni ilavesi sonrası alınan impedans spektrumlarında impedans değerlerinin arttığı ve döngüsel voltamogramlarda ise pik yüksekliklerinin yani iletkenliklerinin azaldığı gözlendi.

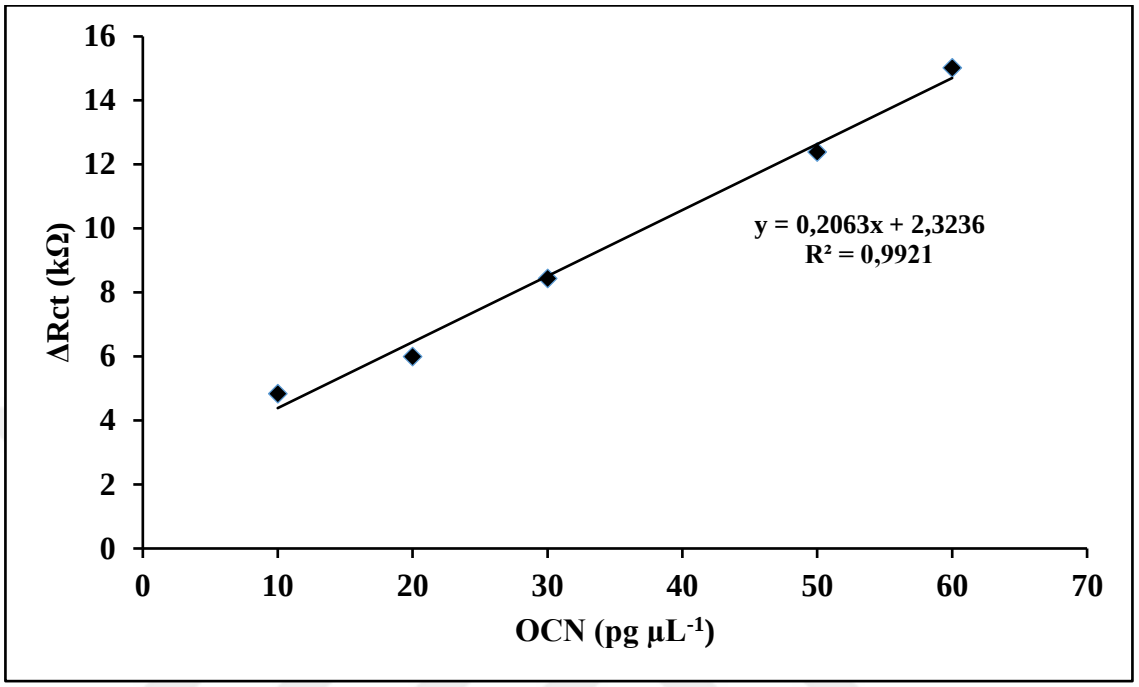



**Şekil 4.8.** 10-60 pg/µL OCN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri




**Şekil 4.9.** 10-60 pg/µL OCN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar

Nyquist eğrilerinden hesaplanan Rct değerleri kullanılarak OCN standart kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve Şekil 4.10'da verildi.




**Şekil 4.10.** 10-60 pg/µL tayin aralığında OCN biyosensörü kalibrasyon grafiği

#### 4.1.3.2.OCN biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

OCN biyosensörü hazırlanırken elektrot yüzeyinde immobilizasyon esnasında meydana gelen kaplanma durumu 10 farklı tarama hızında (10-100 mV) CV ölçümleri alınarak gerçekleştirildi. Au-yalın elektrot ve Anti-OCN kaplanmış (Au / 6-MCH / 1,4-BDE / EA / GLT / Anti-OCN) elektrot için -0.1, 0.5 V potansiyel aralığında 10-20-30-40-50-60-70-80-90-100 $mVs^{-1}$ olacak şekilde 10 farklı tarama hızında CV ölçümlerinden elde edilen veriler Bölüm 3.2.8.2'de verilen Laviron eşitliğinde yerine konularak hesaplandı. Au-çıplak elektrot yüzeyi için yüzey alanı (Γ) $1.9\times10^{-7}$ $mol/cm^2$, Au / 6-MCH / 1,4-BDE / EA / GLT / Anti-OCN elektrotunun yüzeyi için $2.9\times10^{-7}$ $mol/cm^2$ olarak hesaplandı. Au / 6-MCH / 1,4-BDE / EA / GLT / Anti-OCN elektrotunun Γ değerleri, çıplak elektrot için elde edilen yüzey alanı değerinden belirgin şekilde daha yüksek olduğu gözlendi, bu da Au elektrot yüzeyinin Anti-OCN ile kaplandığını gösterdi.

#### 4.1.3.3. Tekrar üretilebilirlik

Bölüm 3.2.8.3'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [6-MCH (20 mM), 1,4BDE (% 7), glutaraldehit (% 2.5), Anti-OCN (10 ng/µL) ve OCN (5 pg/ µL) 45dk] hazırlanan sekiz farklı biyosensör ile 10-60 pg/µL OCN konsantrasyon aralığında biyosensör cevapları alındı. Elde edilen Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan ΔRct değerleri ile OCN konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ($R^2$), doğru denklemleri Çizelge 4. 8'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.8.** 10-60 pg/µL aralığında OCN biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

| Biyosensor numarası | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi | Tayin aralığı (pg/µL) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,992 | y= 0,206x + 2,324 | 10-60 |
| 2 | 0,992 | y= 0,091x + 0,775 | 10-60 |
| 3 | 0,987 | y= 0,108x + 1,343 | 10-60 |
| 4 | 0,987 | y= 0,201x – 0,234 | 10-60 |
| 5 | 0,986 | y= 0,299x – 0,037 | 10-60 |
| 6 | 0,9869 | y=0,3311x-1,662 | 10-60 |
| 7 | 0,980 | y= 0,247x + 2,143 | 10-60 |
| 8 | 0,978 | y= 0,485x – 1,092 | 10-60 |

Çizelge 4.8'de de görüldüğü gibi hazırlanan 8 farklı OCN biyosensörünün de benzer eğim ve doğrusallık katsayılarına sahip olduğu görülmektedir. Benzer sonuçların elde edilmesi, optimize edilmiş immobilizasyon koşullarında hazırlanan OCN biyosensörlerinin tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğunu ve OCN miktar analizlerini yüksek doğrulukta yapabilediğini göstermektedir.

#### 4.1.3.4. Yapay serumda uygulama

Bölüm 3.2.8.4'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [6-MCH (20 mM), 1,4BDE (% 7), glutaraldehit (% 2.5), Anti-OCN (10 ng/µL ) ve OCN (5 pg/ µL) 45dk] hazırlanan biyosensörler ile yapay serumda ölçümler alındı. Yapay serumun biyosensör cevabı üzerindeki etkisi 10-60 pg/µL lineer aralığında incelendi. Ölçümler, optimum immobilizasyon koşulları altında hazırlanan biyosensörler ile yapay serumda hazırlanan OCN porsiyonları için gerçekleştirildi. Hazırlanan OCN biyosensörü ile yapay serumda hazırlanan OCN miktarları belirlenerek, oluşturulan standart grafik denkleminden OCN miktarları ve % dönüşüm sonuçları hesaplandı ve Çizelge 4.9'da verildi.

**Çizelge 4.9.** Yapay serum örneklerinde önerilen biyosensörü kullanarak elde edilen OCN ölçümünün sonuçları

| **Yapay serumdaki OCN seviyesi (pg/µL)** | **Ölçülen OCN seviyesi (pg/µL)** | **Dönüşüm (%)** |
|---|---|---|
| 10 | 9.85 | 98.5 |
| 20 | 20.93 | 104.6 |
| 30 | 28.82 | 96.06 |
| 50 | 50.54 | 101.08 |
| 60 | 59.85 | 99.75 |

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi, yapay serum numunelerindeki analizler yapay serumdaki tuzların ve diğer biyomoleküllerin biyosensör yanıtı üzerinde çok etkisi olmamıştır. Bu nedenle, geliştirilen biyosensör gerçek serum örneklerinde de OCN'nin kesin ve spesifik olarak belirlenmesi potansiyeline sahiptir.

Geliştirilen OCN biyosensörünün tespit ve tayin sınırlarını belirlemek üzere IUPAC tavsiyelerine göre LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. OCN biyosensörünün LOD değeri 1.1 pg/µL, LOQ değeri 3.7pg/µL olarak belirlendi.

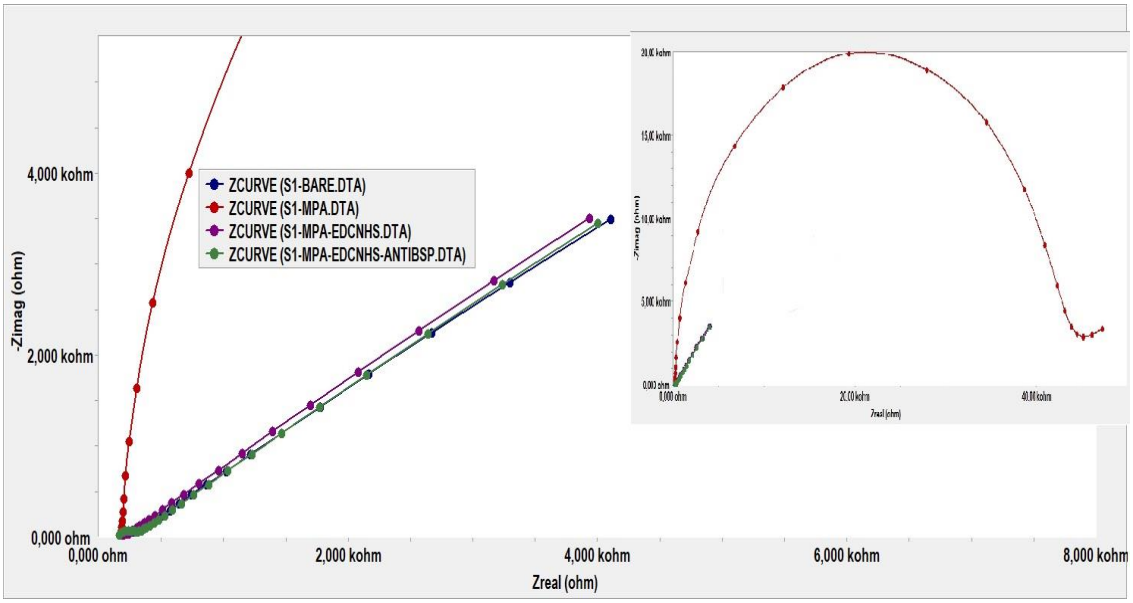
Sonuç olarak bu tez kapsamında; 10-60 pg/µL tayin aralığında, yüksek doğrulukta OCN tayini yapabilen, tekrar üretilebilirliği yüksek OCN biyosensörleri başarıyla hazırlanmıştır.

