



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMÜHENDİSLİK VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ  
ANABİLİM DALI**

**AKUT BÖBREK HASARININ POTANSİYEL  
BİYOMARKERLARINDAN KIM-1 TAYİNİ İÇİN  
ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR SİSTEMİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞEYMA ŞENTÜRK**

**Tez Danışmanı**

**PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**AKUT BÖBREK HASARININ POTANSİYEL BİYOMARKERLARINDAN  
KIM-1 TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR SİSTEMİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMA ŞENTÜRK

Tez Danışmanı

PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyonu Birimi kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2021-3807

ÇANAKKALE – 2023

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Şeyma ŞENTÜRK

05/04/2023

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e, öğrenme sürecimde tüm sabrıyla ve bilgi birikimleriyle bana destek olan hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN, Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN, Dr. Öğr. Üyesi Canan ÖZYURT, Nur TARIMERİ'ye, çalışma süresince tecrübelerini her zaman benimle paylaşarak yardımcı olan hocam Arş. Gör. İnci ULUDAĞ ve ekip arkadaşım Bahar İNCE'ye, bilimin ışığında her zaman omuz omuza birlikte yürüdüğümüz ekip arkadaşlarım Berfin VURAL, Büşra Nur BAYGIN, Ecem UZMAN, Meltem ÇALIŞKAN ve Mehmet KAVACIK'a, hayatımın her evresinde bana maddi ve manevi destek olan canım babam Serdar ŞENTÜRK'e, canım annem Nurten ŞENTÜRK'e, canım abim Şükrü ŞENTÜRK'e, lisans ve yüksek lisans sürecim boyunca her zaman arkamda olduğunu ve olmaya devam edeceğini bildiğim sevgili arkadaşım Mahir ÖZKAN'a ve her birini tanıdığım günden beri moral ve motivasyon kaynağım olan değerli dostlarım Bensu YILMAZ, Erva GÖRGÜLÜ, Görkem GÜL, Sinem ERGİN, Sena AYDEMİR, Buse AKSU, Kazım YARIM, İbrahim Hasan POYRAZ, Süleyman Ali YÜCE, Vasıf KARACAN ve Merve İLKİNER'e sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Şeyma ŞENTÜRK

Çanakkale, Nisan 2023

## ÖZET

# AKUT BÖBREK HASARININ POTANSİYEL BİYOMARKERLARINDAN KIM-1 TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Şeyma ŞENTÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

05/04/2023, 50

Böbrek Hasarı Molekülü-1 (KIM-1), bir tip I transmembran glikoproteinidir ve akut böbrek hasarı durumunda idrarda seviyesinin değişkenlik gösterdiği için böbrek hasarını saptamak adına potansiyel bir biyomarkerdir. Tez kapsamında, KIM-1 biyomarkerının tayinine yönelik elektrokimyasal bir immünosensör tasarlanmıştır. Geliştirilen biyosensör sistemi için çalışma elektrodu olarak Quartz Tuning Fork (QTF) kullanılmıştır. Altın uçlu QTF elektrodu yüzeyi, SAM tabakası oluşturmak için 11-Merkaptoundekanoik asit (11-MUA) ile modifiye edilmiştir. Biyosensör için, tasarımında kullanılan parametreleri üzerinde detaylı optimizasyon çalışmaları, ardından karakterizasyon çalışmaları ve gerçek idrarda uygulanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) yöntemleri ile analiz edilmiştir. Geliştirilen immünosensörün elektrot yüzeyindeki morfolojik değişimleri incelemek için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazlarında görüntüler alınmıştır. Geliştirilen biyosensör sistemi, geniş bir tayin aralığını (0,05-250 fg/mL) algılamak için yüksek kapasiteye sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** KIM-1, QTF elektrot, 11-MUA, İmmünosensör.

## ABSTRACT

# DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR SYSTEM FOR THE DETECTION OF KIM-1, A POTENTIAL BIOMARKER OF ACUTE KIDNEY INJURY

Şeyma ŞENTÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Engineering

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

04/05/2023, 50

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) is a type I transmembrane glycoprotein and is a potential biomarker for detecting kidney injury as its level in the urine varies in acute kidney injury. Within the scope of the thesis, an electrochemical immunosensor was designed for the determination of the KIM-1 biomarker. Quartz Tuning Fork (QTF) was used as the working electrode for the developed biosensor system. The gold-tipped QTF electrode surface was modified with 11-Mercaptoundecanoic acid (11-MUA) to form the SAM layer. For the biosensor, detailed optimization studies were carried out on the parameters used in its design, followed by characterization studies and applicability studies in real urine. These studies were analyzed by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) methods. Images were taken in Atomic Force Microscope (AFM) and Scanning Electron Microscope (SEM) devices to examine the morphological changes on the electrode surface of the developed immunosensor. The developed biosensor system has a high capacity to detect a wide detection range (0.05-250 fg/mL).

**Keywords:** KIM-1, QTF electrode, 11-MUA, Immunosensor.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ETİK BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
<b>BİRİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>GİRİŞ</b>	
	1
1.1. Biyosensörler.....	2
1.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler.....	3
1.1.2. Quartz Tuning Fork (QTF) Çalışma Elektrodu.....	4
1.2. KIM-1 Analizi için Biyoalgılama Sisteminin Geliştirilmesi.....	5
<b>İKİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b>	
	8
<b>ÜÇÜNCÜ BÖLÜM</b>	
<b>MATERYAL YÖNTEM</b>	
	10
3.1. Kimyasallar ve Aparatlar .....	10
3.2. Elektrokimyasal Ölçümler .....	10
3.3. KIM-1 Biyosensörünün İmmobilizasyon Aşaması .....	11
3.4. KIM-1 Biyosensörünün Optimizasyon Aşamaları .....	12
3.4.1. 11-MUA Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışması .....	12
3.4.2. EDC-NHS İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışması .....	13
3.4.3. Anti-KIM1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışması .....	13



3.4.4. Anti-KIM1 İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışması .....	13
3.4.5. KIM-1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışması .....	14
3.4.6. KIM-1 İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışması .....	14
3.5. KIM-1 Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamaları .....	14
3.5.1. Kalibrasyon Grafiği .....	14
3.5.2. Tekrarlanabilirlik .....	14
3.5.3. Tekrar Üretilbilirlik .....	15
3.5.4. Sabit Frekansta Empedans (SFI) Ölçümü .....	15
3.5.5. Rejenerasyon .....	15
3.5.6. Seçicilik .....	16
3.5.7. Depo Ömrü .....	16
3.6. KIM-1 Biyosensörünün Gerçek İdrar Örneklerine Uygulanabilirliği .....	16

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. KIM-1 Biyosensörünün İmmobilizasyon Aşamasına Ait Bulgular .....	17
4.2. KIM-1 Biyosensörünün Optimizasyon Aşamalarına Ait Bulgular .....	19
4.2.1. 11-MUA Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular .....	19
4.2.2. EDC-NHS Süre Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular .....	21
4.2.3. Anti-KIM1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular .....	22
4.2.4. Anti-KIM1 İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular ..	24
4.2.5. KIM-1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular .....	25
4.2.6. KIM-1 İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular .....	26
4.3. KIM-1 Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamalarına Ait Bulgular .....	28
4.3.1. Kalibrasyon Grafiği Çalışmasına Ait Bulgular .....	28
4.3.2. Ayrışma Sabiti (Kd) Hesaplamasına Ait Bulgular.....	30
4.3.3. Tekrarlanabilirlik Çalışmasına Ait Bulgular .....	31
4.3.4. Tekrar Üretilbilirlik Çalışmasına Ait Bulgular .....	32
4.3.5. Sabit Frekansta Empedans (SFI) Ölçümü Çalışmasına Ait Bulgular .....	34
4.3.6. Rejenerasyon Çalışmasına Ait Bulgular .....	35
4.3.7. Seçicilik Çalışmasına Ait Bulgular .....	36
4.3.8. Depo Ömrü Çalışmasına Ait Bulgular .....	37
4.3.9. KIM-1 Biyosensörünün Kramers-Kronig Sonuçlarına Ait Bulgular .....	38

4.3.10. KIM-1 Biyosensörünün Gerçek İdrar Örneklerine Uygulanabilirliği Çalışmasına Ait Bulgular .....	39
4.3.11. KIM-1 Biyosensörünün Yüzey Morfolojisinin AFM ve SEM Cihazları ile Görüntülenmesine Ait Bulgular .....	40
BEŞİNCİ BÖLÜM	
SONUÇ ve ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA .....	47



## SİMGELER VE KISALTMALAR

KIM-1	Böbrek Hasarı Molekülü-1
QTF	Quartz Tuning Fork
11-MUA	11-Merkaptoundekanoik Asit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Tahlili
ISFET	İyon Duyarlı Alan Etkili Transistör
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
Rs	Omik Direnç
Rct	Yük Transfer Direnci
Z <sub>w</sub>	Warburg Empedansı
ABH	Akut Böbrek Hasarı
Au	Altın
SCr	Serum Kreatinin
BUN	Kan Üre Nitrojeni
NAG	N-asetil- $\beta$ -D-glukozaminidaz
ECL	Elektrokemilüminesans
fg	Femtogram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
AuNP	Altın Nanopartikül
GCE	Camsı Karbon Elektrot
PdPtBP	Alaşım
MNP	Mezogözenekli Nanoparçacık
NW	Nanotel
COFs	Kovalent Organik Çerçevesel
LOD	Saptama Limiti
BNS	Çift Katmanlı Nanotabakalar
POC	Bakım Noktası Cihazı
M $\Omega$	Megaohm
Cm	Santimetre
mM	Milimolar

PBS	Fosfat Tampon Salin
V	Volt
Hz	Hertz
pg	Pikogram
BSA	Sığır Serum Albumini
CV	Döngüsel Voltametri
SAM	Kendi Kendine Birleşen Tek Tabaka
$\mu$ M	Mikromolar
EDC	N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
LOQ	Ölçüm Limiti
Kd	Ayrışma Sabiti
h	Hill Katsayısı
RSD	Bağıl Standart Sapma
SFI	Sabit Frekansta Empedans
PSA	Prostat Spesifik Antijeni
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	11-MUA konsantrasyon optimizasyonuna ait $R^2$ ve denklemler	21
<b>Tablo 2</b>	EDC-NHS inkübasyon süresi optimizasyonuna ait $R^2$ ve denklemler	22
<b>Tablo 3</b>	Anti-KIM1 konsantrasyon optimizasyonuna ait $R^2$ ve denklemler	23
<b>Tablo 4</b>	Anti-KIM1 inkübasyon süresi optimizasyonuna ait $R^2$ ve denklemler	25
<b>Tablo 5</b>	KIM-1 konsantrasyon optimizasyonu çalışmasına ait $R^2$ ve denklemler	26
<b>Tablo 6</b>	KIM-1 inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmasına ait $R^2$ değerleri ve denklemler	27
<b>Tablo 7</b>	KIM-1 immünosensörünün optimizasyon çalışmasına ait değerler	28
<b>Tablo 8</b>	KIM-1 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait $R^2$ değerleri, denklemler ve tayin aralıkları	34
<b>Tablo 9</b>	KIM-1 biyosensörünün gerçek idrar örneklerine uygulanabilirliği çalışmasına ait bulgular	40

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	QTF elektrodu	5
Şekil 2	KIM-1 immünosensörünün immobilizasyon aşamaları	12
Şekil 3	KIM-1 biyosensörünün immobilizasyon aşamalarının EIS grafikleri	18
Şekil 4	KIM-1 biyosensörünün immobilizasyon aşamalarının CV voltamogramları	19
Şekil 5	11-MUA konsantrasyon optimizasyonuna ait grafik	20
Şekil 6	EDC-NHS inkübasyon süresi optimizasyonuna ait grafik	22
Şekil 7	Anti-KIM1 konsantrasyon optimizasyonuna ait grafik	23
Şekil 8	Anti-KIM1 inkübasyon süresi optimizasyonuna ait grafik	24
Şekil 9	KIM-1 konsantrasyon optimizasyonu çalışmasına ait grafik	25
Şekil 10	KIM-1 inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmasına ait grafik	27
Şekil 11	KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiği	29
Şekil 12	KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiğine ait EIS grafikleri	29
Şekil 13	KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiğine ait CV voltamogramları	30
Şekil 14	KIM-1 immünosensörünün bağlanma eğrisi	31
Şekil 15	KIM-1 biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmasına ait grafik	32
Şekil 16	KIM-1 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait grafik	33
Şekil 17	KIM-1 biyosensörünün SFI çalışmasına ait empedans grafiği	35
Şekil 18	KIM-1 biyosensörünün rejenerasyon çalışmasına ait grafik	36
Şekil 19	KIM-1 biyosensörünün seçicilik çalışmasına ait grafik	37
Şekil 20	KIM-1 biyosensörünün depo ömrü çalışmasına ait grafik	38
Şekil 21	KIM-1 biyosensörünün Kramers-Kronig dönüşümüne ait grafik	39

**Şekil 22** Bare elektrodun AFM görüntüleri (A-B), 11-MUA immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (C-D), EDC-NHS immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (E-F), Anti-KIM1 antikoru immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (G-H), BSA immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (I-J), KIM-1 antijeni immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (K-L) 42

**Şekil 23** Bare elektrodun SEM görüntüleri (A), 11-MUA immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (B), EDC-NHS immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (C), Anti-KIM1 antikoru immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (D), BSA immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (E), KIM-1 antijeni immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (F) 44



# BİRİNCİ BÖLÜM

## GİRİŞ

Böbrek hastalıkları, varlığını 1500'lü yıllar kadar çok eski zamanlarda gösterse de (Weiss ve Kim, 2012) günümüzde de hâlen devam etmekte olup dünya çapında yaygınlaşmış ve sıklıkla görülen bir toplum sağlığı sorunudur. Aynı zamanda uzun yıllardır varlığını göstermesine rağmen birçok böbrek hastalığının tanısı ve tedavisinin zorluğu hâlen devam etmektedir. Günümüzde de devam eden bu hastalıklarda ölüm oranları giderek artış göstermektedir.

Böbreğin atılım, hormon üretimi, kan basıncı düzenlemesi, iyonik, ozmotik ve pH dengesi sağlama gibi birçok görevi bulunur ve bunların tümü böbreği fizyolojik homeostaz için gerekli kılar. Birçok görevi olması sebebiyle, böbrek hastalıklarının sıklıkla sistemik sonuçları bulunur ve bu da böbrek hastalıklarının teşhis ve tedavisinde zorluk ve yüksek maliyeti beraberinde getirir (Abbiss, vd., 2019).

Akut Böbrek Hasarı (ABH) teşhisi için bir biyobelirteç olan KIM-1, bir tip I hücre zarı glikoproteinidir ve idrarda bulunması nedeniyle böbrek hasarı için oldukça spesifiktir (Vaidya, vd., 2010).

Böbrek biyobelirteçlerini tespit etmek için enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA) (Vaidya, vd., 2010), kolorimetrik Jaffe reaksiyonu (Tesch ve Greg, 2010), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Kumar ve Banerjee, 2017) gibi karmaşık yöntemler kullanılmaktadır. Bu nispeten geleneksel tanı yöntemleri karmaşık olmakla birlikte zaman alıcı, zahmetli, uzman gerektiren ve pahalı sistemler olabilmektedir. Bu durumda zaman, kullanım pratikliği ve maliyet gibi nedenler açısından daha avantajlı sistemler kullanılmak istenmektedir. Biyosensörler, bu avantajlara sahip alternatifler sunan algılama cihazlarıdır.

Son dönemlerde artan hastalıklar, canlı sağlığını tehdit eden maddelerin artışı ve bunların sebep olduğu yıkıcı sonuçlar, erken teşhisin hayati önem taşıdığını kritik seviyede



göstermektedir. Bu sebeple tanı ve teşhis yöntemlerine ihtiyaç da giderek artmaktadır. Teşhis için alternatif bir yöntem olan biyosensörler de biyolojik süreçlerin takibi ve bu süreçlerin anlaşılmasını sağlar.

Klinik, kimyasal, farmasötik, gıda, tarım ve çevresel çalışmalar için ekonomik, kullanımı kolay ve hızlı yanıt alınabilen araçlar olan biyosensörler bu alanlardaki araştırmaları aydınlatır. Kısmen karmaşık örneklerde kullanım kolaylığı, ucuzluğu, taşınabilirliği ve çalışma hızı sayesinde, biyosensörler gelişmiş biyoalgılama sistemlerine alternatif bir bakış açısı sunar (Jin, vd., 2014).

## **1.1. Biyosensörler**

Bir biyosensör, birbiriyle yakından ilişkili iki öge olan analiti tanıyan immobilize edilmiş hassas bir biyolojik eleman ve analit ile biyoreseptör etkileşiminden kaynaklanan biyolojik veya kimyasal sinyali elektronik bir sinyale çevirmek için kullanılan bir dönüştürücüden oluşan bir sistemdir (Sassolas, vd., 2012).

Klinik alanda kullanılan biyosensörlerde biyobileşen olarak enzim, hormon, antikor, nükleik asit, lektin, hücre yapısı veya doku gibi çeşitli seçenekler kullanılabilir (Bahadır ve Sezgintürk, 2015). Biyobileşenler duyarlı olduğu analite karşı spesifiklik gösterir, diğer analitleri tanımayıp yanıt vermemesiyle biyosensörleri seçici kılar.

Kullanılan dönüştürücüye bağlı olarak biyosensörler birçok çeşide ayrılabilir. Bunlar optik biyosensörler, akustik biyosensörler, rezonans biyosensörleri, termal biyosensörler, iyon duyarlı alan etkili transistör (ISFET) biyosensörler ve elektrokimyasal biyosensörler gibi birçok tipte olabilir (Mohanty ve Kougiyanos, 2006; Tüylek, 2021). Çeşitli türleri olan biyosensörler, hastalıkların erken teşhisi için umut vadeden gelişmeler sunar.

