



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**ANTI-SİTRULLİNLENMİŞ PROTEİN ANTİKORLARI İÇİN  
ELEKTROKİMYASAL BİYSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE  
UYGULAMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ECEM UZMAN**

**Tez Danışmanı**

**PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**ANTİ-SİTRULLİNLENMİŞ PROTEİN ANTİKORLARI İÇİN  
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE  
UYGULAMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZİ HAZIRLAYAN

ECEM UZMAN

Tez Danışmanı

PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje No: 4004

ÇANAKKALE – 2023

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na 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.

Ecem UZMAN

16/10/2023

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN, Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN , Dr. Öğr. Üyesi Canan Özyurt ve ArŐ. Gör. İnci ULUDAĞ'a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen, her konuda yardımlarını esirgemeyen dostlarım Őeyma ŐENTÜRK, Berfin VURAL, Meltem ÇALIŞKAN, BüŐra Nur YENİ, Bahar İNCE ve Mehmet KAVACIK'a, desteğiyle yanımda olan Oğuzhan HEKİMOğLU'na, hayatımın her evresinde en büyük desteği sunan değerli aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Ecem UZMAN  
anakkale, Ekim 2023

## ÖZET

# ANTI-SİTRULLİNLENMİŞ PROTEİN ANTİKORLARI İÇİN ELEKTROKİMYASAL BİYSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMASI

Ecem UZMAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

16/10/2023, 44

Romatoid Artrit (RA) eklem hasarına sebep olan kronik bir otoimmün inflamatuvar hastalıktır. Son zamanlarda Anti-sitrullinlenmiş protein antikoru (ACPA), RA teşhisi için yüksek özgüllükleri sebebiyle biyobelirteç olarak kabul edilmiştir. Bu tez kapsamında ACPA ailesinden olan RA patofizyolojisinde otoantikor olan tanımlanan mutasyona uğramış sitruline vimentin (Anti-MCV) antikoru tayini için immüno-sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hassas, pratik ve kullanım kolaylığı sebebiyle indiyum kalay oksit kaplı polietilen tereftalat (ITO-PET) elektrot üzerine 3-APTES silan ajanı kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) için kullanılmıştır. İmmobilizasyon, optimizasyon ve karakterizasyon aşamalarında elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) ölçüm teknikleri kullanılmıştır. İmmüno-sensörün güvenilirliği için gerçek ticari serum örneklerinde deneme yapılmıştır. Çalışma sonucunda tekrar üretilebilir, spesifik ve hassas bir immüno-sensör elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Romatoid Artrit (RA), Anti- sitrullinlenmiş protein antikoru (ACPA), İmmüno-sensör, ITO-PET elektrot, Mutasyona Uğramış Sitruline Vimentin (Anti-MCV) Antikoru, 3-APTES

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR ANTI-CITRULLINATED PROTEIN ANTIBODIES

Ecem UZMAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Institute of Graduate Education

Master of Science Thesis in Bioengineering

Advisor: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

16/10/2023, 44

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease that causes joint damage. Anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) have recently been recognized as biomarkers for the diagnosis of RA due to their high specificity. In this thesis, we aimed to develop an immunosensor for the detection of mutated citrullinated vimentin (Anti-MCV) antibodies, which are defined as autoantibodies in RA pathophysiology and belong to the ACPA family. For this purpose, 3-Aminopropyltriethoxysilane (3-APTES) silane agent was used for self-assembled monolayer (SAM) on indium tin oxide coated polyethylene terephthalate (ITO-PET) electrode due to its sensitivity, practicality and ease of use. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) measurement techniques were used for immobilization, optimization and characterization. Real commercial serum samples were tested for the reliability of the immunosensor. As a result, a reproducible, specific and sensitive immunosensor was obtained.