## 4.2. Osteopontin Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular

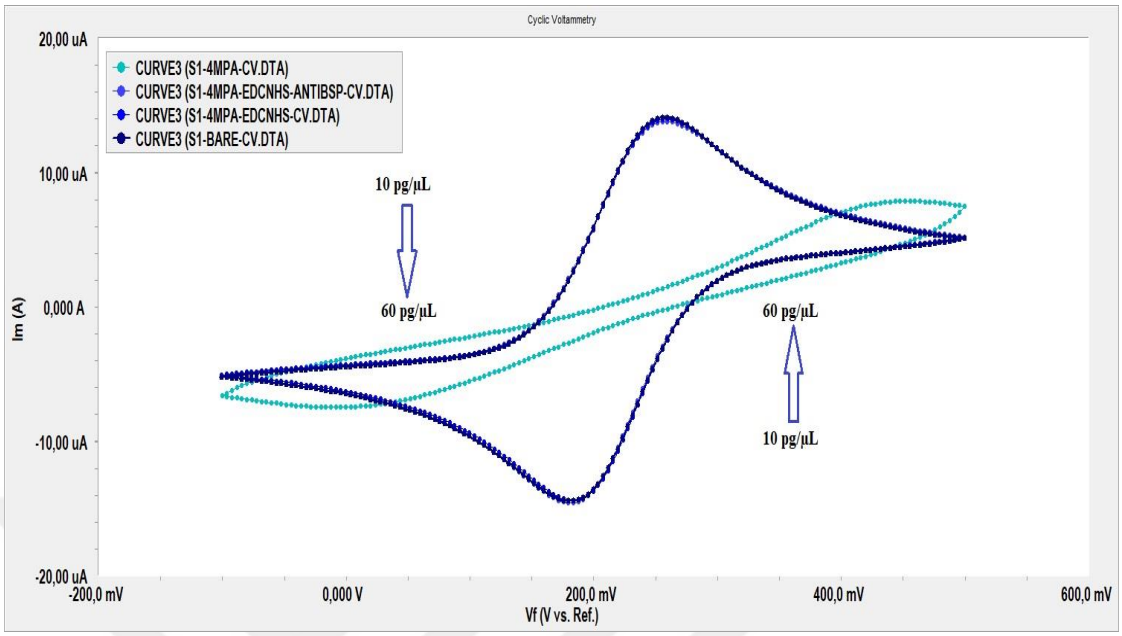
### 4.2.1. Osteopontin Biyosensörünün Dizaynına İlişkin Bulgular

Osteopontin biyosensörünün her bir immobilizasyon basamağından sonra elektrot yüzeyindeki değişimler EIS ve CV ölçümleri ile incelendi. Sonuçlar Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 olarak verildi. OPN biyosensörünün dizaynındaki her bir immobilizasyon adımı aşağıda verilen kısaltmalarla isimlendirildi:

1. Au-Bare: Temiz Altın elektrot yüzeyi
2. Au-4MPA: 4-MPA ile kaplanmış elektrot yüzeyi
3. Au-4MPA-EDC/NHS: EDC/NHS ile aktive edilmiş modifiye elektrot yüzeyi
4. Au-4MPA-EDC/NHS-ANTIOPN: Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi olarak ifade edilmiştir.




**Şekil 4.11.** OPN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları




**Şekil 4.12.** OPN biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

Bölüm 3.2.3'teki hesaplama yöntemine göre her bir immobilizasyon basamağı için Gamry Echem Analyst® yazılımı ile Nyquist impedans spektrumlarından Rct değerleri hesaplandı, belirlenen Rct sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4. 10.** Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan Rct değerleri

| **Elektrot yüzeyi** | **Rct (kΩ)** |
|---|---|
| Au-Bare | 0.1606 |
| Au-4MPA | 15.42 |
| Au-4MPA-EDC/NHS | 0.07191 |
| Au-4MPA-EDC/NHS-AntiOPN | 0.1913 |

Temiz altın elektrot yüzeyine immobilize edilen 4-MPA'ların düzenli tek tabakalar olarak adlandırılan SAM'leri oluşturdukları ve yüzeye bağlanan 4-MPA'nın fenil grubundan dolayı yüzey direncinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.11). OCN

biyosensöründe kullanılan 6-MCH'lerin yapısında bulunan hidrokarbon zincirleri, iletkenliği bir miktar engellemiştir (Şekil 4.1). OPN biyosensöründe kullanılan 4-MPA'ların yapısında bulunan feniller düzlemsel olup, bu düzlemsellik nedeniyle çok daha düzenli tabakalar oluşturduğu, bu nedenle de impedansının çok yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.11). Rct değerleri hesaplandığında da yalın altın elektrodun Rct değeri 0.1606 kΩ iken, 4-MPA kaplanmış elektrodun Rct değeri 15.42 kΩ'a kadar çok yüksek oranda artmıştır (Çizelge 4.9). CV ölçümleri göz önüne alındığında Şekil 4.12'de elde edilen döngüsel voltamogramlarda Au elektrot yüzeyine 4-MPA bağlanması ile voltamogramlardaki karakteristik pikin kaybolduğu ve daralma olduğu gözlenmektedir.

Çizelgeden de görüldüğü üzere 4-MPA'da bulunan karboksil uçlarını aktifleştirmek için kullanılan EDC/NHS, elektrot yüzeyinin Rct değerini çok fazla düşürmüştür (Çizelge 4.10). Rct değerinin düşmesi elektrot yüzeyine daha fazla yük ulaştığının bir göstergesidir. Bunun sebebi, karboksil grubunun aktifleştirilmesi sonucu olarak yüzeye daha fazla redoks probu ulaştığının göstergesidir. Bu Şekil 4.11'de impedansın artmasıyla görülmektedir. Yüzeye eklenen aktif EDC/NHS nedeniyle 0.1 M KCl içeren ve 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi aracılığıyla aktarılan elektronlar artan iletkenlikle birlikte daha fazla yükün ulaştığını, bu da 15.42 kΩ olan Rct değerinin 0.07191 kΩ'a düştüğünü gösterir. Bu hem impedans grafiklerinden (Şekil 4.11) hem de CV'lerden (Şekil 4.12) görülmüştür.

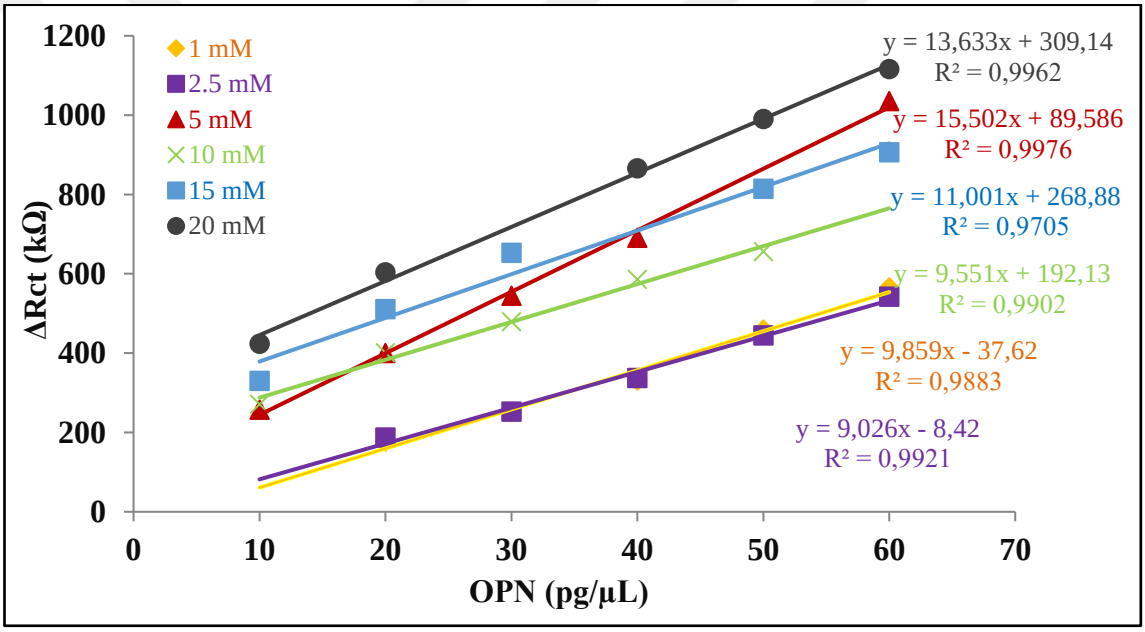
Yüzeye Anti-OPN bağlandığında yüzeyin elektron geçirgenliği azalır. Çünkü proteinler oluşturduğumuz immobilizasyon hattına göre daha büyük moleküllerdir ve elektrot yüzeyine redoks probunun elektron transferini bir miktar bloke ederler. Sonuç olarak EIS spektrumları için Rct değerinde bir miktar artış, döngüsel voltamogramlarda ise pik yüksekliği değerinde küçük miktarda azalma gözlenmiştir.

Yüzeye OPN antijeni bağlandığında ise elektronların yüzeye ulaşması daha da zorlaşır. Her OPN ilavesinde bu engelleme işlemi artarak devam eder. Sonuç olarak her ilave sonrası, alınan impedans spektrumlarında Rct değerlerinin arttığı ve döngüsel voltamogramlarda ise pik yüksekliklerinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.17).

### 4.2.2. Osteopontin Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

#### 4.2.2.1. 4-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

4-merkaptofenilasetik asit 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile OPN konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.13'te, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.11'de verilmiştir.