### 1.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Bir elektrokimyasal biyosensör, elektrokimyasal bir dönüştürücüye sahip olan biyosensördür. Elektrokimyasal biyosensörlerdeki temel prensip, hareketsiz biyomolekül ile hedef analit içeren kimyasal reaksiyonun üretim-tüketim yapan iyonlar veya elektronlar arasındaki etkileşim ile elektrik akımı veya potansiyeli gibi ölçülebilir bir parametre olarak elektriksel sinyal sağlamasıdır (Monošik, vd., 2012).

Genel olarak elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanıma süreçlerinin spesifikliği, seçiciliği, düşük arka plan gürültüsü ve daha iyi sinyal-gürültü oranları gibi avantajlar sunar. Ayrıca bu yöntemle ölçümler çok küçük numune hacimlerine ihtiyaç duyar. Elektrokimyasal algılama sistemleri basit, taşınabilir, hızlı yanıt, düşük maliyeti, yapım ve kullanım kolaylığı nedenleriyle biyosensörlerin iletimi için yaygın olarak seçilmektedir. Aynı zamanda diğer çeşitlerine kıyasla en eski, en gelişmiş ve en yaygın biyosensörlerdir (Keskin ve Arslan, 2020). Elektrokimyasal immüno-sensörler kullanılarak hedef proteinlerin hassas ve hızlı olarak belirlenmesi klinik tanıda önemli bir rol oynamaktadır (Törer, vd., 2018).

Tipik olarak (biyo-)elektrokimyada ölçüm şekilleri, incelenen reaksiyon ölçülebilir bir akım oluşturuyorsa amperometrik, ölçülebilir bir potansiyel ya da yük birikimi oluşturuyorsa potansiyometrik, elektrotlar arasında bir ortamın iletken özelliklerini ölçülebilir bir şekilde değiştiriyorsa kondüktometrik, elektrotlar arasındaki bir ortamın empedansını (hem direnç hem de reaktans) ölçülebilir bir şekilde değiştiriyorsa impedimetrik ölçümler olarak adlandırılabilir (Grieshaber, vd., 2008).

Biyolojik algılama elemanlarının bir elektrot yüzeyi üzerinde immobilize edilmesiyle impedimetrik bir biyosensör oluşturulur. Ölçüm, hedeflenen analiti, analit aktivitesiyle orantılı bir elektrik empedans sinyalinin çıkışı yoluyla alınır. Bu yöntemde kullanılan en yaygın teknik Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisidir (EIS). Elektrokimyasal

Empedans Spektroskopisi kullanılarak, elektrotun özellikleri ve elektrot yüzeyinde meydana gelen işlemler rahatlıkla belirlenebilir (Maalouf, vd., 2007).

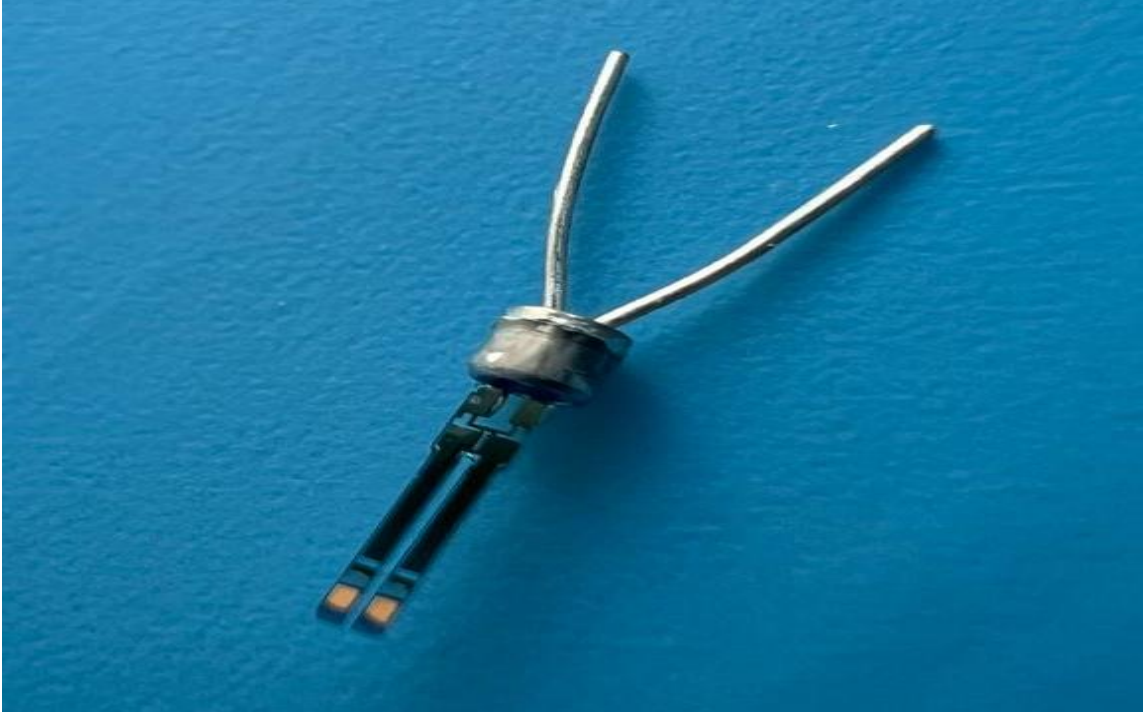
Tipik olarak, her empedans spektrumunda bir yarım daire biçimli kısım ve ayrıca bir doğrusal kısım vardır. Yüksek frekanslarda izlenebilen yarım daire kısmı elektron transferiyle sınırlı  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  sürecini ifade ederken, lineer kısım difüzyonla olan sınırlı süreci ifade eder. Yarım dairenin çapı, elektrot yüzeyindeki yük transfer direncinin hesaplanması için kullanılır. Ölçülen EIS değerleri, eşdeğer bir devre modeli ile şekillendirilebilir. Bu eşdeğer devre modeli, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki elektrolit çözeltisinin direnci, karmaşık biyoaktif tabakanın kapasitansı ile bağlantılı çift tabaka kapasitansı ile alakalı bir omik direnç ( $R_s$ ), yük transfer direnci ( $R_{ct}$ ) içerir. Warburg empedansı ( $Z_w$ ), redoks probunun elektrot yüzeyinden difüzyonunu temsil eder. EIS, yük transfer direncinin analizi için, etkili bir biçimde kullanılabilir (Özcan, vd., 2014).

### **1.1.2. Quartz Tuning Fork (QTF) Çalışma Elektrodu**

Günümüzde analitik cihazlar pazarında rekabet eden biyosensörler, minyatürize olma, yüksek hassasiyet, kararlılık ve düşük maliyet açısından avantaj sağlamalıdır. Elektrotların özellikleri, elektrokimyasal biyosensörün toplam potansiyelini etkiler. Bu sebeple, kaliteli bir elektrokimyasal biyosensör için elektrotların malzemesi ve tasarımı oldukça önemlidir (Abdulbari ve Basheer, 2017).

Kuvars Ayar Çatalları (QTF), kararlı rezonans frekansları sayesinde yaygın osilatör bileşenleri olarak kullanılırlar. QTF'ler, son zamanlarda yüksek güvenilirliğe sahip kütle duyarlı sensörler üretme potansiyeline sahip algılama sistemleri için dönüştürücü olarak kullanılmaya başlanmıştır (Dedeoğlu, vd., 2019).

Hassaslık, düşük maliyeti, çoklu ve kolay modifikasyon adımları yapmaya imkân sağlayan QTF elektrodunun birçok avantajının olmasıyla birlikte, kırılgen yapısının olması bir dezavantaj olarak nitelendirilebilir.



Şekil 1. QTF elektrodu

Altın uçları sayesinde modifikasyona açık olan QTF'ler, yapısının verdiği iletkenlik özelliği sayesinde bu tez çalışmasında elektrokimyasal biyosensör sisteminin çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.

## 1.2. KIM-1 Analizi için Biyoalgılama Sisteminin Geliştirilmesi

Biyobelirteçler, kan, doku, vücut sıvıları gibi biyolojik ortamlarda bulunan normal veya anormal durumları gösteren biyolojik moleküllerdir (Köse ve Maden, 2015). Böbrek hastalıklarının biyobelirteçleri de böbrekte meydana gelen anormallikleri tanımlayan ve böbrek fonksiyonunu yansıtabilen maddelerdir. Böbrekten salınabilir veya böbrek

yolundaki hasara veya böbrek fonksiyonundaki değişikliklere verilen spesifik bir cevaptan kaynaklı oluşabilmektedirler (Rajendram, vd., 2016).

Böbrek hasarının erken teşhisi için biyobelirteçlerin araştırılması kritik bir noktadır, çünkü böbrek fonksiyonlarında azalma yaşanmasından önce tedaviye başlanabilir. Bu sebeplerden, böbrek hasarının erken tespiti için hassas, spesifik ve invaziv olmayan bir biyobelirteç olması önemlidir. Potansiyel böbrek hasarı biyobelirteçleri arasından en umut verici olanlardan biri Böbrek Hasarı Molekülü-1 (KIM-1)'dir (Moresco, vd., 2018).

KIM-1, benzersiz bir altı sistein immünoglobulin benzeri alan ve türler arasında korunan müsin açısından zengin bir hücre dışı bölge içeren bir tip I hücre zarı glikoproteinidir (Vaidya, vd., 2010). HAVcr-1 ve TIM-1 olarak da bilinen bir transmembran glikoproteinini olan KIM-1, T-hücresi immünoglobulin ve müsin alanı ailesine (TIM) aittir. TIM glikoproteinleri, immün hücreleri üzerinde sunulur ve bağışıklık reaksiyonlarının düzenlenmesi ile ilgili süreçlere katılır. KIM-1, dahil olduğu ailenin diğer üyelerinden, sadece immünokompetan hücreler tarafından değil, aynı zamanda epitel hücreleri tarafından da açığa çıkmasıyla farklılık göstermektedir (Karmakova, vd., 2021; Li, vd., 2013).

Akut Böbrek Hasarı teşhisi için bir biyobelirteç olan KIM-1, idrarda bulunması nedeniyle böbrek hasarı için oldukça spesifiktir. ABH'den sonra KIM-1'in ekstraselüler bir bölümü idrarda çıkar ve burada saptanabilir (Vaidya, vd., 2006). Bununla birlikte KIM-1, akut böbrek hasarı dışında, kronik böbrek hasarı, renal hücreli karsinom, bazı kardiyovasküler hastalıklarda üriner ve serolojik bir biyobelirteç olarak öngörülebilir (Karmakova, vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada nefrotoksik kimyasal ve ilaçlara maruz bırakılan sıçanların idrarındaki KIM-1'in, böbrek hasarını tespit etmede serum kreatinin (SCr), kan üre nitrojeni (BUN) ve idrardaki *N*-asetil- $\beta$ -D glukozaminidaz (NAG) biyobelirteçlerine göre daha duyarlı olduğu görülmüştür (Zhou, vd., 2008).

Bu tez kapsamında KIM-1 biyobelirtecinin analizi için, Au uçlu QTF elektrot yüzeyine yapılan modifikasyonlarla yenilikçi hassas, spesifik, ekonomik bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir.



## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yang ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada KIM-1 analizi için yüksek ışık verimliliğine sahip yeni bir elektrokemilüminesans (ECL) immünoensör geliştirmişlerdir. Çalışma elektrodu olarak AuNP ile modifiye edilmiş GCE kullanılmıştır. Tayin aralığı 50 fg/mL-1 ng/mL olan immünoensörün saptama limitini 16.7 fg/mL olarak hassas bir immünoensör geliştirdiklerini ve ikili güçlendirilmiş etkiye sahip olduğu belirtilen bu ECL yayıcı ile basitlik, etkinlik ve su stabilitesi özellikleriyle biyoanalizdeki bu uygulamanın genişletileceğini belirtmişlerdir (Yang, vd., 2018).

Liu ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada KIM-1 tayini için kuaterner metalik/metalik olmayan PdPtBP alaşımı mezogözenekli nanoparçacıklar (MNP'ler)/MXenes ve CuCl<sub>2</sub> nanotellerine (NW'ler) dayalı yeni bir enzim içermeyen elektrokimyasal immünoensör geliştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrodu (GCE) modifiye etmek amacıyla substrat olarak yüksek iletken CuCl<sub>2</sub> nanotellerin üstün biyoyumlu altın nanoparçacıkları (AuNP'ler) ile kombinasyonundan faydalanılmıştır. İmmünoensörün 86 pg/mL'lik bir saptama limiti ile 0,5 ng/mL-100 ng/mL tayin aralığında iyi bir lineer tepki sergilediği belirtilmiştir (Liu, vd., 2021).

Boyacıoğlu ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada bir sinyal yükseltici olarak gözenekli NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> @ CeO<sub>2</sub> mikrokürelere ve bir elektrokimyasal olarak kovalent organik çerçeveler-altın nanopartiküller (COFs-AuNPs) kompozitine dayalı olarak hızlı bir sandviç tipi elektrokimyasal KIM-1 immünoensörü geliştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak COF'ler-AuNP'ler ile modifiye edilmiş GCE'ler kullanılmıştır. Geliştirilen immünoensör, altın-amino afinitesi yoluyla yakalama antikoru immobilizasyonu ve güçlü elektrostatik etkileşim yoluyla ikincil antikör inkübasyonu ile yapılmıştır. Saptama limiti (LOD) 2,00 fg/mL olarak hesaplanan immünoensörün, kısa yanıt süresinde seçici ve hassas tayine olanak sağladığı belirtilmiştir (Boyacıoğlu, vd., 2022).

Yin ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada KIM-1'in bakım noktası (POC) testi için PdPtCu@BP çift katmanlı nano-tabakalar (BNS'ler) üzerine inşa edilmiş yeni bir etiketsiz elektrokimyasal immünoensör geliştirilmiştir. PdPtCu@BP BNS'lerin mükemmel iletkenliği ve peroksidaz benzeri performansından yararlanan, tasarlanmış etiketsiz elektrokimyasal immünoensör, 32 pg/mL'lik bir minimum saptama limiti ile 100 pg/mL-100 ng/mL tayin aralığında çalışma gösterdiği ve POC testi için hızlı ve hassas analiz sağladığı belirtilmiştir (Yin, vd., 2022).





## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasallar ve Aparatlar

Bütün kimyasallar Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. QTF elektrotlar, Robolink Teknoloji'den temin edilmiştir ve elektrokimyasal ölçümler için üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda, Ag / AgCl referans elektrot olarak ve platin tel karşı elektrot olarak kullanılmıştır. Ultra saf su Elga LC134 sisteminden (18.2M $\Omega$  / cm) elde edilmiştir. KIM-1 ve anti-KIM-1, MyBioSource San Diego, USA' den satın alınmıştır ve her ikisi de pH 7.4 fosfat tamponu ile hazırlanmışlardır. %0,005'lik BSA, fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Gerçek idrar örnekleri Sigma-Aldrich'ten (Bovine urine, ERMBB386, Sigma-Aldrich) temin edilmiştir. Tüm elektrokimyasal deneyler, Gamry potentiostat / galvanostat (Referans 600, Gamry Instruments, Warminster, PA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve elektrokimyasal ölçümler, redoks probu olarak kullanılan 0.1 M KCl içeren 5mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 50 mM PBS çözeltisi (pH 7.4) içinde yapılmıştır. Biyosensörün immobilizasyon aşamalarında elektrot yüzeyinde meydana gelen morfolojik değişimleri inceleyebilmek için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'ndeki (ÇOBİLTUM) WITec ALPHA 3100R marka Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve JEOL SEM-7100 EDX marka Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır.

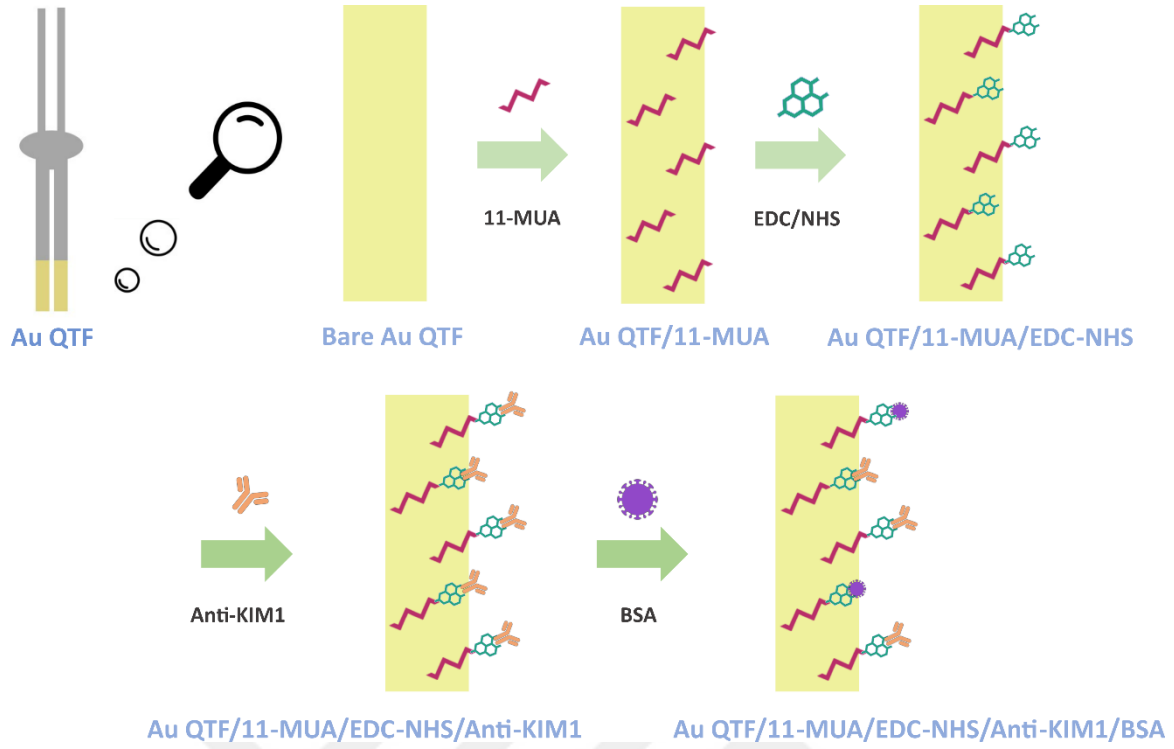
#### 3.2. Elektrokimyasal Ölçümler

İmmobilizasyon aşamaları tamamlanan elektrotlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart KIM-1 çözeltileri ile muamele edilmiştir. Her optimizasyon adımında ve farklı KIM-1 konsantrasyonunda yüzey davranışının incelenmesi ve bağlanmanın izlenmesi amacıyla elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ölçümleri alınmıştır. Elektrokimyasal ölçümler, redoks probu içerisinde yapılmıştır. CV ölçümleri için uygulanan potansiyel - 0,5 V ile 0,7 V arasında seçilmiştir, adım büyüklüğü 10 mV ve tarama hızı 100 mV/s'dir. Empedans ölçümlerinde uygulanan formal potansiyel 0 V ve

alternatif akımda 5 mV'tur. Empedans ölçümleri 50,000 ile 0,05 Hz arasındaki frekans aralığında yapılmıştır.