**Keywords:** Rheumatoid Arthritis (RA), Anti-citrullinated Protein Antibodies (ACPA), Immunosensor, ITO-PET electrode, Mutated Citrulline Vimentin Antibodies. (Anti-MCV), 3-APTES

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ETİK BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

1

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

6

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL YÖNTEM

9

3.1. Kimyasallar ve Aparatlar.....	9
3.2. Elektrokimyasal Ölçümler.....	9
3.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün İmmobilizasyon Aşamaları.....	10
3.4. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Optimizasyon Aşamaları .....	10
3.4.1. 3-APTES Konsantrasyon Optimizasyonu.....	11
3.4.2. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Konsantrasyon Optimizasyonu	12
3.4.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Antikor ve Antijen Süre Optimizasyonu.....	12
3.5. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamaları.....	12
3.5.1. Kramers-Kronig Dönüşümü.....	12



3.5.2. Tekrarlanabilirlik .....	12
3.5.3. Tekrar Üretilirlik .....	13
3.5.4. Depo Ömrü.....	13
3.5.5. Rejenerasyon .....	13
3.5.6. Seçicilik.....	13
3.6. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Gerçek Ticari Serum Örneklerinde Uygulaması.....	14

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. ITO-PET Elektrotların İmmobilizasyonuna İlişkin Bulgular .....	15
4.2. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	17
4.2.1. 3-APTES Konsantrasyon Optimizasyonu.....	17
4.2.2. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Konsantrasyon Optimizasyonu..	19
4.2.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Antikor Süre Optimizasyonu...	21
4.2.4. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Antijen Süre Optimizasyonu.....	22
4.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	24
4.3.1. Kramers-Kronig Dönüşümü.....	27
4.3.2. Tekrarlanabilirlik .....	28
4.3.3. Tekrar Üretilirlik .....	28
4.3.4. Depo Ömrü.....	30
4.3.5. Rejenerasyon .....	31
4.3.6. Seçicilik.....	32
4.4. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Gerçek Ticari Serum Örneklerinde Uygulaması.....	33
4.5. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün SEM ve AFM aracılığı ile Morfolojik Karakterizasyonun İncelenmesi.....	34

## BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA .....	40
----------------	----

## SİMGELER VE KISALTMALAR

RA	Romatoid Artrit
RF	Romatoid Faktör
ACPA	Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikoru
CCPA	Anti-Siklik Sitrullinlenmiş Peptit
MCV	Mutasyona Uğramış Sitrullenilmiş Vimentin
PAD	Peptidil Arginin Deiminaz
ITO-PET	İndiyum Kalay Oksit Kaplı Polietilen Tereftalat
SAM	Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka
OH	Hidroksil Grubu
NH <sub>2</sub>	Amino Grubu
3-APTES	(3-Aminopropil) Trietoksisisilan
BSA	Bovin Serum Albumin
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
CV	Döngüsel Voltametri
Ret	Yük Transfer Direnci
LOD	Tayin Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
AC	Alternatif Akım
HCl	Hidroklorik Asit
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
dk	Dk
ng/mL	Nanogram/Mililitre
mM	Milimolar
Hz	Hertz
Ag / AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
GA	Glutaraldehit
QCM	Kuvars kristal mikro terazisi
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent analizi
11-MUA	11-Merkaptoundekanoik asit
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

NHS	N-hidroksisüksinimid
IDE	Birbirine Geçmiş Elektrotlar
SERS	Yüzey Geliştirilmiş Raman Spektroskopisi
MHA	Merkaptoheksanoik Asit
CLEIA	Kemilüminesans Enzim İmmunoassay
PANI	Polianilin
MoS <sub>2</sub>	Molibden Disülfid
RSD	Bağıl Standart Sapma
%	Yüzde oranı
Δ	Değişim
MΩ	Mega ohm
M	Molar
V	Volt
mV/s	Milivolt/saniye
ABPN	Anizotropik Bimetal-Polimer Nanopartikül
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	3-APTES konsantrasyonlarının optimizasyonun grafiklerinin R <sup>2</sup> değerleri ve denklemleri	17
<b>Tablo 2</b>	Anti-MCV antikor konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R <sup>2</sup> değerleri ve denklemleri	19
<b>Tablo 3</b>	Anti-MCV antikor süre optimizasyonunun grafiklerinin R <sup>2</sup> değerleri ve denklemleri	21
<b>Tablo 4</b>	MCV süre optimizasyonunun grafiklerinin R <sup>2</sup> değerleri ve denklemleri	22
<b>Tablo 5</b>	Tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait grafiklerin R <sup>2</sup> değerleri ve denklemleri	26
<b>Tablo 6</b>	MCV immünoşensörünün gerçek ticari serum örneklerinde uygulanabilirliği	30
<b>Tablo 7</b>	MCV immünoşensörünün optimizasyon değerleri	34