**Şekil 4.13.** 4-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

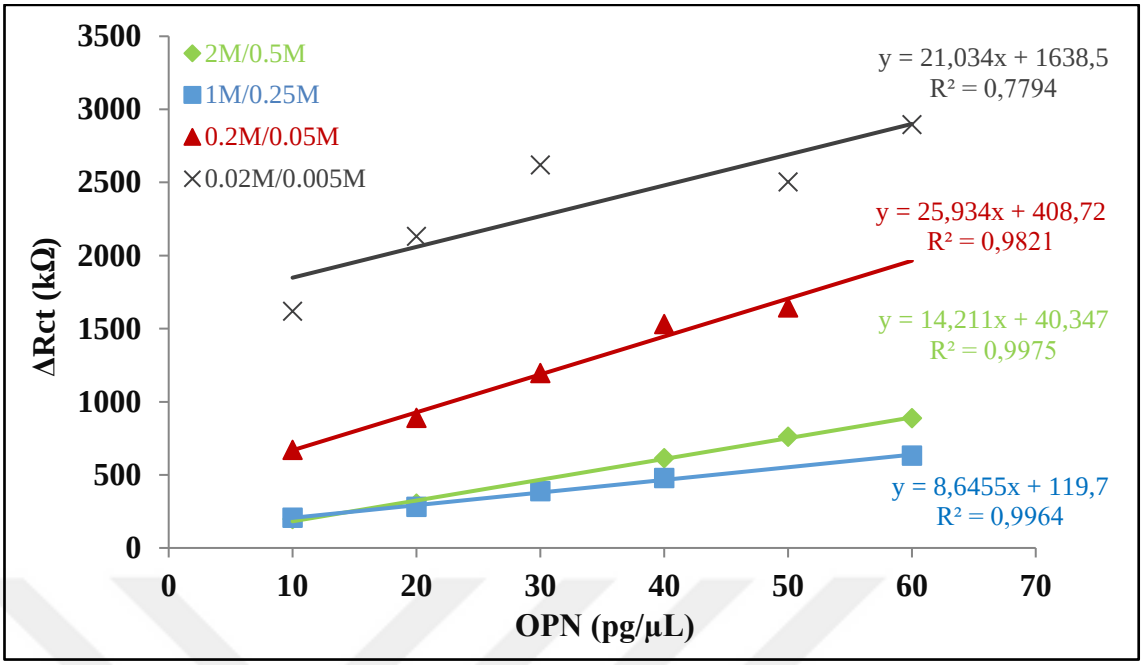
**Çizelge 4.11.** 4-MPA konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

| 4-MPA konsantrasyonu | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi |
|---|---|---|
| 1 mM | 0.9883 | y = 9.859x-37.62 |
| 2.5 mM | 0.9921 | y = 9.026x-8.42 |
| 5 mM | 0.9976 | y = 15.502x + 89.586 |
| 10 mM | 0.9902 | y = 9.551x + 192.13 |
| 15 mM | 0.9705 | y = 11.001x + 268.88 |
| 20 mM | 0.9962 | y = 13.633x + 309.14 |

Şekil 4.13'te görüldüğü üzere, en yüksek doğrusallık katsayısı ve biyosensör cevapları 5 mM ve 20 mM 4-MPA konsantrasyonlarında hazırlanan biyosensörler için elde edildi. 4-MPA konsantrasyonundaki artışın biyosensör cevabı üzerine çok fazla etkisi olmadığı için 5 mM optimum 4-MPA konsantrasyonu olarak belirlendi.

#### 4.2.2.2. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

EDC/NHS 2 M / 0.5 M, 1 M / 0.25 M, 0.2 M / 0.05 M ve 0.02 M / 0.005 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile OPN konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.14'te, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.12'de verilmiştir.




**Şekil 4.14.** EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

**Çizelge 4.12.** EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

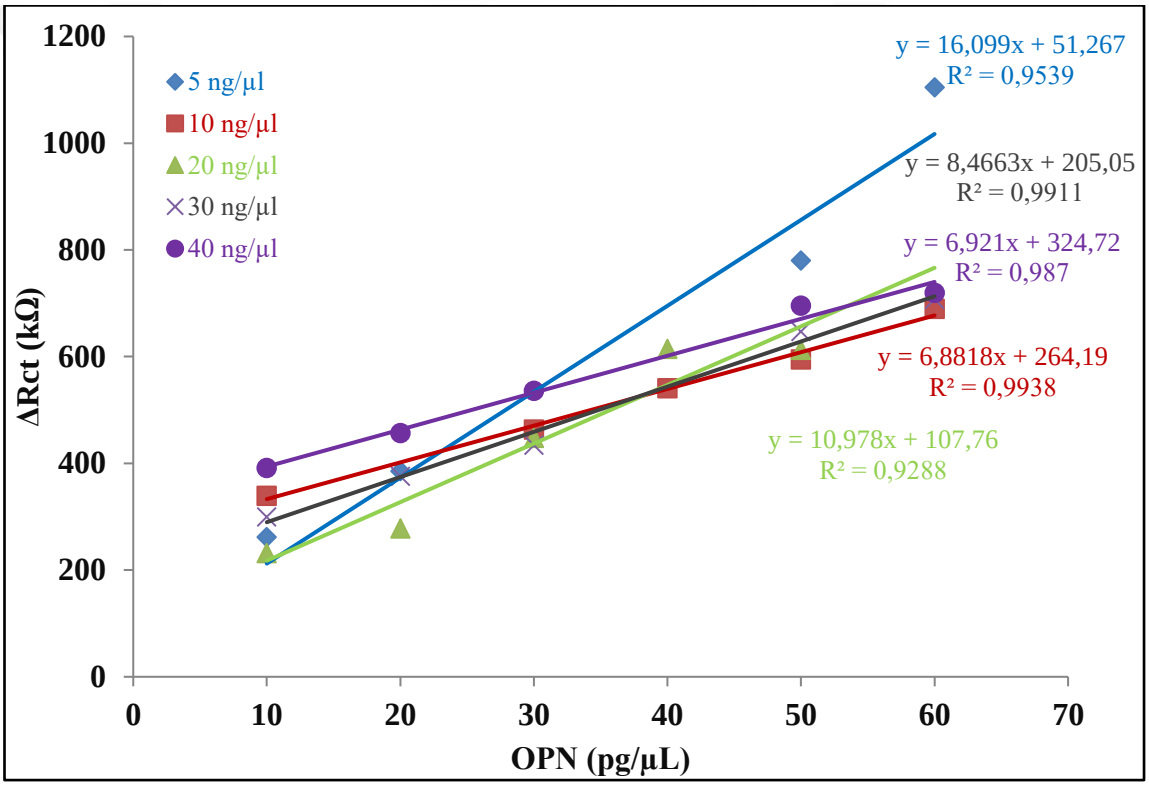
| EDC/NHS konsantrasyonu | Doğrusallık katsayısı ($R^2$) | Doğru denklemi |
|---|---|---|
| 2M/0.5M | 0.9975 | y = 14.211x+40.347 |
| 1M/0.25M | 0.9964 | y = 8.6455x+119.7 |
| 0.2M/0.05M | 0.9821 | y = 25.934x + 408.72 |
| 0.02M/0.005M | 0.7794 | y = 21.034x + 1638.5 |

Şekil 4.14'te görüldüğü üzere biyosensör cevabı en yüksek olan EDC/NHS konsantrasyonu 0.02 M / 0.005 M olarak gözlemlendi fakat doğrusallık katsayısının düşüktü. Diğer üç konsantrasyon için hazırlanan biyosensörlerin grafiklerinin doğrusallık katsayıları birbirine yakın olduğu belirlendi. Deney sırasında yüksek EDC/NHS konsantrasyonlarında çözeltilerin elektrot yüzeyinde katılaştığı görüldü. Katılaşan EDC/NHS çözeltisini yüzeyden uzaklaştırmak için uygulanan temizleme işleminde tabaka yüzeyden çok zor ayrıldı. Bu temizleme işleminin altın elektrot yüzeyine immobilize edilmiş moleküllere zarar verebileceği düşünülerek doğrusallık

katsayısı ve biyosensör cevabı nispeten yüksek olan 0.2 M / 0.05 M optimum EDC/NHS konsantrasyonu olarak seçildi.

#### 4.2.2.3. Anti-OPN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

5 ng/µL, 10 ng/µL, 20 ng/µL, 30 ng/µL ve 40 ng/µL olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki Anti-OPN porsiyonlarıyla hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile Osteopontin konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.15'te, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.13'te verilmiştir.




**Şekil 4.15.** Anti-OPN konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

**Çizelge 4.13.** Anti-OPN konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

| **Anti-OPNkonsantrasyonu** | **Doğrusallık katsayısı ($R^2$)** | **Doğru denklemi** |
|---|---|---|
| 5 ng/µL | 0.9539 | y = 16.099x+51.267 |
| 10 ng/µL | 0.9938 | y = 6.8818x+264.19 |
| 20 ng/µL | 0.9288 | y = 10.978x + 107.76 |
| 30 ng/µL | 0.9911 | y = 8.4663x + 205.05 |
| 40 ng/µL | 0.987 | y = 6.921x+324.72 |

Şekil 4.15'te görüldüğü üzere; 10, 20, 30 ve 40 ng/µL Anti-OPN konsantrasyonlarında hazırlanan biyosensörler için oluşturulan standart grafiklerin eğimleri birbirine yakındır. Bu nedenle bu dört konsantrasyondan en yüksek doğrusallık katsayısının elde edildiği 10 ng/µL optimum Anti-OPN konsantrasyonu olarak belirlendi. 5 ng/µL Anti-OPN konsantrasyonunda, en yüksek biyosensör cevabı alınmasına rağmen doğrusallık katsayısının düşüktü.

Geliştirilen OPN biyosensör sisteminin dizaynında kullanılan immobilizasyon basamakları için elde edilen optimum değerler Çizelge 4.14'te gösterilmiştir.