### 3.3. KIM-1 Biyosensörünün İmmobilizasyon Aşaması

İmmobilizasyon aşamasında öncelikle Au uçlu QTF elektrot, kendi kendine birleşen tek tabaka (SAM) oluşumu için gece boyunca 50 µM 11-MUA çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra, elde edilen 11-MUA/Au elektrodu, bağlanmamış molekülleri uzaklaştırmak için sırasıyla kendi çözücüsü etanol ve ultra saf su ile durulanmıştır. 11-MUA ile modifiye edilmiş elektrotlar, 11-MUA'da bulunan karboksilik asit terminal gruplarının aktivasyonu ve Anti-KIM1 antikorundaki amino gruplarının kovalent etkileşimi için 0.4 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) ve 0.1 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) ile 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Antikorların immobilizasyonu için uygun yüzey oluşturulduktan sonra, elektrotların her biri 10 µL 100 pg/mL Anti-KIM1 çözeltisi içinde 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Anti-KIM1 antikorunun inkübasyonundan sonra elektrotlar, bağlanmamış antikor moleküllerini uzaklaştırmak için ultra saf su ile durulanmıştır. Son olarak elektrotlar, elektrot yüzeyinde antikor-antijen spesifik bağlanmasını sağlayabilmek ve spesifik olmayan bağlanmaları bloke etmek için BSA'da (%0,005) 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve ardından bağlanmayan molekülleri uzaklaştırmak için tekrar ultra saf su ile durulanmıştır. Uygulanan çalışma değerleri optimizasyon çalışmalarıyla belirlenmiştir. İmmobilizasyon aşaması tamamlanan biyosensör KIM-1 antijeni ölçümü alınıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Geliştirilen KIM-1 immünosensörünün immobilizasyon aşamaları Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. KIM-1 immünosensörünün immobilizasyon aşamaları

### 3.4. KIM-1 Biyosensörünün Optimizasyon Aşamaları

Bir biyosensörün en iyi çalışma performansını gösterebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılması gerekmektedir. KIM-1 tayini için geliştirilen immünosensörün ideal değerlerini belirlemek amacıyla 11-MUA konsantrasyonu için, EDC-NHS inkübasyon süresi için, Anti-KIM1 konsantrasyonu için, Anti-KIM1 inkübasyon süresi için, KIM-1 konsantrasyonu için ve son olarak da KIM-1 inkübasyon süresi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 3.4.1. 11-MUA Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışması

KIM-1 biyosensörünün hazırlanmasında SAM tabakası oluşturmak için kullanılan 11-merkaptoundekanoik asitin optimum konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla, 5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında 11-MUA çözeltileri ile SAM tabakası oluşturularak

3 farklı biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Biyosensörün hazırlanmasında kullanılan diğer immobilizasyon aşamaları ise sabit tutulmuştur. Ölçülen değerler doğrultusunda en uygun değer 50 µM olarak seçilmiştir.

#### **3.4.2. EDC-NHS İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışması**

Altın uçlu elektrot yüzeyine Anti-KIM1 antikorunu kararlı olarak immobilize etmek amacıyla bir önceki adımda oluşturulan SAM tabakası üzerinde EDC-NHS kullanılmıştır. EDC-NHS süre optimizasyonu için konsantrasyonlar aynı tutularak, süreler 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika olmak üzere 3 farklı biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Biyosensörler hazırlanırken diğer tüm şartlar sabit tutulmuştur ve bunların sonucunda ideal EDC-NHS inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

#### **3.4.3. Anti-KIM1 Konsantrasyon Optimizasyon Çalışması**

Anti-KIM1 antikorunun konsantrasyonları 50 pg/mL, 100 pg/mL ve 200 pg/mL olmak üzere 3 farklı biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Diğer tüm koşulların sabit tutulmasıyla karşılaştırılan sonuçlarda uygun Anti-KIM1 konsantrasyonu 100 pg/mL olarak seçilmiştir.

#### **3.4.4. Anti-KIM1 İnkübasyon Süresi Optimizasyon Çalışması**

Anti-KIM1 antikorunun konsantrasyonu seçildikten sonra ideal inkübasyon süresini belirlemek için diğer koşullar sabit tutulup antikor inkübasyon süreleri 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika olmak üzere 3 farklı biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Ölçümler sonucunda Anti-KIM1 inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

### **3.4.5. KIM-1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışması**

Biyosensör sisteminin en iyi performans gösterdiği çalışma aralığını belirlemek için 0,005 fg/mL-250 fg/mL ile 0,05 fg/mL-250 fg/mL olmak üzere 2 farklı tayin aralığında biyosensör sistemleri hazırlanmıştır. Diğer tüm koşulların sabit tutulduğu çalışmada immüno-sensör sistemi için ideal tayin aralığı 0,05 fg/mL-250 fg/mL olarak seçilmiştir.

### **3.4.6. KIM-1 İnkübasyon Süresi Optimizasyon Çalışması**

Son optimizasyon çalışması olan KIM-1 biyomarkerının inkübasyon süresi için 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika olmak üzere 3 farklı biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Biyosensörler hazırlanırken bütün koşullar sabit tutulmuştur ve sonuç olarak KIM-1 antijeni için ideal inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir.

## **3.5. KIM-1 Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamaları**

### **3.5.1. Kalibrasyon Grafiği**

Geliştirilen biyosensörün lineer tayin aralığını belirlemek amacıyla optimizasyon çalışmasında seçilen değerlerle biyosensörler hazırlanmıştır. Artan KIM-1 konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. EIS ve CV ölçümleri yapılmıştır. Yük transfer dirençleri ( $\Delta R_{ct}$ ) eşdeğer devre modelini kullanarak hesaplanmıştır. Bunların sonucunda KIM-1 biyosensörünün kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır.

### **3.5.2. Tekrarlanabilirlik**

İdeal ve lineer bir immüno-sensör için tekrarlanabilirlik çalışması oldukça önemlidir. Bu çalışmada, aynı koşullar altında 20 farklı biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan

biyosensörler 50 fg/mL olmak üzere tek bir konsantrasyonda inkübe edilmiştir. EIS ölçümleri alınmıştır. Bunlar sonucunda ortalama değer, varyasyon katsayısı, standart sapma değeri gibi istatistiksel veriler hesaplanmıştır.

### **3.5.3. Tekrar Üretilirlik**

Geliştirilen immüno-sensör sisteminin kararlılığını tespit etmek amacıyla yapılan bu çalışmada aynı standartta artan KIM-1 konsantrasyonlarıyla 10 kez immüno-sensör sistemleri hazırlanmıştır. EIS ölçümleri alınmıştır ve yük transfer dirençleri eşdeğer devre modelini kullanarak hesaplanmıştır. Yapılan her biyosensörün lineer grafiği elde edilip,  $R^2$  değerleri kıyaslanmıştır. Çalışmanın bağıl standart sapması (RSD) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarla biyosensör sisteminin tekrar üretilebilirliği yorumlanmıştır.

### **3.5.4. Sabit Frekansta Empedans (SFI) Ölçümü**

KIM-1 antijeninin biyosensöre anlık bağlanmasını izlemek amacıyla sabit bir frekansta zamana karşı meydana gelen empedans ölçümü alınmıştır. Elde edilen grafiğe göre bağlanma yorumlanmıştır. Bu ölçümde reaksiyon hücresine KIM-1 antijeni damlatıldığından, hücrede pH 7.4 fosfat tamponu ile ölçüm alınmıştır.

### **3.5.5. Rejenerasyon**

Rejenerasyon çalışmasında biyosensörün dayanıklılığını tespit etmek amacıyla biyosensör yüzeyi asit ile muamele edilmiştir. Defalarca tekrarlanan bu işlemde biyosensörün kaçınıcı asit muamelesine kadar dayandığı izlenmiştir.

### **3.5.6. Seçicilik**

Seçicilik çalışması, geliştirilen biyosensörün KIM-1 antijenine spesifikliğinin kanıtı olarak yapılmaktadır. Bu amaçla, aynı koşullar altında üretilen biyosensörler girişim yapabilecek farklı antijen ve kimyasallar ile inkübe edilmiş ve EIS ölçümleri alınmıştır.

### **3.5.7. Depo Ömrü**

Geliştirilen biyosensör sisteminin ne kadar süre uygun saklama koşullarında muhafaza edilip çalıştığını gözlemlemek amacıyla depo ömrü çalışması yapılmıştır. Aynı koşullar altında hazırlanan immünosensörlerin, her hafta birinin EIS ölçümü alınmıştır.

## **3.6. KIM-1 Biyosensörünün Gerçek İdrar Örneklerine Uygulanabilirliği**

Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları bittikten sonra son aşama olarak biyosensörün gerçek idrar örneklerindeki yanıtı incelenmiştir. Bu çalışma, standart ekleme yöntemi ile yapılmış olup ölçüm sonucu çıkan empedans verileri, kalibrasyon grafiğinde elde edilen denklem ile hesaplanmıştır.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. KIM-1 Biyosensörünün İmmobilizasyon Aşamasına Ait Bulgular

KIM-1 immünosensörünün her immobilizasyon aşamasından sonra elektrot yüzeyindeki değişimleri izlemek için EIS ve CV ölçümleri yapıldı. KIM-1 tayini için geliştirilen immünosensörün immobilizasyon aşamalarına ait EIS ölçümleri Şekil 3'te, CV ölçümleri ise Şekil 4'te gösterilmiştir. KIM-1 immünosensörünün tasarımındaki her bir immobilizasyon basamağına dair adlandırmalar aşağıda verilen kısaltmalarla belirtilmiştir:

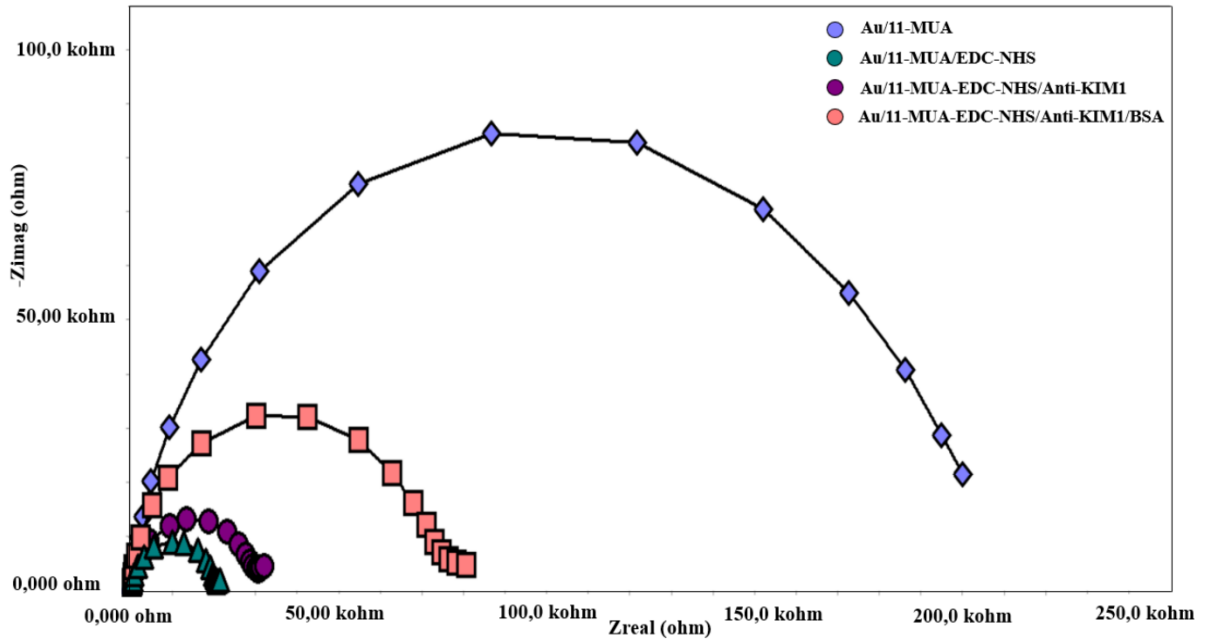
1. Au/11-MUA: 11-MUA ile kaplanmış elektrot yüzeyi.
2. Au/11-MUA/EDC-NHS: EDC-NHS çapraz bağlayıcı immobilizasyonu sonrası elektrot yüzeyi.
3. Au/11-MUA/EDC-NHS/Anti-KIM1: Anti-KIM1 antikoru bağlanmasından sonra elektrot yüzeyi.
4. Au/11-MUA/EDC-NHS/Anti-KIM1/BSA: BSA immobilizasyonu sonrası elektrot yüzeyi.

Elektrokimyasal immünosensörlerde, elektrot yüzeyine yapılan her bir modifikasyondan sonra elektrot yüzeyinin iletkenlik özellikleri değişmektedir. Elektrot yüzeyindeki modifikasyon bağlanmalarını izleyebilmek adına her aşamada ölçümler gerçekleştirilmektedir.

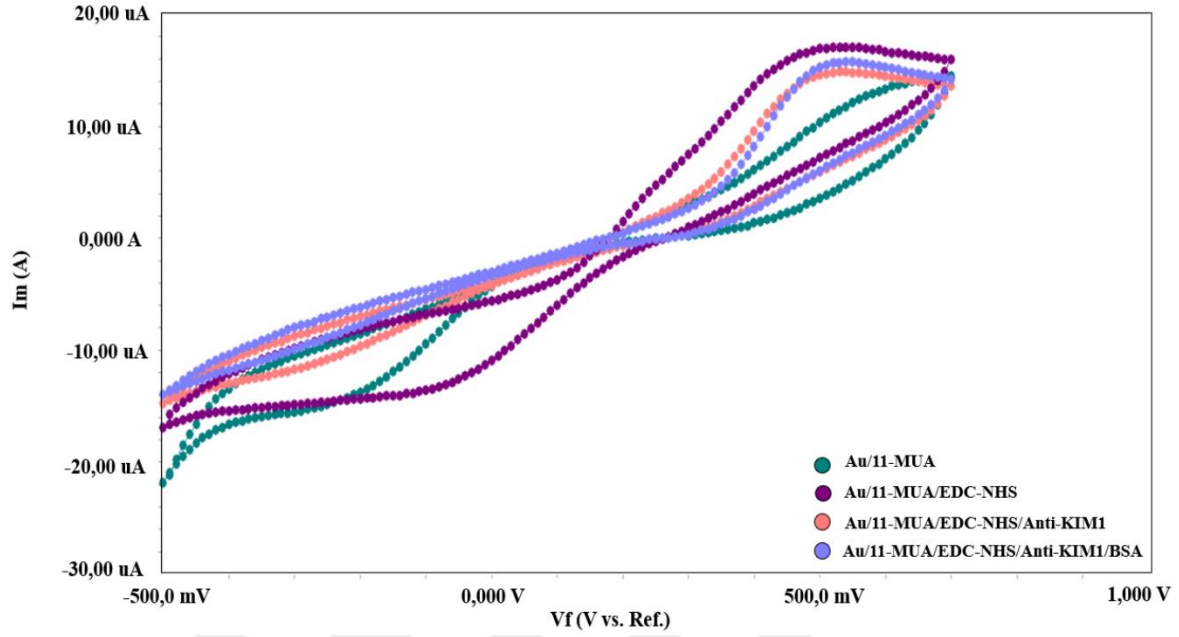
İmmobilizasyonun ilk adımında QTF elektrodunun altın yüzeyine 11-MUA'nın -SH grupları ile bağlanmasıyla SAM tabakası oluşturulmuştur. Bu durumda, 11-MUA'nın uzun zincirli bir yapı olması ve difüzyonu zorlaştıran fonksiyonel COO- terminallerinin olması sebebiyle Şekil 3'teki EIS eğrileri incelendiğinde 11-MUA ile modifiye edilen elektrot yüzeyinin Rct değerinin oldukça yüksek olduğunu ve buna bağlı olarak da Nyquist diyagramında yarım daire çapının da oldukça yüksek olduğu görülmektedir. 11-MUA



immobilizasyonu ile elde edilen ve Şekil 4'te görülen döngüsel voltamogramların karakteristik piklerinde ise yüzeyin bir miktar yalıtkanlaşmasıyla yüzeyde ölçülen akımın da bir miktar azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, 11-MUA ile yapılan modifikasyonla başarılı SAM tabakası oluştuğunun kanıtı olarak gösterilebilir. 11-MUA immobilizasyonundan sonra yüzeyde karboksil gruplarını aktifleştirmek için çapraz bağlayıcı görevi yapan EDC-NHS immobilizasyonunun yapılmasıyla elektron transfer hızı artmıştır ve elektron transfer direnci önemli ölçüde azalmıştır bu nedenle EDC-NHS'nin EIS eğrisinde, 11-MUA'nın EIS eğrisine göre düşüş görülmüştür. Bu immobilizasyon adımıyla elektrot yüzeyine Anti-KIM1 antikorunun immobilizasyonu için uygun koşullar sağlanmıştır. Anti-KIM1 antikoru yüzeyde kovalent bağ oluşturarak bağlandıktan sonra yüzeyde oluşan katman bariyer etkisi oluşturmaktadır ve bu durum yalıtkanlıkla sonuçlanıp EIS eğrisinde artışla izlenmektedir. İmmobilizasyon aşamasının son basamağında ise antikor-antijen spesifik bağlanmasını sağlamak amacıyla, elektrot yüzeyi BSA ile modifiye edilip yüzeyde açıkta kalan uçların bloklanma işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu durumda yük transfer direncinin arttığı görülmektedir. Şekil 4 incelendiğinde döngüsel voltametri sonuçlarının Şekil 3'teki empedans spektrumlarıyla uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Yüzeyde oluşan katmanlı yalıtkan tabaka sebebiyle ferri/ferro redoks çiftinin yüzeye yaklaşması engellenmekte ve dolayısıyla anodik katodik pik akımlarında düşüş görülmektedir.