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Mutasyona uğramış sitrullinlenmiş vimentinin romatoid artrit patogenezindeki olası rolü	3
Şekil 2	ITO-PET tabanlı biyosensörün immobilizasyon aşamaları	11
Şekil 3	MCV biyosensörünün immobilizasyon A) impedans spektrumları ve B) döngüsel voltamogramları	16
Şekil 4	3-APTES konsantrasyonlarının MCV immünosensörlerine etkisi (Kırmızı (-●-●-): %0,05 , Yeşil (-■-■-) : %0,2 , Mavi (-▲-▲-): %0,6 )	18
Şekil 5	Anti-MCV konsantrasyonlarının immünosensör üzerindeki etkisi (Mavi (-▲-▲-): 2 ng/mL Anti-MCV, Kırmızı (-●-●-): 5 ng/mL, Yeşil (-■-■-): 10 ng/mL)	20
Şekil 6	Anti-MCV süre optimizasyonunun immünosensör üzerindeki etkisi (Mavi (-▲-▲-): 30 dk, Kırmızı (-●-●-): 45 dk, Yeşil (-■-■-): 60 dk )	21
Şekil 7	MCV süre optimizasyonunun immünosensör üzerindeki etkisi (Mavi (-▲-▲-): 30 dk, Kırmızı (-●-●-): 45 dk, Yeşil (-■-■-): 60 dk)	23
Şekil 8	MCV immünosensörünün kalibrasyon grafiği	24
Şekil 9	Artan konsantrasyonlarda MCV tespiti A) impedans spektrumları ve B) döngüsel voltamogramları	25
Şekil 10	MCV immünosensörünün Kramers-Kronig transformu	26
Şekil 11	MCV immünosensörünün tekrar üretilebilirlik grafiği	28
Şekil 12	MCV immünosensörünün depo ömrü grafiği	29
Şekil 13	MCV immünosensörünün rejenerasyon grafiği	30
Şekil 14	MCV immünosensörünün seçicilik grafiği	32
Şekil 15	ITO-PET elektrot yüzeyindeki SEM görüntüleri: A) OH, B) OH/3-APTES, C) OH/3-APTES/GA, D) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV, E) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV /BSA, F) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA/MCV	35
Şekil 16	ITO-PET elektrot yüzeyindeki AFM görüntüleri: A) OH, B) OH/3-APTES, C) OH/3-APTES/GA, D) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV, E) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV /BSA, F) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA/MCV	37

## BİRİNCİ BÖLÜM GİRİŞ

Otoimmün hastalıklar batı ülkelerinde nüfusun %5'ini etkileyen nadir, yeterince anlaşılamayan ve fark edilemeyecek bir neden ile T hücrelerinin veya B hücrelerinin veya her ikisinin aktivasyonunun sebep olduğu bir hastalık grubudur. Otoimmün hastalıklar sistemik veya organa özgü olmak üzere ikiye ayrılabilir. Bu ayrım, hastalığın immün sistemin verdiği tepkinin otoimmüniteye sebep olması ve T veya B hücrelerinde etki yaratmasıdır. Genetik faktörler de hastalığa yatkınlıkta önemli rol oynamaktadır (Davidson vd., 2001). Otoimmün hastalıklar için nadir olduğu düşünülse de genç ve orta yaşlı kadınlar arasında yüksek prevalansa sahip ölüm nedenlerinden biridir. Bu yüzden kapsamlı incelenen hastalıklardan bir tanesidir (Cooper vd., 2003).