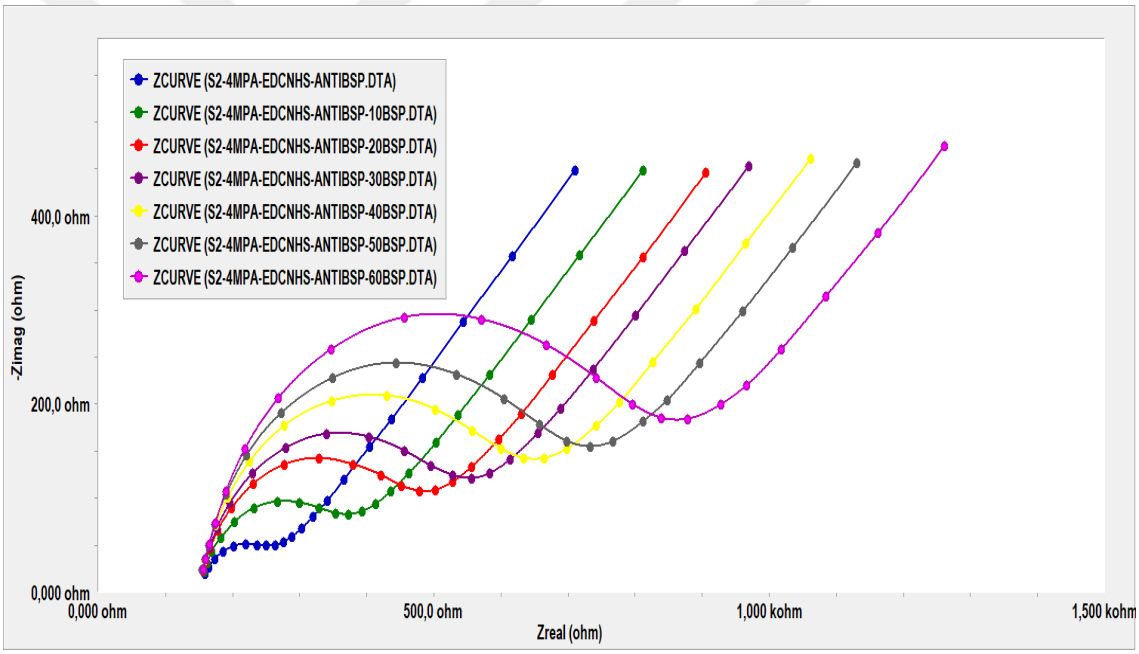
**Çizelge 4.14.** OPN biyosensörünün tasarımında kullanılan kimyasal maddelerin optimum değerleri

| **İmmobilizasyon adımları** | **Optimum değerler** |
|---|---|
| 4-MPA konsantrasyonu | 5 mM |
| EDC/NHS konsantrasyonu | 0.2 M / 0.05 M |
| Anti-OPN konsantrasyonu | 10 ng/µL |

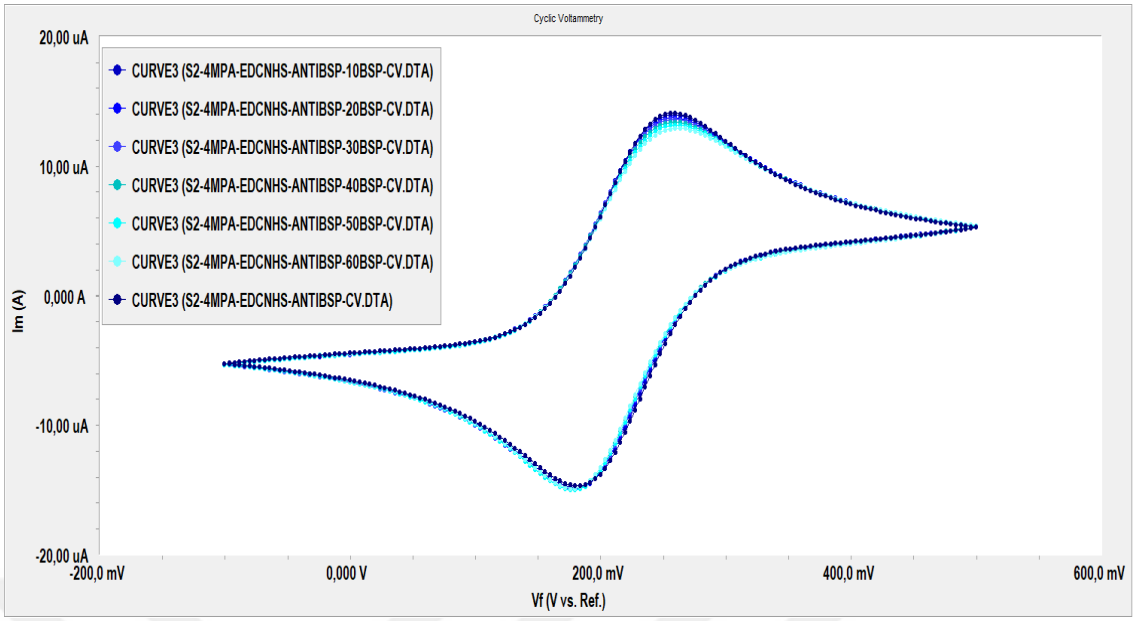
### 4.2.3. OPN Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

#### 4.2.3.1. Doğrusal tayin aralığı

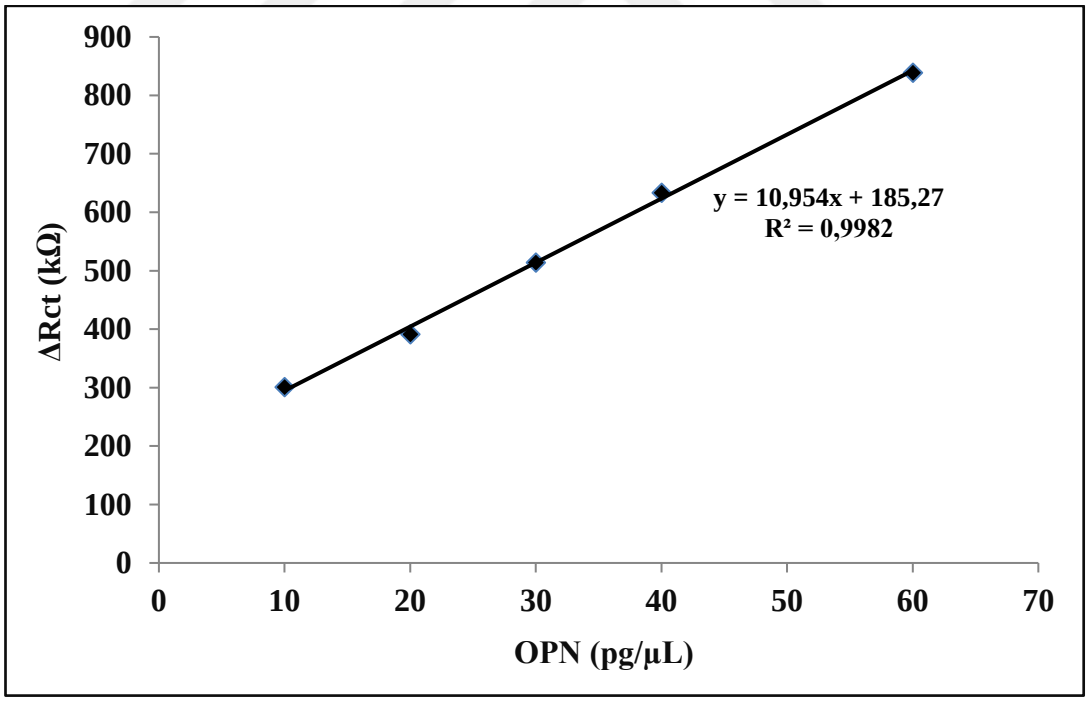
Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2M/0,05M), Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/ µL) 45dk] hazırlanan biyosensör ile daha geniş bir doğrusal tayin aralığı belirlemek için iki farklı OPN konsantrasyonu aralığında çalışmalar yapılmıştır. 10-60 pg/µL OPN aralığında çalışılan biyosensörden elde edilen Nyquist eğrileri, CV eğrileri ve bu eğriler kullanılarak hesaplanan ΔRct değerleri ile OPN konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrileri Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.16.** 10-60 pg/µL OPN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri




**Şekil 4.17.**10-60 pg/µL OPN tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar




**Şekil 4.18.** 10-60 pg/µL tayin aralığında OPN biyosensörü kalibrasyon grafiği

#### 4.2.3.2. OPN biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

OPN biyosensörünün elektrot yüzeyinde meydana gelen kaplanma durumu 10 farklı tarama hızında (10-100 mV) CV ölçümleri alınarak gerçekleştirildi. Au-çıplak elektrot ve Au / 4-MPA / EDC-NHS / Anti-OPN elektrot için -0.1, 0.5 V potansiyel aralığında 10-20-30-40-50-60-70-80-90-100 $mVs^{-1}$ olacak şekilde 10 farklı tarama hızında CV ölçümlerinden elde edilen veriler Bölüm 3.2.8.2'de verilen Laviron eşitliğinde yerine konularak Au-çıplak elektrot yüzeyi için yüzey alanı 0.215 $mol/cm^2$, Au / 4-MPA / EDC-NHS / Anti-OPN elektrotunun yüzeyi için 0.288 $mol/cm^2$ olarak hesaplandı. Au / 4-MPA / EDC-NHS / Anti-OPN elektrotunun Γ değerleri, çıplak elektrot için elde edilen yüzey alanı değerinden belirgin şekilde daha yüksek olduğu belirlendi. Bu da altın elektrot yüzeyinde Anti-OPN immobilizasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.3.3. Tekrar üretilebilirlik

Bölüm 3.2.8.3'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2M/0,05M), Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/ µL) 45dk] hazırlanan10farklı biyosensör ile 10-60 pg/µLOPN konsantrasyon aralığında biyosensör cevapları alındı. Elde edilen Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan ΔRct değerleri ile OPN konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ($R^2$), doğru denklemleri Çizelge 4. 15'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.15.** 10-60 pg/µL aralığında OPN biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

| Biyosensör numarası | Doğrusallık Katsayısı ($R^2$) | Doğru Denklemi | Tayin aralığı (pg/µL) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,9762 | y=6,5908x+209,15 | 10-60 |
| 2 | 0,991 | y=8,5286x+237,97 | 10-60 |
| 3 | 0,9741 | y=7,1624x+423,97 | 10-60 |
| 4 | 0.9982 | y=10.954x+ 185.27 | 10-60 |
| 5 | 0.9957 | y=7.937x+149.15 | 10-60 |
| 6 | 0.9849 | y=10.227x+172.05 | 10-60 |
| 7 | 0.9922 | y=10.126x+256.16 | 10-60 |
| 8 | 0.992 | y=8.3078x+208.14 | 10-60 |
| 9 | 0.987 | y=9.59x+261.18 | 10-60 |
| 10 | 0.9956 | y=6.8919x+348.99 | 10-60 |

Çizelge 4.15'te de görüldüğü gibi hazırlanan 10 farklı OPN biyosensörünün de benzer eğim ve doğrusallık katsayılarına sahip olduğu belirlendi. Bu da optimize edilmiş immobilizasyon koşullarında hazırlanan OPN biyosensörlerinin tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğunu ve OPN miktar analizlerini yüksek doğrulukta yaptığını göstermektedir.