Şekil 3. KIM-1 biyosensörünün immobilizasyon aşamalarının EIS grafikleri



Şekil 4. KIM-1 biyosensörünün immobilizasyon aşamalarının CV voltamogramları

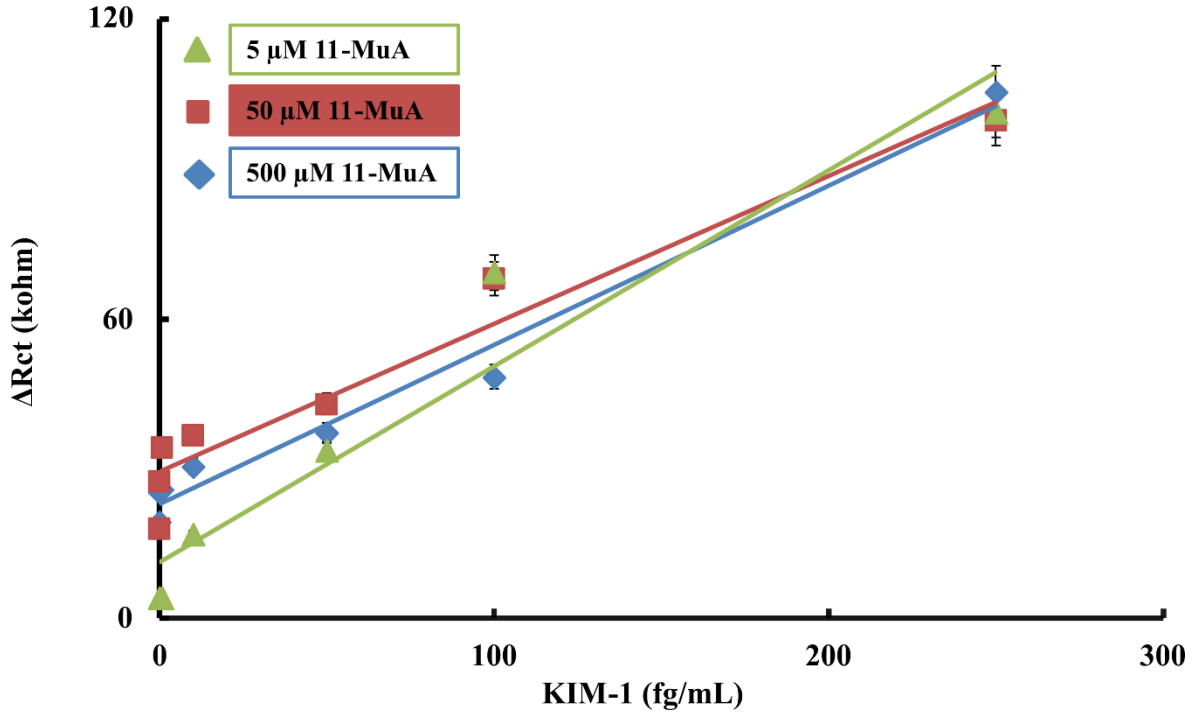
## 4.2. KIM-1 Biyosensörünün Optimizasyon Aşamalarına Ait Bulgular

KIM-1 biyosensörünün optimizasyon çalışmaları yapılırken her parametre için elde edilen  $R_{ct}$  değerleri karşılaştırılmıştır. Biyosensörün çalışması için en uygun değerler seçilmiştir ve bu sayede KIM-1 biyosensörünün verimli bir sistem olması sağlanmıştır.

### 4.2.1. 11-MUA Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

Bu çalışmada KIM-1 immünosensörünün biyoaktif tabakasındaki 11-MUA konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamanın amacı, 11-MUA konsantrasyonunun hazırlanan immünosensör aktivitesini ne derecede etkilediğini saptamaktır. Bu amaçla, farklı 11-MUA konsantrasyonlarında hazırlanan üç farklı biyosensör ile grafikler oluşturulmuştur ve grafikler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. 11-MUA konsantrasyon optimizasyonuna ait grafikler Şekil 5'te gösterilmiştir.

11-MUA konsantrasyon optimizasyonu çalışması için 5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 500  $\mu\text{M}$  olmak üzere üç farklı konsantrasyon denenmiştir. İlk olarak 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna ait biyosensör ile çalışma yapılmıştır ve standart bir grafik elde edilmiştir. Ardından 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna ait biyosensör oluşturulmuş ve elde edilen standart grafiğe bakıldığında başlangıçta 50  $\mu\text{M}$  11-MUA konsantrasyonuna ait biyosensörün daha iyi bir sonuç elde ettiği görülmüştür. Son olarak 500  $\mu\text{M}$  11-MUA konsantrasyonunda bir biyosensör hazırlanmıştır ve grafiği önceki hazırlanan biyosensörlerin arasında kalmıştır. 500  $\mu\text{M}$  11-MUA konsantrasyonu hem grafikte elde edilen değerlerden hem de EIS ölçümleri alınırken yüksek sinyal vermesiyle çalışma zorluğu oluşturmasından kaynaklı seçilmemiştir. Bu durumda 5  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$  11-MUA konsantrasyonlarına sahip biyosensörlerin  $R^2$  değerleri incelenmiştir. 11-MUA konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafiklerinden elde edilen  $R^2$  değerleri ve denklemleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Tablo 1’deki değerler incelendiğinde 50  $\mu\text{M}$  11-MUA konsantrasyonuna ait biyosensörün  $R^2$  değerinin daha yüksek olduğu görülüp 11-MUA konsantrasyonu için optimum değer 50  $\mu\text{M}$  olarak seçilmiştir.



Şekil 5. 11-MUA konsantrasyon optimizasyonuna ait grafik

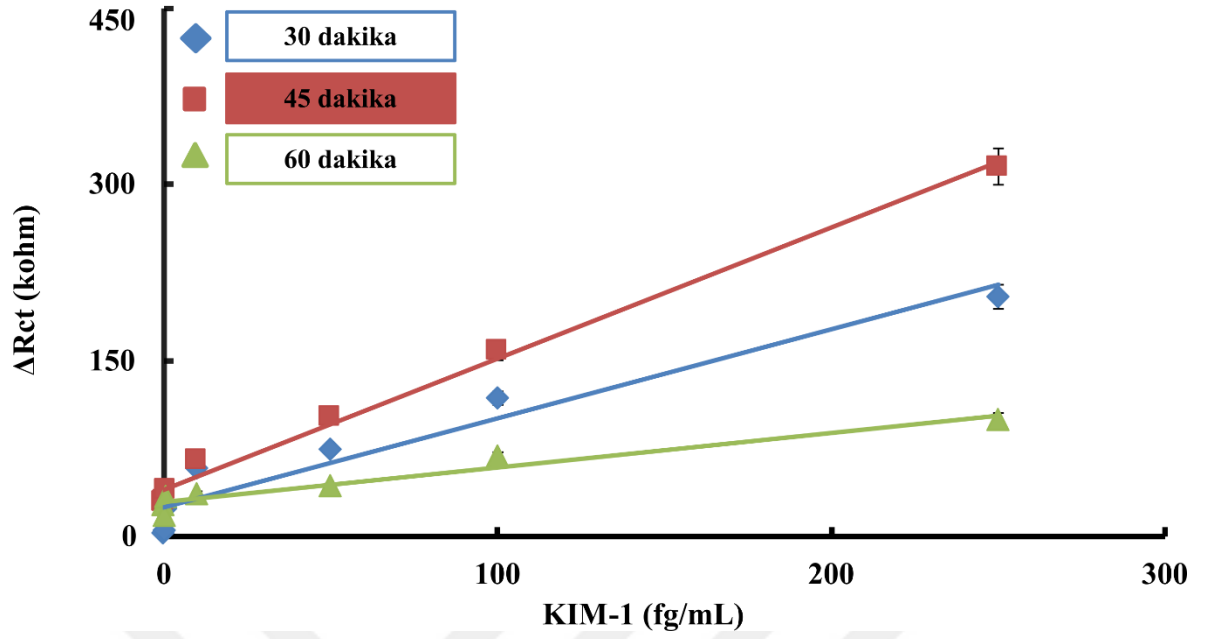
Tablo 1

11-MUA konsantrasyon optimizasyonuna ait  $R^2$  ve denklemler

11-MUA Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$	Denklem
5	0,9312	$y = 392,35x + 11330$
50	0,9432	$y = 296,21x + 29332$
500	0,9815	$y = 319x + 22986$

#### 4.2.2. EDC-NHS Süre Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

EDC-NHS immobilizasyonuna ait en uygun süreyi seçebilmek için üç farklı süre ile çalışılmıştır. Bu bağlamda çalışılan inkübasyon süreleri; 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakikadır. EDC-NHS inkübasyon süresi optimizasyonu grafiği Şekil 6'da, optimizasyona ait  $R^2$  ve denklemler Tablo 2'de gösterilmiştir. Şekil 6'da verilen grafikte görüldüğü gibi 45 dakika inkübasyonda bekletilen EDC-NHS ile yapılmış biyosensörün sinyalleri en yüksektir. Aynı zamanda Tablo 2'de verilen  $R^2$  değerlerine göre en yüksek  $R^2$  değeri yine 45 dakikalık EDC-NHS inkübasyonunda sağlanmıştır. Şekil 6'daki grafik incelendiğinde 30 dakikalık EDC-NHS inkübasyonu da iyi bir verimlilik sergilemiştir, ancak 60 dakikalık EDC-NHS inkübasyonunda biyosensörün verimliliğinin oldukça net bir şekilde düştüğü görülmüştür. Bu durumda hem grafikten hem de  $R^2$  değerinin desteklediği verilerle biyosensörün EDC-NHS süre inkübasyonunda yüksek verimlilik gösterdiği değer 45 dakika olarak seçilmiştir.



Şekil 6. EDC-NHS inkübasyon süresi optimizasyonuna ait grafik

Tablo 2

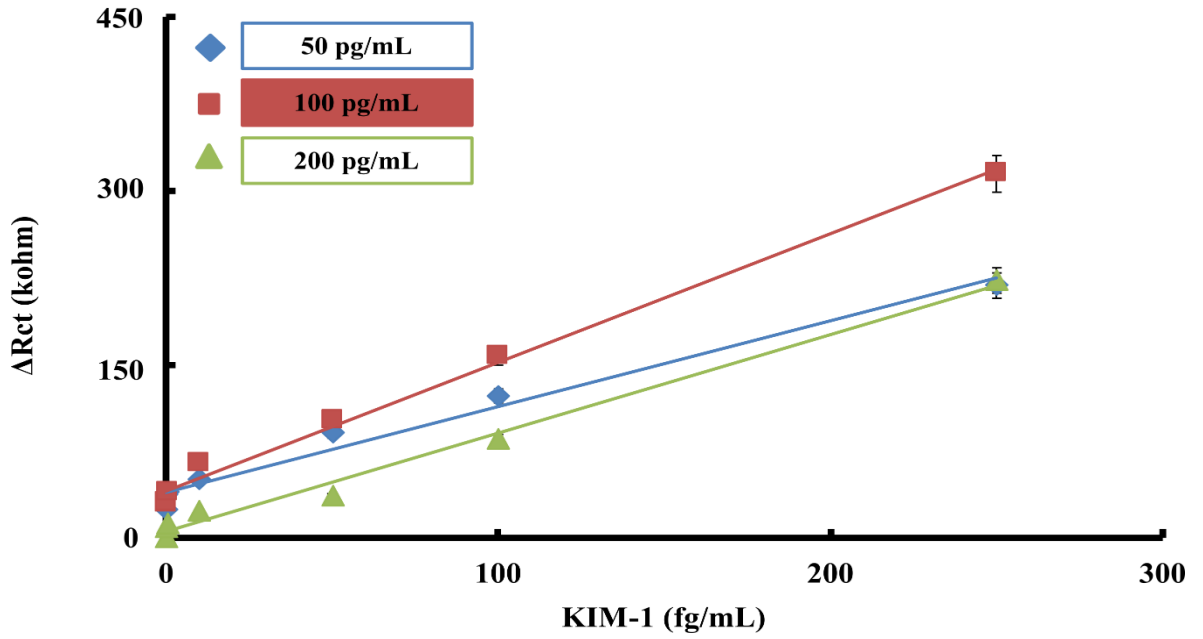
EDC-NHS inkübasyon süresi optimizasyonuna ait  $R^2$  ve denklemler

EDC-NHS İnkübasyon Süresi (dakika)	$R^2$	Denklem
30	0,9333	$y = 756,95x + 25201$
45	0,9926	$y = 1115,1x + 40255$
60	0,9432	$y = 296,21x + 29332$

#### 4.2.3. Anti-KIM1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

Tasarlanan biyosensörün hassas bir sistem olabilmesi için optimum değerinin bulunması gereken önemli parametrelerden biri de antikor konsantrasyonudur. Antikor konsantrasyonunun optimizasyon çalışmasında üç farklı Anti-KIM1 konsantrasyonu ile çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar sırasıyla 50, 100 ve 200 pg/mL'dir. Çalışılan Anti-KIM1 konsantrasyonları ile biyosensörlerin cevapları arasındaki ilişkiye ait grafikler Şekil 7'de,

biyosensörlere ait  $R^2$  değerleri ve denklemler ise Tablo 3'te gösterilmiştir. Şekil 7'deki grafik incelendiğinde 100 pg/mL anti-KIM1 konsantrasyonuna sahip biyosensör, 50 ve 200 pg/mL Anti-KIM1 konsantrasyonuna sahip biyosensörlere kıyasla hem daha yüksek sinyal artışı hem de daha tutarlı sinyal artışı göstermiştir. Aynı zamanda Tablo 3 incelendiğinde en yüksek  $R^2$  değeri 100 pg/mL Anti-KIM1 konsantrasyonuna sahip biyosensöre aittir. Bu durumda en verimli performans gösteren biyosensör olarak bu optimizasyon çalışmasında 100 pg/mL Anti-KIM1 konsantrasyonuna sahip biyosensör seçilmiştir.



Şekil 7. Anti-KIM1 konsantrasyon optimizasyonuna ait grafik

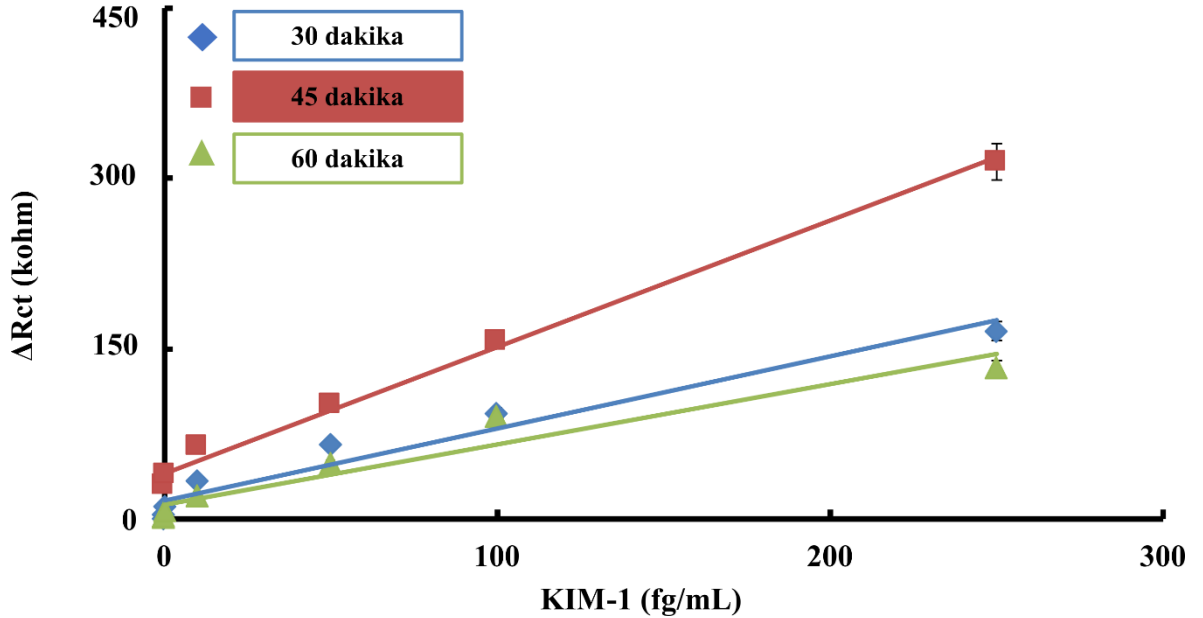
Tablo 3

Anti-KIM1 konsantrasyon optimizasyonuna ait  $R^2$  ve denklemler

Anti-KIM1 Konsantrasyonu (pg/mL)	$R^2$	Denklem
50	0,9796	$y = 740,53x + 39882$
100	0,9926	$y = 1115,1x + 40255$
200	0,9908	$y = 850,94x + 5884,6$

#### 4.2.4. Anti-KIM1 İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

Biyosensör sistemi için antikor konsantrasyonu optimize edildikten sonra antikorun inkübasyon süresi de optimize edilmelidir. Bu amaçla antikor inkübasyon süresi optimizasyon çalışması için 30, 45 ve 60 dakika olmak üzere üç farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Anti-KIM1 inkübasyon süresi optimizasyonuna ait karşılaştırmalı grafik Şekil 8’de ve bu optimizasyon çalışmasına ait  $R^2$  ve denklemler Tablo 4’te verilmiştir. Şekil 8’deki grafik incelendiğinde 45 dakikalık Anti-KIM1 inkübasyon süresiyle çalışılmış biyosensörde 30 dakika ve 60 dakikaya kıyasla oldukça yüksek sinyal artışı olduğu görülmektedir. Bu durum, 30 dakika için az bir inkübasyon süresinde antikorun yüzeye yeterli düzeyde bağlanmaması olarak, 60 dakika için ise yüksek bir inkübasyon süresinde protein etkileşimlerinden kaynaklanan bozulmalar olabilmesiyle sinyaldeki artışın olumsuz etkilenmesi olarak yorumlanmıştır. Aynı zamanda Tablo 4 üzerindeki  $R^2$  değerleri incelendiğinde de 45 dakikalık antikor inkübasyon süresinin, diğerlerine kıyasla daha iyi bir değer gösterdiği görülmüştür. Bu sebeplere bağlı olarak tasarlanan biyosensörün en verimli çalıştığı antikor inkübasyon süresinin 45 dakika olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 8. Anti-KIM1 inkübasyon süresi optimizasyonuna ait grafik

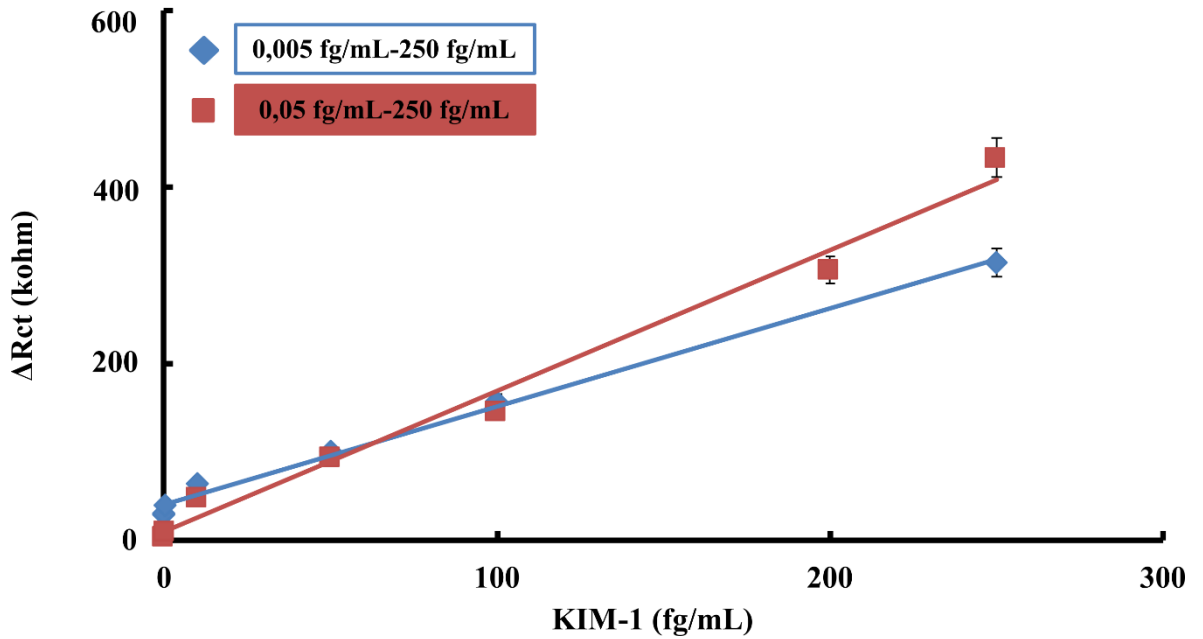
Tablo 4

Anti-KIM1 inkübasyon süresi optimizasyonuna ait  $R^2$  ve denklemler

Anti-KIM1 İnkübasyon Süresi (dakika)	$R^2$	Denklem
30	0,9467	$y = 633,5x + 16457$
45	0,9926	$y = 1115,1x + 40255$
60	0,925	$y = 530,81x + 12818$

#### 4.2.5. KIM-1 Konsantrasyon Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

KIM-1 immünoensörünün en verimli çalıştığı tayin aralığını bulmak için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bunun için iki farklı tayin aralığı ile çalışılmıştır. İlk çalışılan tayin aralığı 0,005 fg/mL-250 fg/mL'dir. Tayin aralığı 10 kat düşürülüp ikinci tayin aralığı olarak 0,05 fg/mL-250 fg/mL denendiğinde elde edilen standart grafikten daha iyi sonuç elde edilmiştir. KIM-1 konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafik Şekil 9'da, bu optimizasyona ait  $R^2$  ve denklemler ise Tablo 5'te verilmiştir.



Şekil 9. KIM-1 konsantrasyon optimizasyonu çalışmasına ait grafik



Tablo 5

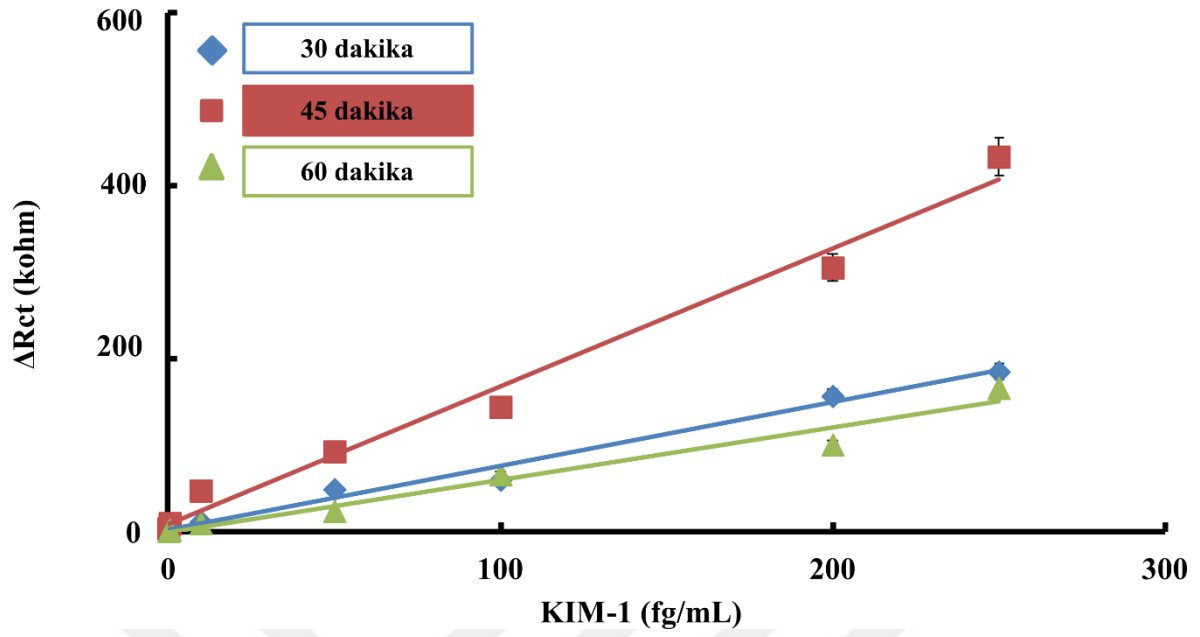
KIM-1 konsantrasyon optimizasyonu çalışmasına ait  $R^2$  ve denklemler

<b>KIM-1 Konsantrasyonu (fg/mL)</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>Denklem</b>
0,005-250	0,9926	$y = 1115,1x + 40255$
0,05-250	0,9856	$y = 1594x + 9613,1$

#### 4.2.6. KIM-1 İnkübasyon Süresi Optimizasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

KIM-1 antijeni için en uygun konsantrasyon belirlendikten sonra KIM-1 tayini için en uygun inkübasyon süresini bulmak amacıyla KIM-1 inkübasyon süresi optimizasyonu yapılmıştır. Bu optimizasyon çalışması için 30, 45 ve 60 dakika olmak üzere üç farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Optimizasyon çalışmasına ait grafikler Şekil 10'da gösterilmiştir.

İlk olarak inkübasyon süresi için 45 dakika denenmiştir ve elde edilen sonuçlar oldukça tutarlı olmuştur. Bunun üzerine süre düşürülüp 30 dakika denenmiştir ve grafikte görüldüğü üzere sinyaller oldukça düşmüştür. Bu sonuçla 30 dakikanın antijen inkübasyon süresi için yeterli gelmediği anlaşılmıştır ve 60 dakikalık inkübasyon süresi denenmiştir. Ancak elde edilen sonuca göre sinyaller daha da düşük çıkmıştır. Bu sonuç doğrultusunda antikorun KIM-1 antijenini bağlama kapasitesinin azaldığıyla ilgili yorum yapılmıştır. Matematiksel olarak  $R^2$  değerleri hesaplanmıştır ve Tablo 6'da verilmiştir. Tablo 6'daki  $R^2$  değerleri incelendiğinde ise 30 dakika ve 45 dakikalık inkübasyon süresi değerleri birbirine çok yakın ancak 60 dakikalık inkübasyon süresinin  $R^2$  değeri diğerlerine göre düşük çıkmıştır. Grafikte birlikte bir sonuca varıldığı için en verimli inkübasyon süresi 45 dakika olduğu için optimum değer 45 dakika olarak seçilmiştir.



Şekil 10. KIM-1 inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmasına ait grafik

Tablo 6

KIM-1 inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmasına ait  $R^2$  değerleri ve denklemler

KIM1 İnkübasyon Süresi (dakika)	$R^2$	Denklem
30	0,9886	$y = 740,82x + 2246,1$
45	0,9856	$y = 1594x + 9613,1$
60	0,9682	$y = 605,73x + 369,14$

Geliştirilen KIM-1 immünoensörünün tasarımında kullanılan immobilizasyon basamakları için yapılan optimizasyon çalışmasından elde edilen optimum değerler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7

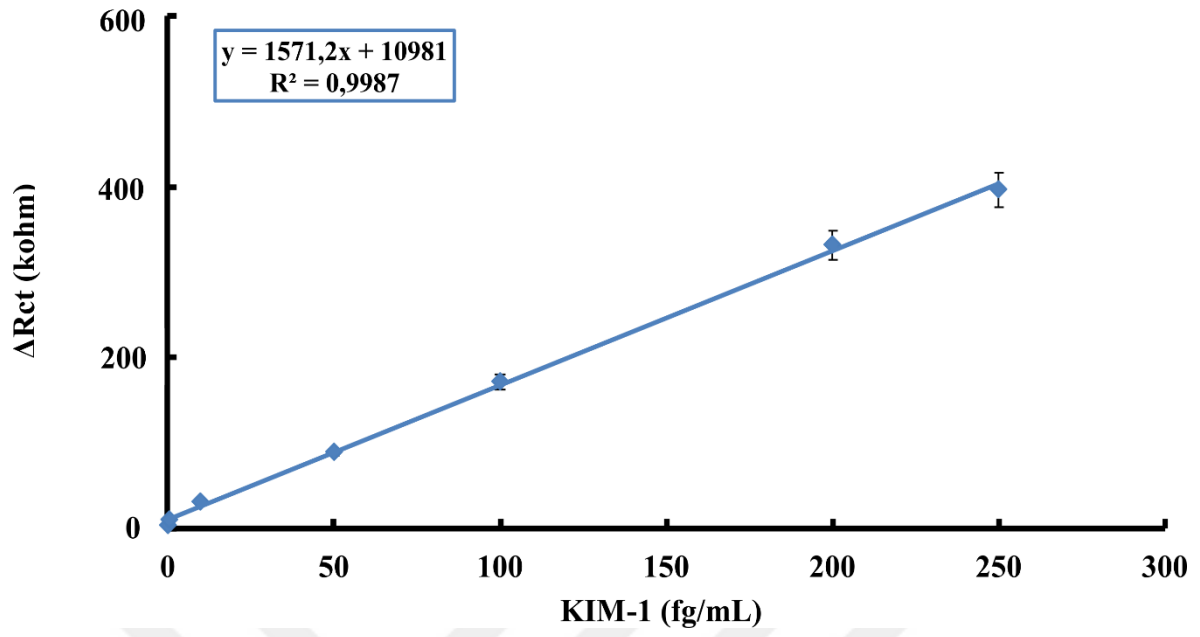
KIM-1 immünosensörünün optimizasyon çalışmasına ait değerler

<b>İmmobilizasyon Adımları</b>	<b>Optimum Değerler</b>
11-MUA konsantrasyonu	50 $\mu$ M
EDC-NHS inkübasyon süresi	45 dakika
Anti-KIM1 konsantrasyonu	100 pg/mL
Anti-KIM1 inkübasyon süresi	45 dakika
KIM-1 konsantrasyonu	0,05 fg/mL-250 fg/mL
KIM-1 inkübasyon süresi	45 dakika

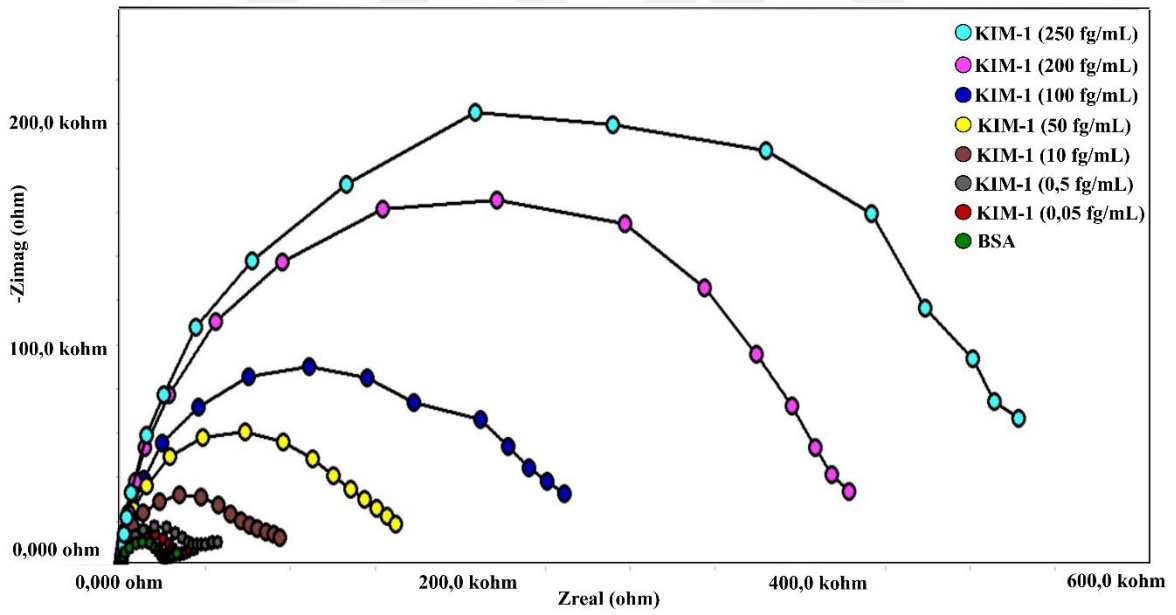
### **4.3. KIM-1 Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamalarına Ait Bulgular**

#### **4.3.1. Kalibrasyon Grafiği Çalışmasına Ait Bulgular**

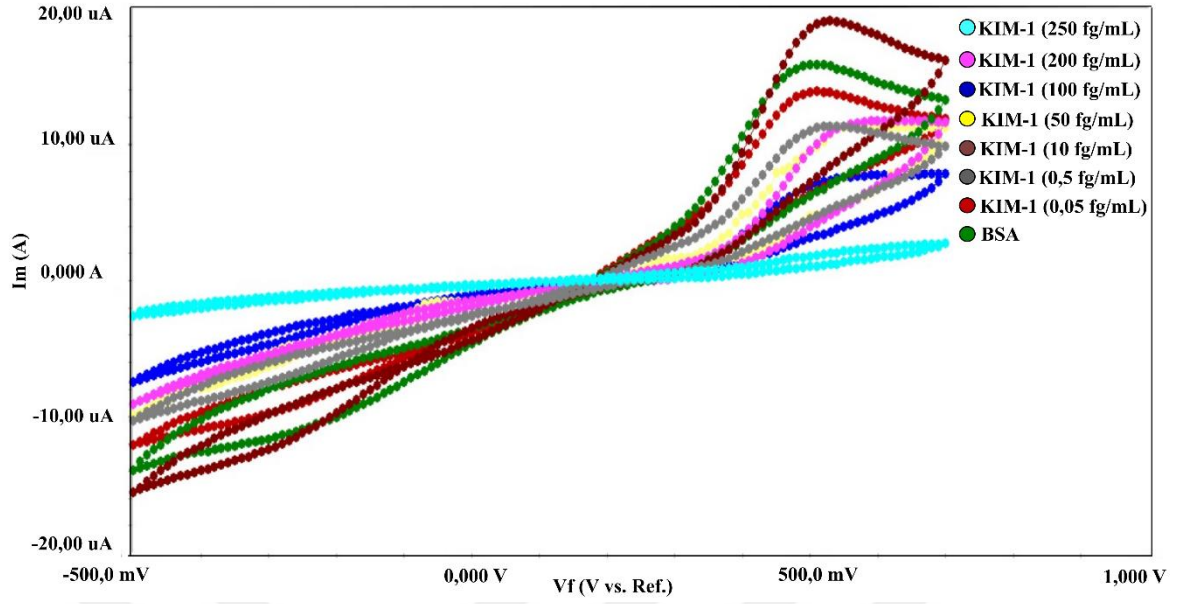
Tasarlanan KIM-1 immünosensörünün optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra kalibrasyon grafiği çizilmiştir. KIM-1 immünosensörünün lineer tayin aralığı 0,05 fg/mL – 250 fg/mL olarak belirlenmiştir. LOD (Tayin Limiti) 0,003592 fg/mL, LOQ (Ölçüm Limiti) 0,01197 fg/mL olarak hesaplanmıştır. KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiği Şekil 11’de verilmiştir. Şekil 12’de optimal şartlarda hazırlanan immünosensör sisteminin EIS spektrumları, Şekil 13’te ise CV voltamogramları gösterilmiştir.