#### 4.2.3.4. Yapay serumda uygulama

Bölüm 3.2.8.4'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2M/0.05M), Anti-OPN (10 ng/µL) ve OPN (10 pg/ µL) 45dk] hazırlanan biyosensörler ile yapay serumda ölçümler alınmıştır. Yapay serumun biyosensör cevabı üzerindeki etkisi 10-60 pg/µL OPN konsantrasyon aralığında incelendi. Yapay serumda hazırlanan OPN porsiyonları optimum immobilizasyon koşulları altında hazırlanan biyosensörler ile ölçümler alındı. .

Hazırlanan OPN biyosensörü ile yapay serumdaki OPN miktarları belirlenerek, oluşturulan standart grafik denkleminden OPN miktarları ve % dönüşüm sonuçları hesaplandı ve Çizelge 4.16'da verildi.

**Çizelge 4.16.** Yapay serum örneklerinde önerilen biyosensörü kullanarak elde edilen OPN ölçümünün sonuçları

| **Yapay serumdaki OPN seviyesi (pg/µL)** | **Ölçülen OPN seviyesi (pg/µL)** | **Dönüşüm (%)** |
|---|---|---|
| 20 | 20.613 | 103 |
| 30 | 29.169 | 97.23 |
| 40 | 39.883 | 99.71 |
| 50 | 50.272 | 100.5 |
| 60 | 60.062 | 100.1 |

Yapay serum numuneleri kullanılarak ölçülen OPN seviyeleri ve % dönüşüm verileri yapay serum bileşimindeki tuzların ve diğer biyomoleküllerin biyosensör yanıtı üzerinde çok etkisi olmadığını göstermektedir. Bu da; geliştirilen OPN biyosensörünün gerçek serum örneklerinde OPN miktar tayininin kesin ve spesifik olarak belirlenmesi için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen OPN biyosensörünün tespit ve tayin sınırlarını belirlemek üzere IUPAC tavsiyelerine göre LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. OPN biyosensörünün LOD değeri 2.64 pg/µL, LOQ değeri 8.8 pg/µL olarak belirlendi.

Bu tez kapsamında; 10-60 pg/µL tayin aralığında, yüksek doğrulukta OPN tayini yapabilen, tekrar üretilebilirliği yüksek OPN biyosensörleri başarıyla hazırlanmıştır.

# BÖLÜM 5

# TARTIŞMA

Vücutta bulunan dokular arasında en sert yapıya sahip olan kemikler; bedenin desteklenmesinde, hareket etmesinde ve vücut içerisindeki organların dış etkilerden korunmasında önemli fonksiyonları yerine getirir. Dinamik bir döngüye sahip kemikte; kemik yapım ve yıkımı dengede olacak şekilde kontrol edilerek düzenlenmektedir (Seibel M. J., 2005). Kemik döngüsünün yapım ve yıkım olayları sırasında kana ve idrara bir takım kemik matriks elemanları geçerek kemik metabolizması hakkında bilgi verirler. Kemik yapımı sırasında vücut sıvılarına salınan moleküller; osteokalsin (OCN), kemiğe özgü alkalen fosfataz (BALP), prokollajen Tip 1 N-Terminal (P1NP), prokollajen Tip 1 C-Terminal (P1CP) iken, kemik yıkımı sırasında vücut sıvılarına salınan moleküller; kemik sialoprotein (OPN), Tip 1 kollajen C-terminal telopeptidi (CTx), Tip 1 kollajenin N-terminal telopeptidi (NTx), hidroksi pirolin, hidroksilizin, deoksipiridinolin (DPD), piridinyum çapraz bağlantıları, tartarata dirençli asit fosfataz (TRAP)'dır.

Kemiğin dinamik döngüsünde aksaklık veya bileşiminde bir dengesizlik söz konusu olduğunda başta osteoporoz olmak üzere çeşitli metabolik kemik hastalıkları ortaya çıkmaktadır. Osteoporoz vücuttaki kemikleri etkileyen, en yaygın metabolik kemik hastalıklarından biridir. Osteoporoz, kemik mineral yoğunluğunun azalması sonucu kemik kırılganlığında hassasiyete sebep olur ve osteoporoza bağlı olarak meydana gelen kırıkların sıkça görülmesi nedeniyle de toplum sağlığı açısından önemlidir. Osteoporoz hastalığının tedavi sürecinde hastalığın seyrinin takip edilmesi, kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin miktarlarının takibiyle sağlanabilir. Bu çalışma kapsamında kemik biyobelirteçlerinden OCN ve OPN'nin kanda miktar tayinini yapmak üzere, günümüzde osteoporoz tedavisi süresince kullanılan biyobelirteç analizi

temelli ELISA, RIA gibi tekniklere alternatif olabilecek iki biyosensör sistemi geliştirildi.

Bu amaçla tez kapsamında ilk biyosensör; kemik yapımı sırasında kana bırakılan moleküllerden OCN'nin miktar tayini için geliştirildi. OCN biyosensörünün tasarımında fiziksel bileşen olarak katı altın elektrot kullanıldı, öncelikle Au elektrot yüzeyine SAM stratejisi kullanılarak 6-MCH immobilize edildi. Katı altın elektrot 16 saat oda koşullarında 6-MCH çözeltisinin içinde beklemenin sonucunda, 6-MCH moleküllerinin tiyol ucu ile katı elektrodun altın yüzeyi arasında kovalent ve yarı-kovalent bağlarla SAM olarak isimlendirilen kendiliğinden toplanan düzenli monotabakalar oluşturuldu. SAM tabaka yüzeyinde 6-MCH'ın açıkta kalan hidroksi grupları ile 1,4-BDE ara kolunun epoksit uç grubu kovalent bağ yaparak immobilize edildi.

1,4-BDE molekülü ilk kez bu çalışmayla biyosensör tasarımında kullanılmıştır. 1,4-BDE molekülü enzim ve biyomolekül immobilizasyonlarında sıklıkla kullanılan bir ara koldur. Ancak biyosensör tasarımlarında hiç kullanılmamıştır. 1,4-BDE arakolu üzerinden anti-OCN'nin iletken altın yüzeyine bağlanarak geliştirilen sensör tasarımında kurgulanan kimya stratejisi sayesinde, elektrokimyasal esaslı hassas ve spesifik OCN tayini yapabilen impidimetrik biyosensör ilk kez geliştirilmiştir. Bu stratejinin bütünü bu çalışmaya özgünlük getirmektedir.

Anti-OCN molekülünü elektrot yüzeyine immobilize edebilmek için gerekli kimyasal fonksiyonellik 1,4-BDE üzerine EA arakolu eklenmesiyle başarıldı. Bu reaksiyonun, EA molekülünün hidroksil ucu ile 1,4-BDE'nin epoksit ucu arasında gerçekleştiği düşünülmektedir. EA'nın açıkta kalan amin grubu ile osteokalsin antikoru (Anti-OCN) arasında çapraz bağlayıcı olarak yüzeye Glutaraldehit (GLT) eklendi. GLT iki ucunda aldehit grubu taşıyan bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı moleküldür. Hem EA hem de Anti-OCN moleküllerinin amin gruplarıyla Schiff bazı ara ürünü üzerinden kovalent bağlanma yaptığı düşünülmektedir. Son olarak Anti-OCN antikoru eklenerek OCN biyosensör tasarımı tamamlandı. Bütün bu immobilizasyon basamaklarının takibi EIS yöntemi ile yapıldı. CV analizleri ile EIS analizleri teyit edildi.

Literatürde OCN tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri incelendiğinde Bölüm 2.10'da belirtildiği üzere üç adet OCN biyosensörü üretildiği görülmektedir.

Tasarlanan ilk OCN biyosensörü; Min-Ho Lee ve ark. tarafından geliştirilmiş, elektrokimyasal esaslı amperometrik ölçüm yapabilen bir biyosensördür (Lee, Kim, Seo & Lee, 2014). Bu çalışmada, mikroelektromekanikal sistemler (MEMS) üzerinde altın biriktirme yöntemi ile Au elektrot yüzeyi hazırlanmış, bu yüzeye Ditiyobis-N-süksinimidil propiyanat (DTSP) kullanarak SAM stratejisi ile düzenli tabakalar oluşturulmuş, ardından DMSO, aseton ve fosfat tamponu ile yıkanarak HRP (Horse Radish Peroxidase) ile birleştirilmiş Anti-OCN immobilize edilerek enzim elektrodu halinde biyosensör tasarımı tamamlanmıştır. Au biriktirilmiş MEMS'ler 4 mM DTSP içeren DMSO çözeltisine daldırılıp 15 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda DMSO, aseton ile yıkanarak 1 saat PBS içinde inkübe edilmiştir. Sonrasında, elektrot HRP ile karıştırılmış Anti-OCN ile muamele edilmiştir. Geliştirilen bu elektrokimyasal biyosensör; bir aracı olarak hidrokinon bileşiği varlığında azalan $H_2O_2$ miktarı ile OCN seviyelerini körele ederek hızlı ve hassas amperometrik biyosensör cevapları elde edilmiştir.

2017 yılında Patricia Khashayar ve ark. tarafından OCN tayini için elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiş ve Diferansiyel Pulse Voltametri (DPV) ölçüm yöntemi kullanılarak yüksek hassasiyette biyosensör cevapları elde edilmiştir (Khashayar vd., 2017a). Tasarlanan bu OCN biyosensöründe; cam elektrot yüzeyi siklik voltametri kullanılarak elektrobiriktirme yöntemi ile altın nanopartikül kaplandı. Ardından Au yüzeyine glutatyon tripeptidi sistein amino asit artıklarının tiyol grupları üzerinden immobilize edildi. Glutatyonun açıkta kalan uç karboksilli asit grubu EDC/NHS ile aktifleştirildikten sonra anti-OCN molekülü immobilize edilerek biyosensör tasarımı tamamlanmıştır (Şekil 2.13).