Şekil 11. KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiği



Şekil 12. KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiğine ait EIS grafikleri



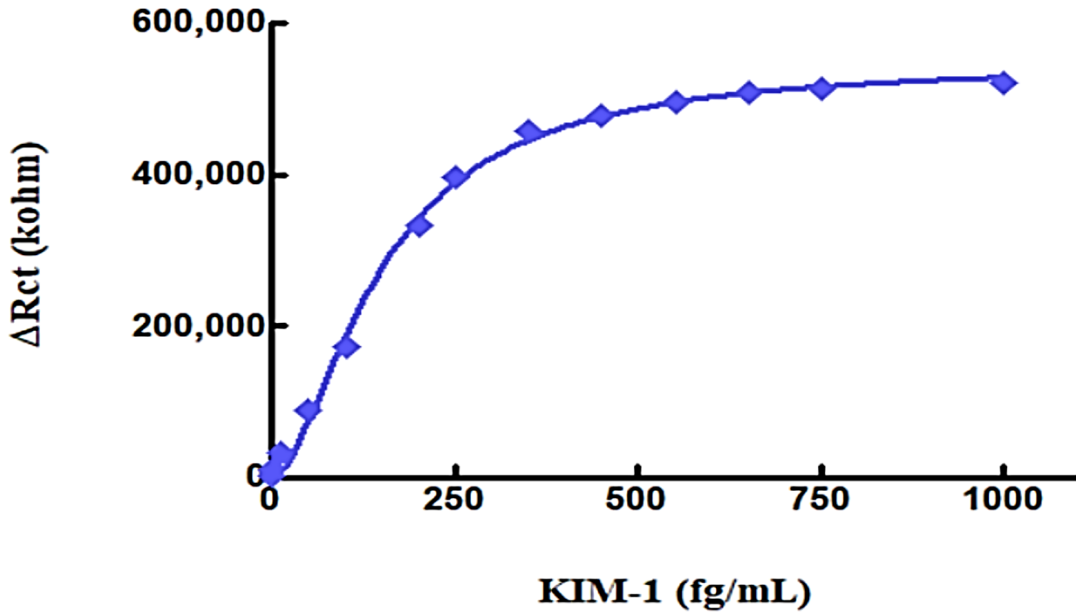
Şekil 13. KIM-1 immünosensörünün kalibrasyon grafiğine ait CV voltamogramları

#### 4.3.2. Ayrışma Sabiti (Kd) Hesaplamasına Ait Bulgular

Ayrışma sabiti (Kd) hesaplaması, antikor-antijen etkileşimlerinin kinetiğini belirlemede oldukça etkili bir yöntemdir (Özyurt, vd., 2022). Bir immünosensör için, çalışma elektrodunun yüzeyine immobilize edilmiş antikor ile antijeni arasındaki afinite hakkında bilgi vermektedir (Mokni, vd., 2022). Kd, geliştirilen immünosensörün tayin aralığının üzerindeki konsantrasyon değerlerinde KIM-1 immobilizasyonu yapılarak ve Graphpad Prism 5.0 yazılımının lineer olmayan regresyon fonksiyonu ile grafiğinin değerlendirilmesiyle hesaplanmıştır. Kd değerini belirlemek için  $\Delta R_{ct}$  yanıtları, KIM-1 konsantrasyonlarına karşı çizilerek grafik oluşturulmuştur ve KIM-1 immünosensörünün bağlanma eğrisi Şekil 14’te verilmiştir.  $R_{ct}(KIM1) - R_{ct}(BSA)$  farkı alınarak elde edilen  $\Delta R_{ct}$  değerlerinin Hill denklemi kullanılarak KIM-1 konsantrasyonuna karşı çizildiği hesaplama için aşağıdaki denklem kullanıldı:

$$\Delta R_{ct} = \frac{B_{max} \cdot [KIM1]^h}{K_d^h + [KIM1]^h} \quad (1.1)$$

B<sub>max</sub> maksimum biyosensör tepkisine ulaşılan enterpolasyonlu KIM-1 konsantrasyonlarını, K<sub>d</sub> yarı maksimum biyoalgılama sinyaline ulaşmak için gereken KIM-1 konsantrasyonunu ve h ise Hill katsayısını temsil etmektedir. Denklem 1.1'e göre hesaplanan K<sub>d</sub> değeri  $148,3 \pm 7,276$  fg/mL'dir. Şekil 14'teki grafik incelendiğinde 250 fg/mL KIM-1 konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda doğrusallık bozulmuştur, bu durum antikor-antijen spesifik bağlanması için 250 fg/mL üzerindeki konsantrasyonların geliştirilen immünosensör sistemi için doygunluğa ulaştığını göstermiştir. Diğer bir deyişle, seçilen tayin aralığının tasarlanan immünosensör sistemi için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

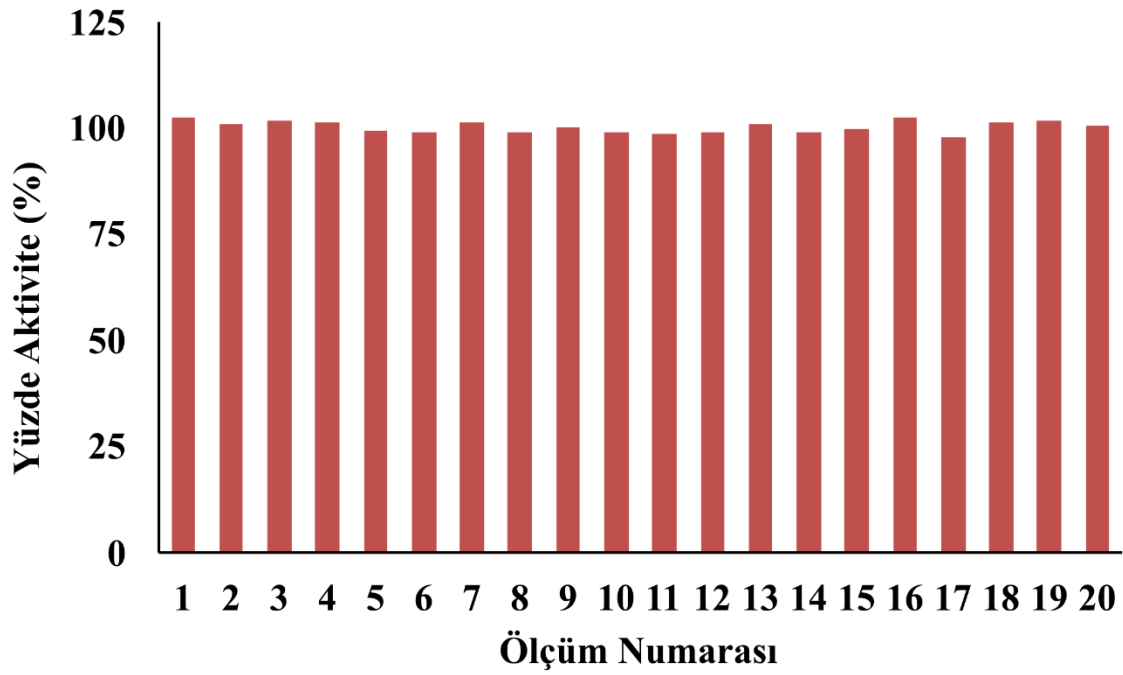


Şekil 14. KIM-1 immünosensörünün bağlanma eğrisi

#### 4.3.3. Tekrarlanabilirlik Çalışmasına Ait Bulgular

Tekrarlanabilirlik çalışması, geliştirilen immünosensörün kararlılığının göstergesi için önemli bir karakterizasyon çalışmasıdır. Bu çalışma kapsamında, aynı koşullar altında optimum değerlerle hazırlanan biyosensörlerin aynı konsantrasyonda ölçümü alınmıştır ve kararlılığı değerlendirilmiştir. Antijen konsantrasyonu olarak 50 fg/mL seçilen tekrarlanabilirlik çalışmasında, aynı koşullar altında optimum değerlerle yirmi farklı

biyosensör hazırlanmıştır. Alınan empedans ölçümleri doğrultusunda ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır ve bu değerler sırasıyla 50,18 fg/mL, 0,7 fg/mL ve %1,394 şeklindedir. Tekrarlanabilirlik çalışmasının grafiğe aktarılmış hali Şekil 12’de verilmiştir. Grafikte de incelendiği gibi geliştirilen immünosensör sisteminin tekrarlanabilir sonuçlar verdiği görülmüştür.

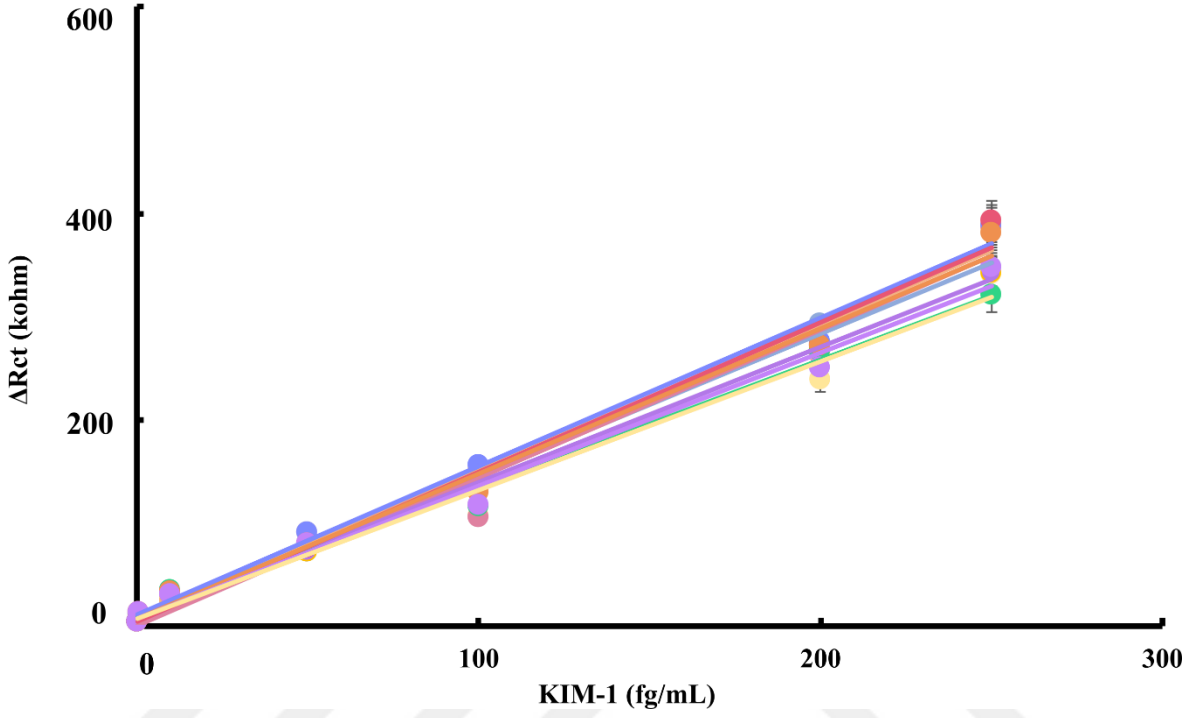


Şekil 15. KIM-1 biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmasına ait grafik

#### 4.3.4. Tekrar Üretilirlik Çalışmasına Ait Bulgular

Tekrar üretilebilirlik çalışması, geliştirilen biyosensörün doğru, kararlı, güvenilir ve aynı standartta tekrar üretilebilir olduğunun ispatı için yapılan bir çalışmadır. Bu çalışma doğrultusunda artan konsantrasyonlarda 10 farklı biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait grafik Şekil 13’te verilmiştir. Grafik incelendiğinde geliştirilen biyosensörün stabilitesi görülmüştür ve tekrar üretilebilir olduğuna karar verilmiştir. Tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait  $R^2$  değerleri, denklemler ve tayin aralığı Tablo 8’de verilmiştir. Tablo 8’deki sonuçlar doğrultusunda, denklemler kullanılarak, eğim ve intercept verilerine

ilişkin bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan RSD değerleri sırasıyla; % 5,65 ve % 35,49'dur.



Şekil 16. KIM-1 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait grafik



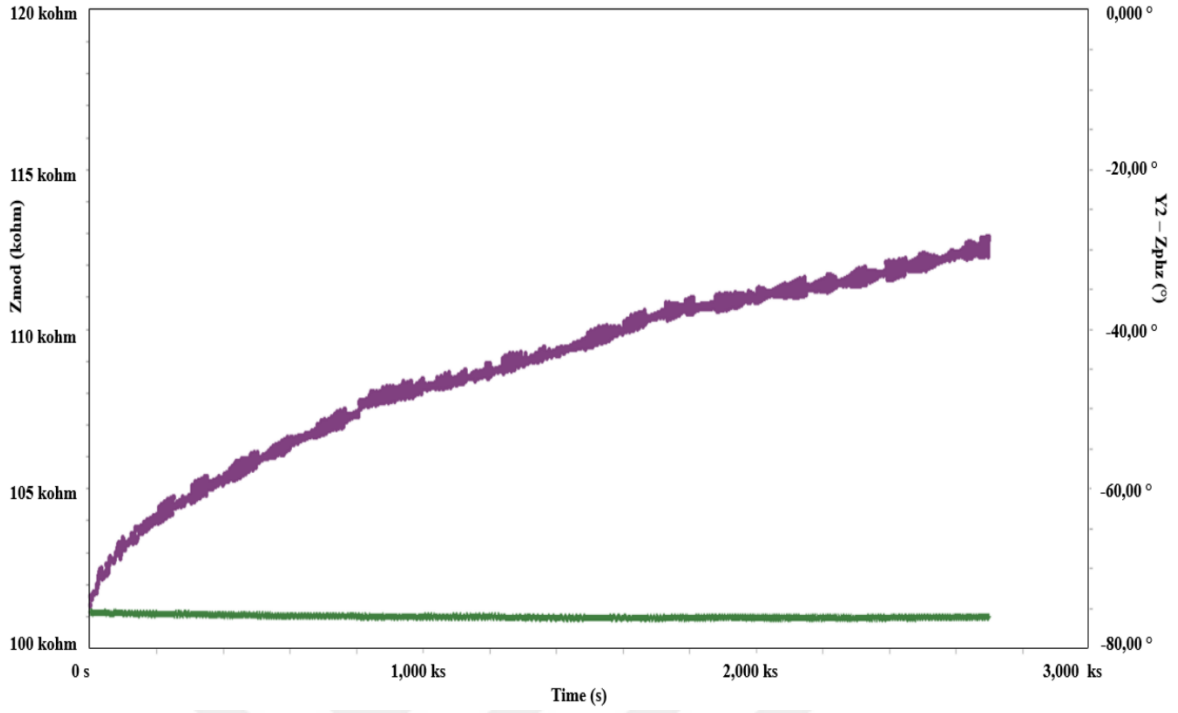
Tablo 8

KIM-1 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait  $R^2$  değerleri, denklemler ve tayin aralıkları

Tekrar Üretilebilirlik	$R^2$	Denklem	Tayin Aralığı (fg/mL)
1	0,9824	$y = 1246,7x + 6715,4$	0,05-250
2	0,9873	$y = 1424,1x + 8081,1$	0,05-250
3	0,9979	$y = 1373,5x + 8532,6$	0,05-250
4	0,978	$y = 1430,1x + 1059,6$	0,05-250
5	0,9986	$y = 1312,8x + 8371$	0,05-250
6	0,993	$y = 1241,6x + 9823,8$	0,05-250
7	0,9921	$y = 1439,8x + 10780$	0,05-250
8	0,9869	$y = 1445,9x + 5015$	0,05-250
9	0,9896	$y = 1411x + 6425,7$	0,05-250
10	0,9895	$y = 1284,8x + 7593,8$	0,05-250

#### 4.3.5. Sabit Frekansta Empedans (SFI) Ölçümü Çalışmasına Ait Bulgular

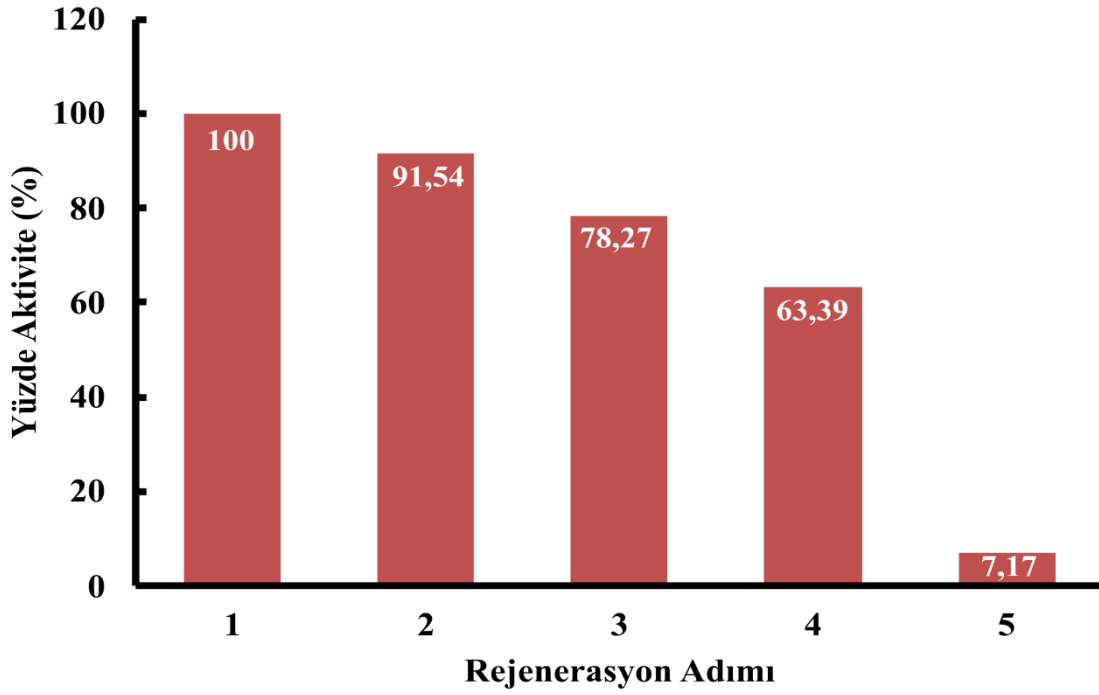
SFI çalışması, inkübasyon süresince gözlemlenemeyen immüno sensör yüzeyinde meydana gelen zamana bağlı değişimleri izlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, sabit bir frekansta, toplam inkübasyon süresince meydana gelen empedans değişimi izlenmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak reaksiyon hücreinde PBS (pH 7.4) ile çalışılmıştır. SFI çalışmasının empedans grafiği Şekil 14'te verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi reaksiyon hücresine KIM-1 antijeni damlatıldığından itibaren immüno sensör yüzeyinde bağlanma başlamıştır ve optimizasyon çalışmasında belirlenen 45 dakika boyunca anlık bağlanma izlenmiştir. Grafikte aşağıda görülen eğri ise sabit frekansı temsil eden faz açısı ölçümü eğrisidir.