Patricia Khashayar ve ark. diğer bir çalışmalarında, antikor ile modifiye edilmiş altın nanopartiküllerin elektrokimyasal ölçüm sistemi olarak kullanılabilme potansiyelini araştırmak üzere yukarıda belirtilen OCN biyosensörü hazırlama prosedürünü kullanarak, elektrod yerine altın nanoproblar (AuNP-GSH-NHS-anti OCN) hazırladılar (Khashayar, Amoabediny, Larijani, Hosseini & Vanfleteren, 2017b). Çalışmada bu altın nanoprobların hazırlanma koşulları optimize edilmiş, hazırlanan biyosensör yüzeyi TEM, SEM yöntemleriyle analizlenmiş ve biyosensör yüzeyine OCN bağlanması DPV yöntemi ile analizlenmiştir.

Bu tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörünün doğrusal tayin aralığı; 10-60 pg/µL OCN konsantrasyon aralığı olarak belirlenmiştir. Min-Ho Lee ve ark. tarafından geliştirilen OCN biyosensörünün tayin aralığı 1-100 ng/µL, Patricia Khashayar ve ark. tarafından geliştirilen OCN biyosensörününki ise 2.5-90 ng/µL olarak belirlenmiştir (Lee, Kim, Seo & Lee, 2014; Khashayar vd., 2017a). Bu bağlamda tez kapsamında geliştirilen OCN biyosensörünün tayin aralığının bu iki biyosensöre göre daha iyi olduğu, diğer iki biyosensöre göre daha düşük OCN konsantrasyonlarını hassas ve spesifik olarak tespit edebilen bir biyosensör olduğu söylenebilir. Tekrar üretilebilirlik başarısının da oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Geliştirilen OCN biyosensörünün tayin ve tespit limit aralıkları hesaplandığında; LOD değerinin 1.1 pg/µL, LOQ değerinin ise 3.7 pg/µL olduğu belirlenmiştir. Patricia Khashayar ve ark. tarafından geliştirilen OCN biyosensörünün LOD değeri 0.65 ng/µL, LOQ değeri 1.97 ng/µL olarak belirlenmiştir (Khashayar vd., 2017a). Bu sonuçlar da; geliştirilen OCN biyosensörünün, çözeltide OCN molekülünü analizleme başarısının daha iyi olduğunu desteklemektedir. Sonuç olarak bu tez kapsamında; yeni bir kimyasal stratejisi ile yüksek doğrulukta, hassasiyette ve spesifiklikte OCN tayini yapabilen, tekrar üretilebilirliği yüksek immünolojik esaslı bir OCN biyosensörü başarıyla geliştirilmiştir. Ayrıca yapay serum örneklerinde analiz başarısı da oldukça yüksektir.

Tezin ikinci bölümünde OPN tayini için bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu amaçla; katı altın elektrot yüzeyine SAM stratejisi kullanılarak 4-MPA molekülü immobilize edilmiştir. 4-MPA'nın tiyol ucu, altın ile kovalent-yarı kovalent bağ yaparak elektrodun altın yüzeyinde düzgün tabakalar elde edilmiştir. Tiyol gruplarıyla Au yüzeye bağlanmış 4-MPA'ların karboksil grupları EDC/NHS çözelti karışımı ile aktifleştirilmiş, ardından Anti-OPN antikoru eklenerek bu karboksil grupları ile proteinlerin amino uçları arasında kovalent bağlar oluşturularak OPN biyosensörünün tasarımı tamamlanmıştır. Altın elektrot yüzeyine Anti-OPN immobilizasyonunun tüm basamaklarının kontrolü ve OPN miktar tayinleri için tüm ölçümler EIS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CV analizleri ile de bu bağlanma teyit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde; tez kapsamında geliştirilen OPN biyosensörünün tasarımında kullanılan 4-MPA molekülünün SAM oluşturmak için ilk kez kullanıldığı belirlenmiştir. Osteoporoz tedavisinin takibi için geliştirilen bu impidimetrik OPN

biyosensörünün hazırlanmasında ilk kez kullanılan bu kimya stratejisi de bu çalışmaya özgünlük getirmektedir.

Literatürde OPN tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri incelendiğinde, OPN biyosensörlerinin kanser türlerinin teşhisinde kullanılmak üzere geliştirildiği ancak metabolik kemik hastalıklarını tespit ve izleme amaçlı biyosensör çalışmasına rastlanmadığı görülmektedir.

Hongxia Chen ve arkadaşları tarafından, altın elektrot yüzeyinde MUA/MCH (11-merkaptoundekanoik asit / 6-merkapto-1 hekzanol) karışık çözeltisiyle SAM tabaka oluşturulmuş, oluşturulan tek tabakalar üzerine dekstran amin-HA-7(sentetik peptit)-AntiOPN immobilize edilerek biyosensör tasarımı tamamlanmıştır (Chen vd., 2014). Ölçüm tekniği olarak EIS kullanılmıştır. Siklik voltammetri, atomik kuvvet mikroskobu ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi kullanılarak yüzey değişimleri incelenmiş ve karakterize edilmiştir.

Abhinav Sharma ve ark. prostat kanserinin tanı ve prognozu için potansiyel bir biyobelirteç olarak kabul edilen OPN için bir OPN immünosensörü tasarlamışlardır (Sharmaa, Hong, Singh & Jang, 2015). Bu amaçla; yüksek yoğunlukta tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT'ler) fotolitografi ve lift-off prosesi kullanılarak bir cam substrat üzerinde iki altın/indiyum kalay oksid elektrotu arasında biriktirilmiştir. SWCNT'lerin, karboksil gruplarını aktifleştirmek için EDC/NHS çözelti karışımı kullanılmıştır. OPN'ye özgü monoklonal antikorlar, karbon nanotüpler üzerinde kovalent olarak immobilize edilerek OPN analizi için biyosensör tasarımı tamamlanmıştır.

Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2015 yılında insan OPN'nin tayini için voltametrik RNA aptasensörü geliştirilmiştir (Şekil 2.14). Aşırı OPN ekspresyonunun meme kanserinin prognozu ve metastazı ile ilişkili olduğu kabulüyle OPN molekülü meme kanseri için potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilmektedir. Bu çalışmada; SAM stratejisi kullanılarak yüzeye 3-3-ditiyodipropiyonik asit (DPA) eklenerek 30 dakika inkübe edilmiş, SAM tabaka oluşturulduktan sonra sırasıyla EDC/NHS-Streptavidin-ETA(etanolamin)-RNA aptameri immobilize edilerek RNA aptasensörü tasarımı tamamlanmıştır (Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2015). Tasarlanan RNA

aptasensörünün her immobilizasyon aşamasında elektrot yüzeyinin elektrokimyasal davranışı, döngüsel voltametri ve kare dalga voltametrisi kullanılarak incelenmiştir.

Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2017 yılında, potansiyel bir meme kanseri belirteci olarak kabul edilen OPN tayini için bu kez DNA aptasensörü tasarlanmıştır (Meirinho, Dias, Peres, & Rodrigues, 2017). Bu aptamerin, OPN'ye karşı tatmin edici bir afinite gösterdiği elektrokimyasal kare dalga voltametrisi (SWV) ile analiz edilmiştir.

Bu tez kapsamında üretilen OPN biyosensörünün tayin ve tespit limit değerleri belirlendi ve literatürle karşılaştırıldı. Geliştirilen OPN biyosensörünün LOD değeri (Tespit limiti) 2.64 pg/µL, LOQ değeri (tayin limiti) 8.8 pg/µL olarak belirlendi. Bu biyosensörün 10-60 pg/µL tayin aralığında yüksek doğrulukta OPN tayini yapabildiği, tekrar üretilebilirliğinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Hongxia Chen ve arkadaşları tarafından geliştirilen OPN biyosensörünün tespit limiti ise 0.17 nM olarak hesaplanmıştır (Chen vd., 2014). Abhinav Sharma ve ark. prostat kanserinin tanı ve prognozunda kullanılmak üzere tasarlanan OPN immünosensörünün LOD değeri 0.3 pg/mL ve tayin aralığı 1 pg/mL-1 µg/mL'dir (Sharmaa, Hong, Singh & Jang, 2015). Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2015 yılında RNA aptameri olarak geliştirilen OPN biyosensörünün LOD değeri 7.9 nM, LOQ değeri 23.9 nM olarak bildirilmektedir (Meirinho, Dias, Peres & Rodrigues, 2015). Sofia G. Meirinho ve ark. tarafından 2017 yılında DNA aptasensörü olarak geliştirilen OPN biyosensörünün LOD değeri 150 ng/ml, LOQ değeri 448 ng/ml; tayin aralığı ise 25-100 nM'dır (Meirinho, Dias, Peres, & Rodrigues, 2017). Literatür verileri ile karşılaştırıldığında, geliştirilen OPN biyosensörünün hassasiyeti, ölçüm limiti ve tayin limitleri diğer biyosensörlerle rekabet edecek güçtedir, tekrarlanabilirliği gayet yüksektir. Yapay serum örneklerinde analiz başarısı da oldukça yüksektir.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında; osteoporoz hastalarının tedavi takibinde ve prognozunda kullanılmak üzere alternatif bir yöntem olarak osteokalsin ve osteopontin belirteçlerinin kantitatif tayinini yapabilecek iki farklı biyosensör geliştirilmiştir. Kan serumunda OCN ve OPN analizi yapmak üzere impidimetrik temelli biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi için yapılan bu çalışmada kullanılan kimyasal tasarım stratejileri biyosensör geliştirme literatürü açısından ilk olma özelliği

taşımaktadır. Bu nedenle her iki biyosensör çalışması bu yönüyle özgünlüğe sahiptir. Genel sonuçlar göz önüne alındığında, her iki kemik biyobelirtecinin kanda tayini için önerilen immobilizasyon yöntemleri sonraki çalışmalarla optimize edilebilir ve biyosensörler minyatürize edilerek mikroçip veya test çubuğu haline getirilebilir. Böylece, genel sağlık kuruluşları dışında osteoporoz taramaları yapmak için ve ayrıca evde, sağlık ocaklarında osteoporoz hastalarının hastalık takibi ile prognozu için kolaylıkla uygulanabilir. Bu yönüyle hem OCN hem de OPN biyosensörlerinin klinik uygulamalarda ümit verici bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir.

# KAYNAKÇA


Albright, F. & Reifenstein, E. C. (1950). The Parathyriod Glands and Metabolic Bone Diseas.*Ulster Medical Society*, *19*(1): 130-131.

Ardawi, M.-S. M., Akhbar, D. H., AlShaikh, A., Ahmed , M. M., Qari, M. H., Rouzi, A. A., Saeda , M. Y. (2013). Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone*, *56*(2):355-362.

Bain, C. D. & Whitesides, G. M. (1989). Formation of monolayers by coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain.*Journal of the American Chemical Society*, *111*(18):7164–7175.

Barton, A. C., Davis, F. & Higson, S. P. (2008). Labeless immunosensor assay for the stroke marker protein neuron specific enolase based upon an alternating current impedance protocol. *Analytical Chemistry*, *80*(24):9411–9416.

Bataille, R., Delmas, P. & Sany, J. (1987). Serum bone gla-protein in multiple myeloma. *Cancer*, *59*(2):329-34.

Brena, B., González-Pombo, P. & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, *1051*:15-31.

Burdo, T. H., Wood, M. R., & Fox , H. S. (2007). Osteopontin prevents monocyte recirculation and apoptosis. *Journal Leukocyte Biology*, *81*(6):1504–1511.

Chellaniah, M. A., Kizer, N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Hruska, K. A. (2003). Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1):173-189.

Chen, H., Mei, Q., Jia, S., Koh, K., Wang, K. & Liu, X. (2014). High specific detection of osteopontin using a three-dimensional copolymer layer support based on electrochemical impedance spectroscopy. *Analyst*, *139*(18):4476-4481.

Choi, S. T., Kim , J. H., Kang, E. -J., Lee, S. -W., Park, M. -C., Park, Y. -B. & Lee , S. -K. (2008). Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, *47*(12):1775–1779.

Colford, J., Sailer, D. & Langman, C. (1997). Five Osteocalcin Assay Compared: Tracer Specificity,Fragment İnterference and Calibration. *Clinical Chemistry*, *43*(7):1240.

Cosman, F., de Beur, S. J., LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S. & Lindsay , R. (2014). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis International*, *25*(10):2359-2381.

Denhardt, D. T. & Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.*, *7*(15):1475-1482.

Denhardt, D. T., Noda, M., O'Regan, A. W., Pavlin, D. & Berman, J. S. (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *The Journal Clinical Investigation*, 107(9):1055-1061.

Dodds, R. A., Connor, J. R., James, I. E., Rykaczewski, E. L., Appelbaum, E., Dul, E. & Gowen, M. (1995). Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *Journal of Bone Mineral Research*, *10*(11):1666-1680.

Edwards, M. H., Dennison, E. M., Aihie Sayer, A., Fielding , R. & Cooper, C. (2015). Osteoporosis and sarcopenia in older age. *Bone*, *80*:126-130.

Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği. (2017). Semih OTLES rehberi. 10.01.2019 tarihinde http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html adresinden erişildi

Favus, M. J. (1993). *Metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.*Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, 41-80.

Fisher , L. W. & Fedarko , N. S. (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective Tissue Research, 44*(1):33–40.

Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F. & Fedarko, N. S. (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 280*(2):460-465.

Fohr, B., Dunstan, C. R. & Seibel, M. J. (2003). Markers of Bone Remodeling in Metastatic Bone Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88*:5059–5075.

Forton, A. C., Petri, M. A., Goldman, D. & Sullivan, K. E. (2002). An Osteopontin (SPP1) Polymorphism is Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *Human Mutation, 19*(4):459-462.

Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Chapuy, M.-C. & Delmas, P. D. (1996). Increase bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research, 11*(3):337-349.

Guisán, J. M. (2006). *İmmobilization of Enzymes and Cells.* New Jersey: Methods in Biotechnology.

Gundberg, C. M., Lian, J. B., Gallop, P. M. & Steinberg, J. J. (1983). Urinary γ-Carboxyglutamic Acid and Serum Osteocalcin as Bone Markers: Studies in Osteoporosis and Paget's Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 57*(6):1221-1225.

Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S. & del Valle, M. (2005). Determination of Phenolic Compounds by A Polyphenol Oxidase Amperometric Biosensor and Artificial Neural Network Analysis. *Biosensors and Bioelectronics, 20*(8):1668-1673.

Hannon, R. A. & Eastell, R. (2006). Bone markers and current laboratory assays. *Cancer Treatment Reviews, 32*:7-14.

Hart, S. M. & Eastell, R. (1999). Biochemical markers of bone turnover. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 421-427.

Harvard Üniversitesi, Fizik Bölümü. (2019). Chinmay Belthangady Rehberi. 28.02.2019 tarihinde https://nanohub.org/resources/20560/watch?resid=23859 adresinden erişildi

Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E. & Gundberg, C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews*, *69*(3):990–1047.

Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A. J. & Yang, D. S. (2003). Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, *425*:977–980.

Hunter, G. K. (2013). Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcified Tissue International*, *93*(4):348–354.

Instrumentation and Electroanalytical Chemistry (2003). *Encyclopedia of Electrochemistry* içinde (Cilt. 3, s. 679). United States: Encyclopedia of Electrochemistry.

Jagtap, V. R., Ganu, J. V. & Nagane , N. S. (2011). BMD and serum intact osteocalcin in postmenopausal osteoporosis women. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *26*(1):70–73.

Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Bazer, F. W. & Spencer, T. E. (2003). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biology of Reproduction*, *69*(5):1458–1471.

Kazanecki, C. C., Uzwiak, D. J. & Denhardt , D. T. (2007). Control of osteopontin signaling and function by post-translational phsphorylation and protein folding. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(4):912–924.

Khashayar, P., Aghaei Meybodi, H. R., Homami, M. R., Heshmat, R. & Larijani , B. (2010). The prevalence of osteoporosis in an iranian population. *Journal of Clinical Densitometry*, *13*(1):112. https://doi.org/10.1016/j.jocd.2010.01.022

Khashayar, P., Amoabediny, G., Hosseini, M., Verplancke, R., Razi, F. & Vanfleteren, J. (2017a). An Electrochemical Biosensor Based on AuNP-Modified Gold Electrodes for Selective Determination of Serum Levels of Osteocalcin. *IEEE Sensors Journal*, *17*(11)3367-3374.

Khashayar, P., Amoabediny, G., Larijani, B., Hosseini , M. & Vanfleteren, J. (2017b). Fabrication and Verification of Conjugated AuNP-Antibody Nanoprobe for Sensitivity Improvement in Electrochemical Biosensors. *Scientific Reports*, *7*:2045-2322.

Kemik erimesi, Özel Ortopedia Hastanesi. 28 Şubat 2019 http://www.ortopedia.com.tr/kemik-erimesi.html adresinden erişildi

Killinger, Z., Kužma, M., Sterančáková, L. & Payer, J. (2012). Osteoarticular Changes in Acromegaly. *International Journal of Endocrinology*, *2012*:1-7. doi:10.1155/2012/839282

Kläning, E., Christensen, B., Sørensen, E. S., Vorup-Jensen, T. & Jensen, J. K. (2014). Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status. *Bone*, *66*:90-95.

Kokabu, S., Lowery, J. W. & Jimi, E. (2016). Cell fate and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*, *2016*:1-7. Doi: 10.1155/2016/3753581.

Lee, M. S., Kim, S. Y., Lee, M. C., Cho, B. Y., Lee, H. K., Koh, C.-S. & Mın, H. K. (1990). Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinol*, *70*(3):766-770.

Lee, M.-H., Kim , H. Y., Seo , Y. T. & Lee, K. N. (2014). Simple, fast, and quantitative detection of affinity reaction of osteocalcin using amperometric method, *2014 International Conference on Information Science, Electronics and Electrical Engineering*, 772-775. DOI: 10.1109/InfoSEEE.2014.6947771

Li, Y., 2006. Section 2.3 Biosensors, 52-93pp, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology, (Çev. P. Demircioğlu ve İ. Böğrekci), Erişim adresi http://www.tarmakbir.org/haberler/Kitap/5_2.3%20Biyosens%C3%B6rler.pdf Erişim: Şubat 2019.

Lindemann, P. (t.y). Self assembled monolayers (SAMs). 18.09.2018 tarihinde https://www.ifg.kit.edu/english/1165.php adresinden erişildi

Lombardi, G., Perego, S., Luzi, L. & Banfi, G. (2015). A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. *Endocrine*, *48*(2):394–404.

Lucarelli, F., Marrazz, G., Turner, A. P. & Mascini, M. (2004). Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosensors and Bioelectronics, 19*(6):515–530.

Lund, S. A., Giachelli, C. M. & Scatena, M. (2009). The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of Cell Communication and Signaling, 3*(3-4):311–322.

Luting, L. & Thomas, J. (2016). In situ sensor advancements for osteoporosis prevention, diagnosis, and treatment. *Current Osteoporosis Reports, 14*(6):386-395.

MacLeod, J. M., McHardy, K. C., Harvey, R. D., Duncan , A., Reid, I. W., Bewsher, P. D. & Robins , S. P. (1993). The early effects of radioiodine therapy for hyperthyroidism on biochemical indices of bone turnover. *Clinical Endocrinology, 38*(1):49-53.

Macrì, A., Versaci, A., Lupo, G., Trimarchi, G., Tomasello, C., Loddo, S., Famulari, C. (2009). Role of osteopontin in breast cancer patients. *Tumori Journal*, *95*(1):48–52. https://doi.org/10.1177/030089160909500109

Mancini, T., Doga, M., Mazziotti , G. & Giustina, A. (2004). Cushing's Syndrome and Bone. *Pituitary, 7*(4):249–252.

Matsui, Y., Rittling , S. R., Okamoto, H., Inobe, M., Jia, N., Shimizu, T., Uede, T. (2003). Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 23*(6):1029-1034.

Meirinho, S. G., Dias, L. G., Peres, A. M. & Rodrigues , L. R. (2017). Electrochemical aptasensor for human osteopontin detection using a DNA aptamer selected by

SELEX. *Analytica Chimica Acta*, *987*:25-37, https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.071

Meirinho, S. G., Dias, L. G., Peres, A. M. & Rodrigues, L. R. (2015). Development of an electrochemical RNA-aptasensor to detect human osteopontin. *Biosensors and Bioelectronics*, *71*:332-341. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.050

Mirsky, V. M., Riepl, M. & Wolfbeis, O. S. (1997). Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen–antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes. *Biosens Bioelectron*, *12*(9-10):977-989.

Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T. & Hirata, M. (2017). Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochemical Pharmacology*, *132*:1-8. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.001

Nguyen, V. H., Kaulen, C., Simon, U. & Schnakenberg, U. (2017). Single Interdigital Transducer Approach for Gravimetrical SAW Sensor Applications in Liquid Environments. *Sensors*, *17*(12): 2931 https://doi.org/10.3390/s17122931

Niino, M., Kikuchi, S., Fukazawa, T., Yabe, I. & Tashiro , K. (2003). Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *Journal of Neuroimmunology*, *136*(1-2):125-129.

Nimptsch, K., Hailer, S., Rohrmann, S., Gedrich, K., Wolfram, G. & LinsEISen, J. (2007). Determinants and correlates of serum undercarboxylated osteocalcin. *Annals of Nutrition Metabolism*, *51*(6): 563–570.

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.

Odén, A., McCloskey, E. V., Kanis, J. A., Harvey, N. C. & Johansson, H. (2015). Burden of high fracture probability worldwide: secular increases 2010–2040. *Osteoporosis International*, *26*(9):2243-2248.

Okano, H., Mizunuma, H., Soda, M., Kagami, I., Miyamoto, S., Ohsawa, M., Shibata, H. (1998). The long-term effect of menopause on postmenopausal bone loss in Japanese women: results from a prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(2):303-309.

O'Regan, A. W., Nau, G. J., Chupp, G. L. & Berman , J. S. (2000). Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunology Today*, *21*(10):475-478.

Osteopontin. (t.y). Wikipedia, Osteopontin içinde. 28 Kasım 2018 tarihinde http://www.wikizero.biz/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvT3N0ZW9wb250aW4 adresinden erişildi.

Pagani, F., Francucci, C. M. & Moro, L. (2005). Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *Journal of Endocrinological Investigation, 28*:8-13.

Parfitt, A. (1983). The physological and clinical significance of bone histomorphometric data. *CRC Press*, 143-223.

Power, M. J. & Fottrell, P. F. (1991). Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. *Journal Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *28*(4):287–335.

Raggatt, L. J. & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry, 285*:25103-25108.

Raisz, L. G. (2005). Screening for osteoporosis. *The New England Journal of Medicine, 353*:164-171. DOI: 10.1056/NEJMcp042092

Rangaswami, H., Bulbule, A. & Kundu , G. C. (2006). Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends in Cell Biology*, *16*(2):79-87.

Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A. & Heinegård, D. (1990). Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87*(12): 4473–4475.

Rinaldo , F. S., Silva Sasso, G. R., Cerri, E. S., Simões, M. J. & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function,and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International, 2015:*1-17, http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746.

Rittling, S. R. & Chambers, A. F. (2004). Role of osteopontin in tumour. *British Journal of Cancer*, *90*:1877–1881.

Rizzoli, R., Poser, J. & Bargi, U. (1986). Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism*, *35*:71-74.

Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., Schmitt , F. L., Paulsson, M. & Lindmark-Mänsson, H. (2007). The Role of Osteopontin in Tumor Progression and Metastasis in Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *16*(6):1087-1097.

Rubin , M. R. (2015). Bone Cells and Bone Turnover in Diabetes Mellitus. *Current Osteoporosis Reports*, *13*(3):186–191.

Scott, A. M., Wolchok , J. D. & Old, L. J. (2012). Antibody Therapy of Cancer. *Nature Reviews Cancer*, *12*:278-287.

Seibel, M. J. (2005). Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clinical Biochemist Reviews*, *26*(4):97-122.

Senger, D. R., Wirth, D. F. & Hynes, R. O. (1979). Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*, *16*(4):885-893.

Sezgintürk, M. K. (2012). *Biyosensörlerde İmpedans Uygulamaları*. (II. Lisansüstü Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu). Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Çanakkale

Sharifi, M., Robatjazi, S. M., Sadri, M. & Mosaabadi, J. M. (2019). Immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme by covalent attachment on modified cellulose microfibers using different chemical activation strategies: Characterization and stability studies. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *27*(1):191-199.

Sharmaa, A., Hong, S., Singh, R. & Jang, J. (2015). Single-walled carbon nanotube based transparent immunosensor for detection of a prostate cancer biomarker osteopontin. *Analytica Chimica Acta*, *869*: 68-73. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.010

Siddiqi, A., Burrin, J. M., Nooan, K., James, I., Wood, D. F. & Price, C. P. (1997). A longitudinal study of markers of bone turnover in Graves' disease and their

value in predicting bone mineral density. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *82*(3):753-759.

Singh, R. P., Patarca, R., Schwartz, J., Singh, P. & Cantor , H. (1990). Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, *171*(6):1931-1942.

Sivakumar, S. & Devaraj, S. N. (2014). Tertiary structure prediction and identification of druggable pocket in the cancer biomarker – Osteopontin-c. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, *13*:1-13.

Sodek, J., Ganss, B. & McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology&Medicine*, *11*:279–303, https://doi.org/10.1177/10454411000110030101

Tao, L., Huo, Z., Ding, Y., Li, Y., Dai, S., Wang, L., Grätzel, M. (2015). High-efficiency and stable quasi-solid-state dye-sensitized solar cell based on low molecular mass organogelator electrolyte. *Journal of Materials Chemistry A*, *3*(5):2344.

Telefoncu, A. (1999). *Biyosensörler*. (Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu). Ege Üniversitesi/ Fen Fakültesi, İzmir

Tresguerres Hernández-Gil, I. F., Alobera Gracia, M. A., Pingarrón, M. C. & Jerez, L. B. (2006). Physiological Bases of Bone Regeneration. *Histology and Physiology of bone tissue*, *11*(1):7-51.

Tsekenis, G., Garifallou, G.-Z., Davis, F., Millner, P. A., Pinacho, D. G., Sanchez-Baeza, F., Higson, S. P. (2008). Detection of Fluoroquinolone Antibiotics in Milk via a Labeless Immunoassay Based upon an Alternating Current Impedance Protocol. *Analytical Chemistry*, *80*(23):9233-9239.

Tunçay, Ö. E. (2013). *Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması.* Hacettepe Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Tüzün, S., Eskiyurt, N., Akarırmak, U., Sarıdoğan, M. & Senocak, H. (2012). Incidence of hip fractue and prevalance of osteoporosis in Turkey: the FRACTURK study. *Osteoporosis International*, *23*(3):949-955.

Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Journal of Science*, *6*(2): 71-80.

Uchoa, L. C., Carneiro , J. & Kelley , R. (1995). Junqueira içinde, *Basic Histology (8th edition)* (s. 132-151). Stanford: Appleton & Lange Paperback.

Uyar İ., Güven Ö., Artıktay I. (2018) Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı 26 Aralık 2018 tarihinde http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok10.pdf adresi erişildi.

Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A. J., Garnero, P., Griesmacher, A., Kanis, J. A. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International*, *22*(2):391-420.

Wang, K. X. & Denhardt , D. T. (2008). Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *19*(5-6): 333–345.

Weber, G. F., Zawaideh, S., Hikita, S., Kumar, V. A., Cantor, H. & Ashkar , S. (2002). Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *Journal of Leukocyte Biology*, *72*:752-761.

Wesson, J. A., Johnson, R. J., Mazzali, M., Beshensky, A. M., Stietz , S., Giachelli, C., Hughes , J. (2003). Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology* , *14*(1):139-147.

Yılmaz, K. C. (2014). Koroner Stent Uygulanmış Hastalarda Plazma Osteopontin Düzeylerinin Stent Restenozunu Öngördürücü Gücünün Değerlendirilmesi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Zhao, J., Dong, L., Lu, B., Wu, G., Xu, D., Chen, J., Guo, Y. (2008). Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. *Gastroenterology*, *135*(3):956-968.

Zia, A. I. & Mukhopadhyay , S. C. (2016). Impedance Spectroscopy and Experimental Setup. *Electrochemical Sensing: Carcinogens in Beverages*, *20*:21-37.

# ÖZGEÇMİŞ

**Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı : Sevilay İNAL KABALA

Doğum Yeri ve Tarihi : Antakya / 08.10.1988

**Eğitim Durumu**

| Derece | Alan | Üniversite | Yıl |
|---|---|---|---|
| Lisans | Kimya | Atatürk Üniversitesi | 2010 |
| Lisans | Kimya Mühendisliği | Atatürk Üniversitesi | 2011 |
| Yüksek Lisans | Kimya-Biyokimya | Atatürk Üniversitesi | 2013 |
| Yüksek Lisans | Temel işlemler ve Termodinamik | Atatürk Üniversitesi | Devam ediyor |
| Doktora | Kimya-Biyokimya | Trakya Üniversitesi | 2019 |

**İş Deneyimi**

Çalıştığı Kurumlar : Kırklareli Üniversitesi SHMYO

**İletişim**

Adres : Kırklareli Üniversitesi, SHMYO, Tıbbi Laboratuvar Programı, Kavaklı Yerleşkesi

E-Posta Adresi : sevilay.inal@klu.edu.tr

**Akademik Çalışmaları**

1. İnal, S.; Kalin, R.; Ozdemir, N.; Ozdemir, H. Purification and characterization of red beet (beta vulgaris) peroxidase, **2015**, *Biochemistry&Molecular Biology Letters*, *1*(1), 37-49.
2. Isbılır, S.S.; Inal Kabala, S.; Yagar, H. Assessment of in vitro Antioxidant and Antidiabetic Capacities of Medlar (Mespilus germanica), **2019**, *Not Bot Horti Agrobo*, *47*(2):384-389.
3. Inal Kabala, S.; Yagar, H.; Ozcan, H.M. A new biosensor for osteoporosis detection, **2019**, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 1532-2297.

**Yabancı Dil Bilgisi**

İngilizce, Arapça

Tarih: 18/04/2019

Bu tez kapsamında geliştirilen OCN Biyosensörü ile ilgili veriler, 19.03.2019 tarihinde SCI kapsamında taranan uluslararası hakemli dergide bir adet araştırma makalesi olarak yayınlanmıştır.

**Makale başlığı:** A New Biosensor for Osteoporosis Detection

**Yazarlar:** Sevilay Inal Kabala, Hulya Yagar & Hakkı Mevlut Ozcan

**Yayınlanan derginin adı:** Preparative Biochemistry and Biotechnology

**DOI:** 10.1080/10826068.2019.1587628

**ISSN:** 1082-6068