Şekil 17. KIM-1 biyosensörünün SFI çalışmasına ait empedans grafiği

#### 4.3.6. Rejenerasyon Çalışmasına Ait Bulgular

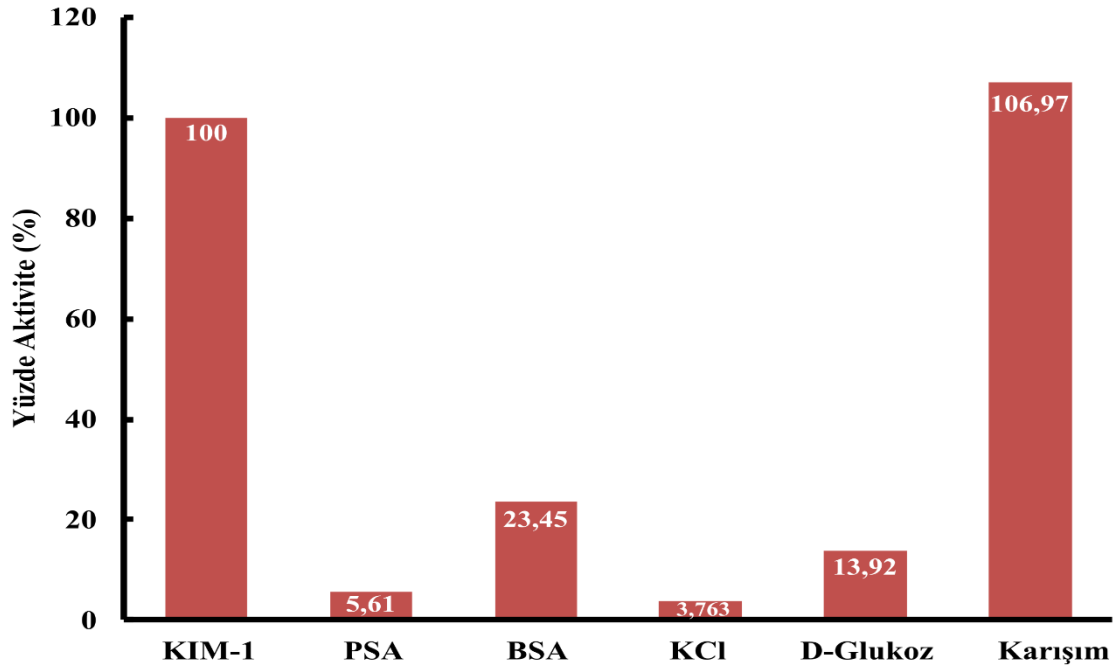
Geliştirilen biyosensörün tek kullanımlık olması yerine birden fazla kez kullanılabilir olması özelliği ekonomik açıdan avantaj sağlar. Bu amaçla tek kullanımlık olan QTF elektrodunun birden fazla kez kullanılabilirliğini tespit etmek için rejenerasyon çalışması yapılmıştır. Rejenerasyon çalışmasında, optimum koşullar ile hazırlanan immünosensör sisteminde, antikor-antijen arasındaki etkileşimi bozmak amacıyla %0,05'lik HCl çözeltisi ile 3 dakika muamele edilmiştir. Yapılan her asit muamelesinin ardından, immünosensör sistemi tekrar KIM-1 antijeninde (50 fg/mL) inkübe edilmiştir ve empedans ölçümü alınmıştır. Tekrarlanan rejenerasyon çalışması 5 kez tekrar edilmiştir, beşinci muameleden sonra immünosensör sisteminde belirgin derecede deformasyon görülmüştür. Bu durumda immünosensör sistemi 4 defa rejenerasyon edilmiştir. Rejenerasyon çalışmasına ait grafik Şekil 15'te verilmiştir. Bu sonuçla tek kullanımlık biyosensör sisteminin, tekrar kullanılabilir olmasının ekonomik açıdan avantaj sağlayabileceği değerlendirilebilir.



Şekil 18. KIM-1 biyosensörünün rejenerasyon çalışmasına ait grafik

#### 4.3.7. Seçicilik Çalışmasına Ait Bulgular

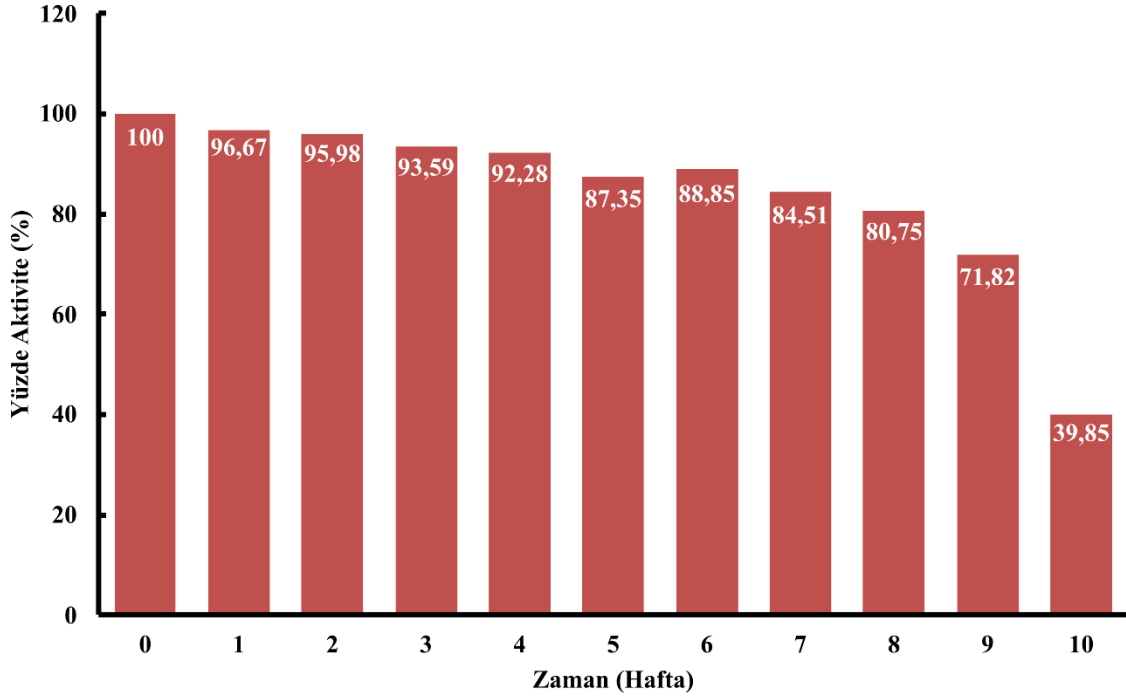
Seçicilik çalışmasında, geliştirilen KIM-1 biyosensörünün kendi antijenine spesifik olup diğer maddeler arasından spesifik olduğu antijenine girişim yapması beklenir. Bu karakterizasyon çalışması doğrultusunda, aynı koşullarda hazırlanmış 6 biyosensör KIM-1, PSA, BSA, KCl, D-Glukoz ve Karışım (KIM-1+PSA+BSA+KCl+D-Glukoz) olmak üzere farklı maddelerde inkübe edilmiş ve EIS ölçümleri alınmıştır. Seçicilik çalışmasına ait grafik Şekil 16'da verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi, biyosensör sistemi kendi antijenine spesifiklik gösterip, en çok girişimi ise kendi KIM-1 antijeninin de olduğu karışım immobilizasyonunda göstermiştir. Bu durumda geliştirilen biyosensör sisteminin seçici olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 19. KIM-1 biyosensörünün seçicilik çalışmasına ait grafik

#### 4.3.8. Depo Ömrü Çalışmasına Ait Bulgular

Depo ömrü çalışmasında, KIM-1 biyosensörünün raf ömrü tespit edilmiştir. Bir biyosensörün uzun raf ömrüne sahip olması, o biyosensörü avantajlı kılan özelliklerinden biridir. Bu amaç doğrultusunda, aynı koşullar altında optimum değerler ile hazırlanan biyosensörler uygun saklama koşullarında (+4°) muhafaza edilmiştir. Her hafta EIS ölçümü alınmak üzere 50 fg/mL KIM-1 antijeninde inkübe edilmiştir. EIS ölçümleri alınmıştır. Şekil 17’de depo ömrüne ait grafik verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi her hafta alınan ölçümler doğrultusunda biyosensör belli bir süre verimli sonuçlar vermiştir. 10. Hafta sonunda biyosensörün çalışma verimliliğinin belirgin bir ölçüde düştüğü görülmüştür. Dolayısıyla bu biyosensör sistemi için depo ömrü 9 hafta olarak belirlenmiştir.

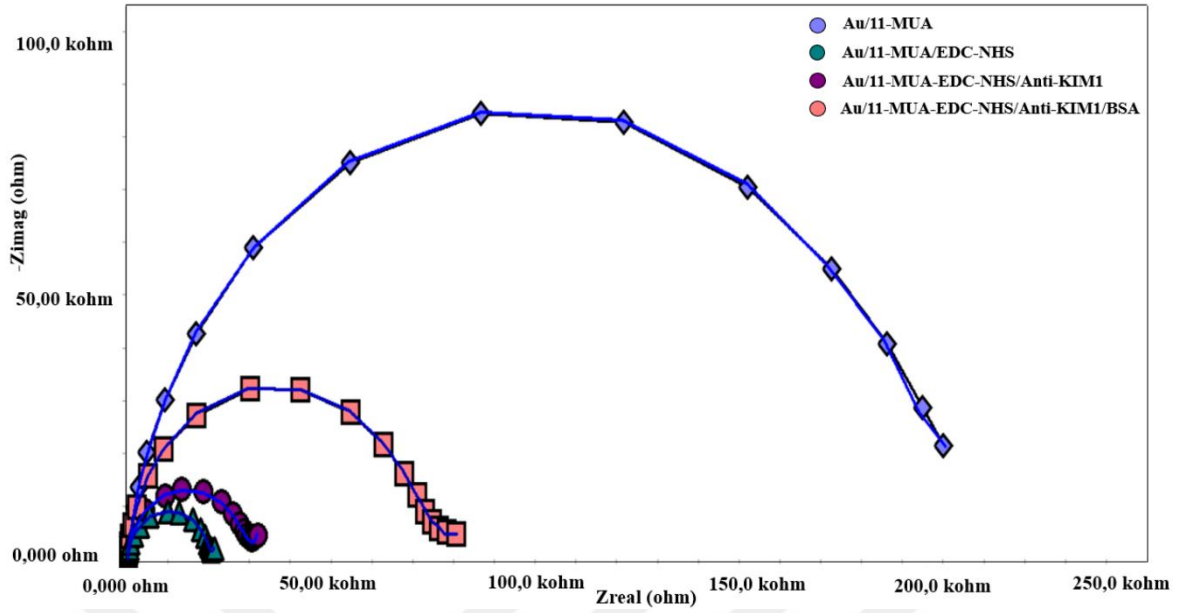


Şekil 20. KIM-1 biyosensörünün depo ömrü çalışmasına ait grafik

#### 4.3.9. KIM-1 Biyosensörünün Kramers-Kronig Sonuçlarına Ait Bulgular

Empedans bazlı bir biyosensör için empedans ölçümlerinde doğrusallık, kararlılık önemli bir rol oynar. Kramers-Kronig dönüşümü, geliştirilen biyosensörün empedans ölçümlerinin dış etkenlerden kaynaklı oluşan sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kullanılır (Özcan, vd., 2014).

Bu amaçla, Kramers-Kronig dönüşümüyle alınan empedans ölçümleri ile sanal hesaplaması karşılaştırılmıştır. KIM-1 biyosensörüne ait Kramers-Kronig dönüşümü Şekil 18’de verilmiştir.



Şekil 21. KIM-1 biyosensörünün Kramers-Kronig dönüşümüne ait grafik

#### 4.3.10. KIM-1 Biyosensörünün Gerçek İdrar Örneklerine Uygulanabilirliği Çalışmasına Ait Bulgular

Geliştirilen biyosensörün klinik olarak uygulanabilirliğinin tespiti için gerçek idrar örneklerinde çalışılmıştır. Bu amaçla, 5 farklı gerçek idrar örneğiyle çalışma yapılmıştır. Gerçek idrar örneklerinde, KIM-1 antijeninin var olup olmadığı bilinmediği için standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. 5 farklı örneğin önce KIM-1 antijeni eklemesi olmadan empedans ölçümleri alınmıştır. Ardından 10 fg/mL ve 50 fg/mL KIM-1 antijeni eklemeleriyle her örnek için empedans ölçümü alınmıştır. Bu işlemler, doğruluğu teyit etmek amacıyla farklı biyosensörlerde üçer kez tekrar edilmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen empedans verileri, kalibrasyon grafiğinin denklemi ile hesaplanmıştır. KIM-1 biyosensörünün gerçek idrar örneklerine uygulanabilirliği çalışmasına ait sonuçlar Tablo 9’da verilmiştir. KIM-1 antijeninin ELISA testlerindeki saptama aralığı 150-10000 pg/mL olarak belirtilmiştir (Moresco, vd., 2018). Tablo 9’daki verilere dayanarak geliştirilen KIM-1 immünosensörünün gerçek idrar örneklerindeki KIM-1 seviyesini büyük ölçüde hassasiyet göstererek saptayabileceği kanıtlanmıştır.

Tablo 9

KIM-1 biyosensörünün gerçek idrar örneklerine uygulanabilirliği çalışmasına ait bulgular

İdrar Örnek Numarası	KIM-1 Ölçülen Konsantrasyon (fg/mL)	Standart Eklenen Konsantrasyon [KIM-1] (fg/mL)	Biyosensörde Ölçülen Konsantrasyon (fg/mL, n=3)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	4,45	10	14,72/14,09/13,93	1,45	98,55
		50	53,57/55,51/54	0,165	99,84
2	3,32	10	13,96/13,06/14,07	2,77	102,77
		50	52,65/52,94/55,95	0,98	100,98
3	7,71	10	18,17/16,93/16,15	3,56	96,44
		50	56,78/58,41/56,15	1,04	98,96
4	1,91	10	11,98/11,22/11,57	2,69	97,31
		50	52,94/52,84/51,39	0,92	100,92
5	8,83	10	18,36/19,04/17,75	2,39	97,61
		50	58,83/58,25/57,75	0,95	99,05

#### 4.3.11. KIM-1 Biyosensörünün Yüzey Morfolojisinin AFM ve SEM Cihazları ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

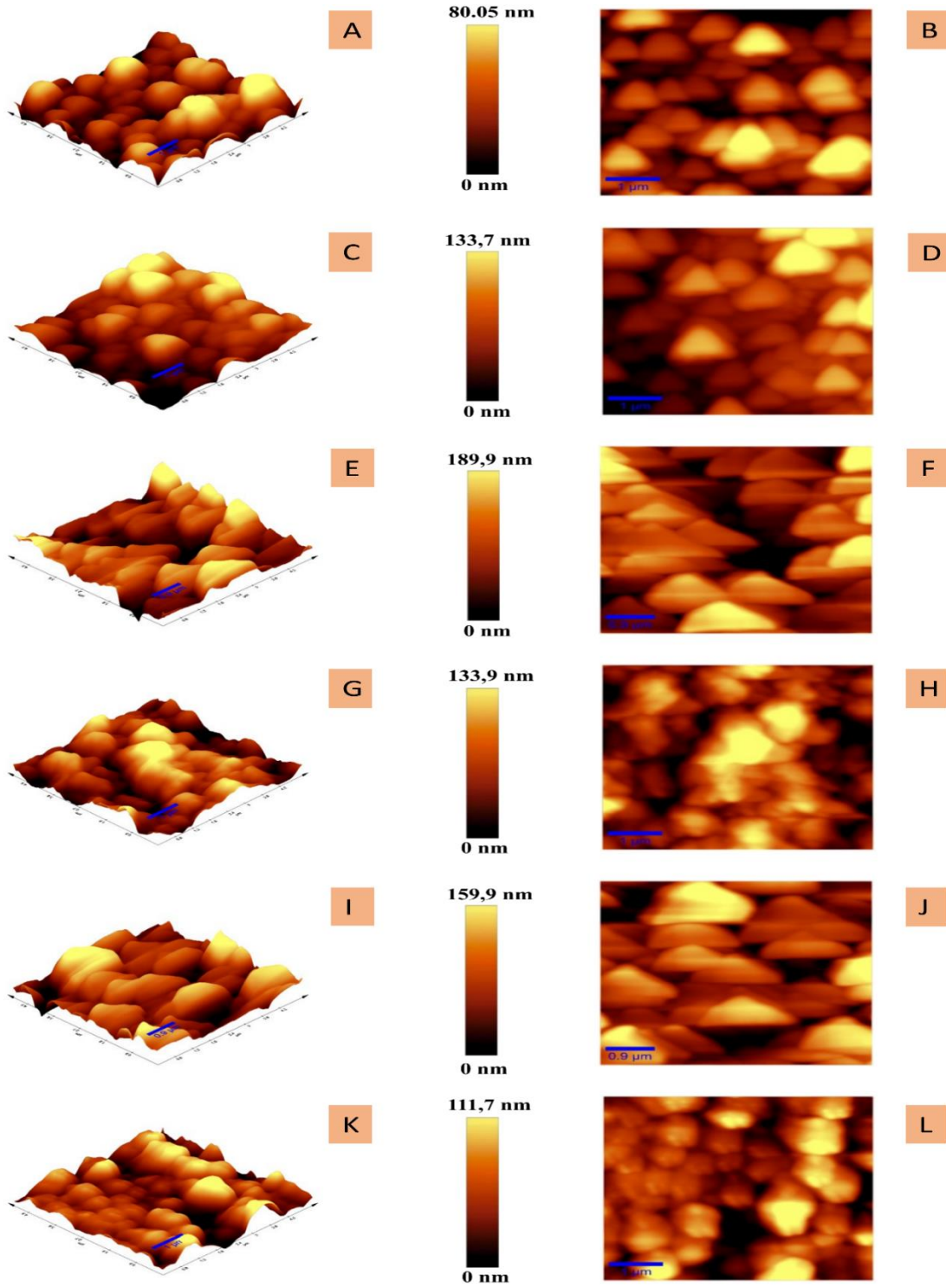
Geliştirilen KIM-1 biyosensörünün her bir immobilizasyon adımının QTF elektrodu yüzeyinde meydana getirdiği morfolojik değişimleri görebilmek için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) cihazında görüntüleri alınmıştır. Bu amaç doğrultusunda, yüzey pürüzlülük parametreleri olan pürüzlülük ortalaması (SA) ve kök ortalama kare sapması (SQ) parametreleri elde edilmiştir, her immobilizasyon aşamasından sonra üretilen biyosensörün karşılaştırılması yapılmıştır. AFM yazılımı ve AFM görüntüleri kullanılarak SA ve SQ değerleri hesaplanmıştır. Görüntülerdeki yüzey pürüzlülüğündeki kaymalarla yüzey morfolojisinde değişimlerin var olduğu sonucuna varılabilir (Akgün ve Sezgintürk, 2020).

AFM görüntüleri Şekil 22'de verilmiştir. Şekil 22A ve Şekil 22B'de, QTF elektrodunun immobilizasyon yapılmamış yüzeyi gösterilmektedir. Herhangi bir

immobilizasyon yapılmadığı ancak Au yüzey modifikasyonlu bir elektrot olduğu için elektrot yüzeyinde değişiklik oranının düşük olduğu görülmektedir. Ardından Şekil 22C ve Şekil 22D’de, 11-MUA immobilizasyonu adımı ile yüzeyin SAM tabakası oluşturulan yüzey görülmektedir. Şekil 22E ve Şekil 22F’de EDC-NHS adımı gösterilmektedir ve görüldüğü üzere 11-MUA immobilizasyonuna göre farklı morfoloji göstermiştir. Şekil 22G ve Şekil 22H’de yüzeyin Anti-KIM1 ile immobilizasyonu gösterilmektedir. Şekil 22I ve Şekil 22 J’de QTF elektrodunun BSA ile immobilizasyonu gösterilmektedir. Son olarak Şekil 22K ve Şekil 22L’de elektrot yüzeyinin KIM-1 antijeni ile immobilizasyonunun AFM görüntüleri verilmiştir ve görüldüğü gibi Anti-KIM1 antikoru ve KIM-1 antijeni arasındaki spesifik etkileşimden sonra yüzey morfolojisi değişmiştir.



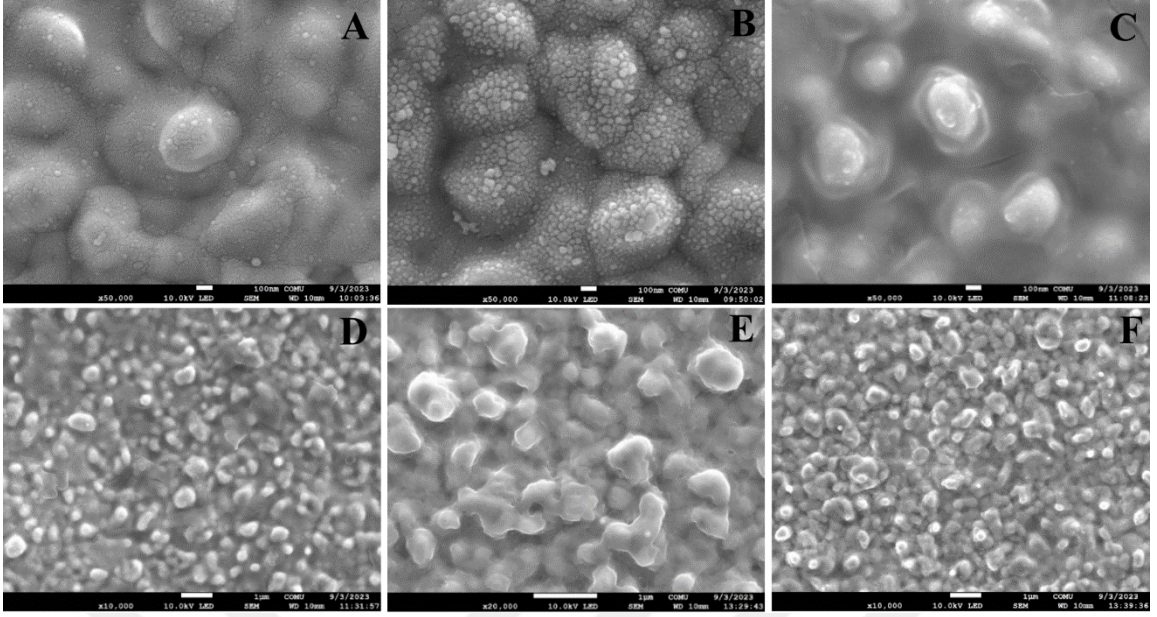




Şekil 22. Bare elektrodun AFM görüntüleri (A-B), 11-MUA immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (C-D), EDC-NHS immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (E-F), Anti-KIM1 antikoru immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (G-H), BSA immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (I-J), KIM-1 antijeni immobilize edilmiş elektrodun AFM görüntüleri (K-L)

Geliştirilen KIM-1 biyosensörünün her bir immobilizasyon adımının QTF elektrodu yüzeyinde meydana getirdiği morfolojik değişimleri görebilmek için bir diğer yöntem olan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı ile görüntüleri alınmıştır. Şekil 23A'da Bare QTF elektrodunun yüzeyi görüntülenmiştir. Şekil 23B'de 11-MUA ile immobilize edilmiş elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü, elektrot yüzeyinde 11-MUA ile SAM tabakasının oluştuğunu göstermektedir. Şekil 23C'de EDC-NHS ile immobilize edilmiş elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü gösterilmiştir. Şekil 23D'de Anti-KIM1 antikoru ile immobilize edilmiş elektrot yüzeyi incelendiğinde Anti-KIM1 antikollarının yüzeye tutunduğu görülmektedir. Şekil 23E'de bağlanma yapmamış aktif uçları bloke etmek amacıyla kullanılan BSA ile immobilize edilmiş elektrot yüzeyine ilişkin SEM görüntüsü verilmiştir. Son olarak Şekil 23F'de KIM-1 antijeni ile etkileşen elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü gösterilmiştir. Tüm şekiller incelendiğinde her bir immobilizasyon aşamasından sonra elektrot yüzeyindeki morfolojik değişim net olarak görülmektedir.

AFM ve SEM cihazları ile yapılan yüzey morfolojisinin analiz sonuçları, geliştirilen immünosensörün başarıyla üretilbildiğini ve karakterizasyon aşamalarının sonuçlarını desteklediğini göstermiştir.



Şekil 23. Bare elektrodun SEM görüntüleri (A), 11-MUA immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (B), EDC-NHS immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (C), Anti-KIM1 antikoru immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (D), BSA immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (E), KIM-1 antijeni immobilize edilmiş elektrodun SEM görüntüleri (F)

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan araştırmalar, böbrek hastalıklarının son derece ciddi ve yıkıcı etkilerinin olduğunu göstermiştir. Ciddi sonuçları olan hastalıklar için erken teşhis ise hayati önem taşır ve kaçınılmazdır. İlerleyen teknolojik gelişmeler ile bu hastalıkların tespiti için var olan karmaşık, pahalı, prosedürleri ve yanıt süresi uzun olan geleneksel yöntemlerin yerini daha hızlı ve daha ekonomik yöntemlerin alması bir ihtiyaçtır. Bu sebeple geliştirilen biyosensör sistemleri, hastalıkların erken teşhisi için avantaj sağlayan uygun sistemlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında, akut böbrek hasarının potansiyel bir biyomarkeri olan KIM-1 tespiti için yenilikçi yaklaşımlar kullanılarak, QTF elektrodu yüzeyine çeşitli modifikasyonlar yapılarak elektrokimyasal temelli bir biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan biyosensörlerin immobilizasyon aşamalarındaki her bir adım için optimizasyon çalışmaları yapıp ideal çalışma değerleri seçilmiştir. Ardından immünosensör kararlılığının ve stabilitesinin sağlanması olarak tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, SFI, rejenerasyon, seçicilik ve depo ömrü çalışmalarıyla karakterizasyon aşaması tamamlanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarını destekler nitelikte AFM ve SEM cihazları ile immünosensör yüzeyinin morfolojik değişimleri incelenmiştir. Tüm bu uygulanan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar, KIM-1 tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sisteminin kararlı ve tutarlı olduğunu göstermiştir. Tasarlanan KIM-1 immünosensörü geniş bir doğrusal tayin aralığına (0,05-250 fg/mL), düşük LOD (0,003592 fg/mL) ve LOQ (0,01197 fg/mL) değerlerine sahiptir. Aynı zamanda ayrışma sabiti (Kd) ise  $148,3 \pm 7,276$  fg/mL olarak hesaplanmıştır.

Üretilen immünosensör sistemi, gerçek idrar örneklerine uygulanmıştır. Gerçek idrar örneklerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, geliştirilen immünosensör sisteminin klinikte kullanım için yüksek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

KIM-1 tespiti için geliştirilen bu immünoensör, çalışma elektrodu olarak QTF kullanılmasıyla, pratik yöntemiyle, hızlı yanıt süresi, geniş tayin aralığı, kararlı ve tutarlı sonuçlar vermesiyle avantajlı bir biyosensör sistemi olmuştur. Bu tez çalışmasının, hem KIM-1 tayini için elektrokimyasal biyosensör çalışmaları açısından hem de QTF elektrodunun elektrokimyasal bir sistemde çalışma elektrodu olarak kullanılması açısından literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKÇA

- Abbiss, H., Maker, G. L. ve Trengove, R. D. (2019). Metabolomics approaches for the diagnosis and understanding of kidney diseases. *Metabolites*, 9(2), 34.
- Abdulbari, H. A. ve Basheer, E. A. (2017). Electrochemical biosensors: electrode development, materials, design, and fabrication. *ChemBioEng Reviews*, 4(2), 92-105.
- Akgün, M. ve Sezgintürk, M. K. (2020). A novel biosensing system based on ITO-single use electrode for highly sensitive analysis of VEGF. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4), 432-450.
- Bahadır, E. B. ve Sezgintürk, M. K. (2015). Electrochemical biosensors for hormone analyses. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 62-71.
- Boyacıoğlu, H., Yola, B. B., Karaman, C., Karaman, O., Atar, N. ve Yola, M. L. (2022). A novel electrochemical kidney injury molecule-1 (KIM-1) immunosensor based covalent organic frameworks-gold nanoparticles composite and porous NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub>@ CeO<sub>2</sub> microspheres: the monitoring of acute kidney injury. *Applied Surface Science*, 578, 152093.
- Dedeoğlu, A., Karadas, N., Unal, M. A., Kocum, I. C., Serdaroğlu, D. C. ve Ozkan, S. A. (2019). Calibration of Quartz Tuning Fork transducer by coulometry for mass sensitive sensor studies. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 834, 8-16.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. ve Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458.
- Jin, B., Wang, P., Mao, H., Hu, B., Zhang, H., Cheng, Z., Wu, Z., Bian, X., Jia, C., Jing, F., Jin, Q. ve Zhao, J. (2014). Multi-nanomaterial electrochemical biosensor based on label-free graphene for detecting cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 464-469.
- Karmakova, T. A., Sergeeva, N. S., Kanukoev, K. Y., Alekseev, B. Y. ve Kaprin, A. D. (2021). Kidney injury molecule 1 (KIM-1): a multifunctional glycoprotein and biological marker. *Современные технологии в медицине*, 13(3 (eng)), 64-78.
- Keskin, M. ve Arslan, F. (2020). Biyosensörler. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 51-60.

- Köse, S. İ. ve Maden, M. (2015). Üriner Biyobelirteçler. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci*, 6(1), 7-18.
- Kumar, D. ve Banerjee, D. (2017). Methods of albumin estimation in clinical biochemistry: Past, present, and future. *Clinica Chimica Acta*, 469, 150-160.
- Li, Z., Ju, Z. ve Frieri, M. (2013). The T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity. In *Allergy and asthma proceedings* (Vol. 34, No. 1, pp. e21-e26). OceanSide Publications, Inc.
- Liu, C., Yang, W., Min, X., Zhang, D., Fu, X., Ding, S. ve Xu, W. (2021). An enzyme-free electrochemical immunosensor based on quaternary metallic/nonmetallic PdPtBP alloy mesoporous nanoparticles/MXene and conductive CuCl<sub>2</sub> nanowires for ultrasensitive assay of kidney injury molecule-1. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 334, 129585.
- Maalouf, R., Chebib, H., Saïkali, Y., Vittori, O., Sigaud, M. ve Jaffrezic-Renault, N. (2007). Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion® and a methyl viologen modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2682-2688.
- Mohanty, S. P. ve Kougiannos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Ieee Potentials*, 25(2), 35-40.
- Mokni, M., Tlili, A., Attia, G., Khaoulani, S., Zerrouki, C., Omezzine, A., Othmane, A., Bouslama, A. ve Fourati, N. (2022). Novel sensitive immunosensor for the selective detection of Engrailed 2 urinary prostate cancer biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 217, 114678.
- Monosik, R., Stredanský, M. ve Sturdik, E. (2012). Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta chimica slovacca*, 5(1), 109.
- Moresco, R. N., Bochi, G. V., Stein, C. S., De Carvalho, J. A., Cembranel, B. M. ve Bollick, Y. S. (2018). Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clinica chimica acta*, 487, 15-21.
- Özcan, B., Demirbakan, B., Yeşiller, G. ve Sezgintürk, M. K. (2014). Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: Single frequency impedance analysis for biosensing systems. *Talanta*, 125, 7-13.

Özyurt, C., Uludağ, İ. ve Sezgintürk, M. K. (2022). An ultrasensitive and disposable electrochemical aptasensor for prostate-specific antigen (PSA) detection in real serum samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-14.

Rajendram, R., Patel, V. B. ve Preedy, V. R. (2016). Recommended Resources on Biomarkers in Kidney Disease. *Biomarkers in Kidney Disease*, 1195.

Sassolas, A., Blum, L. J. ve Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, 30(3), 489-511.

Tesch, G. H. (2010). Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective. *Nephrology*, 15(6), 609-616.

Törer, H., Aydın, E. B. ve Sezgintürk, M. K. (2018). A label-free electrochemical biosensor for direct detection of RACK 1 by using disposable, low-cost and reproducible ITO based electrode. *Analytica Chimica Acta*, 1024, 65-72.

Tüylek, Z. (2021). Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3), 468-490.

Vaidya, V. S., Ozer, J. S., Dieterle, F., Collings, F. B., Ramirez, V., Troth, S., Muniappa, N., Thudium, D., Gerhold, D., Holder, D. J., Bobadilla, N. A., Marrer, E., Perentes, E., Cordier, A., Vonderscher, J., Maurer, G., Gorerig, P. L., Sistare, F. D. ve Bonventre, J. V. (2010). Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nature biotechnology*, 28(5), 478-485.

Vaidya, V. S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N. A. ve Bonventre, J. V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(2), F517-F529.

Weiss, R. H. ve Kim, K. (2012). Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 8(1), 22-33.

Yang, H., Wang, H., Xiong, C., Chai, Y. ve Yuan, R. (2018). Highly sensitive electrochemiluminescence immunosensor based on ABEI/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system with PFO dots as enhancer for detection of kidney injury molecule-1. *Biosensors and Bioelectronics*, 116, 16-22.



Yin, Z., Liu, C., Yi, Y., Wu, H., Fu, X. ve Yan, Y. (2022). A label-free electrochemical immunosensor based on PdPtCu@ BP bilayer nanosheets for point-of-care kidney injury molecule-1 testing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 116420.

Zhou, Y., Vaidya, V. S., Brown, R. P., Zhang, J., Rosenzweig, B. A., Thompson, K. L., Miller, T. J., Bonventre, J. V. ve Goering, P. L. (2008). Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicological sciences*, 101(1), 159-170.