Romatoid artrit (RA), en yaygın kronik inflamatuvar eklem hastalığı olup ağırlıklı olarak geniş bir iskelet ve iskelet dışı belirtiler yelpazesine sahip bir kas-iskelet sistemi hastalığıdır. Bununla birlikte RA dünya nüfusunun %0,1- %2 'sini etkilediği düşünülen (Almutairi vd., 2021) ortopedik klinik uygulamada önemli bir yere sahiptir. RA'in nedeni bilinmemekle birlikte hastalığın patogenezinin anlaşılmasındaki ilerlemeler yeni terapötiklerin geliştirilmesini teşvik etmiştir. RA hastaları tedavi edilmezse veya tedavi ertelenirse kronik, eroziv artrit gelişebileceğinden, erken tanı ve uygun tedavinin başlatılması çok önemlidir. RA tedavisinde erken ve kesin tanı uygulanırsa hem hastalığın ilerlemesi durdurulabilir hem de geri dönüşmez eklem hasarı veya sakatlık önlenir ya da yavaşlaması mümkün olabilir (Lin vd., 2020).

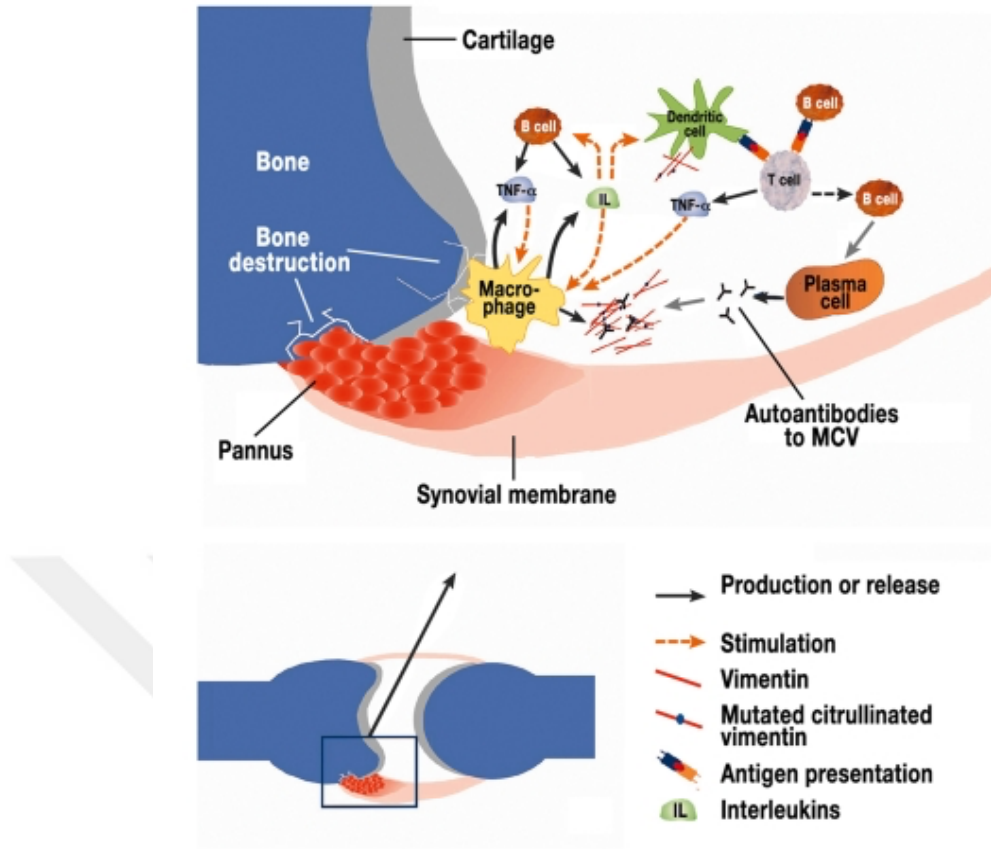
Amerikan Romatoloji Koleji ve Avrupa Romatizma Karşıtı Birliği (ACR/EULAR) tarafından 2010 RA sınıflandırma kriterleri yayımlanmıştır. Bu kriterler, RA'lı hastaları tanımlayan öykü, fizik muayene ve biyobelirteçleri içeren bir puanlama sistemidir aynı zamanda klinik semptomları içermektedir ve kriterlerin RA olarak sınıflandırılmasında duyarlılığı %84, özgüllüğü ise %60'tır. Bununla birlikte RA'nın erken safhalarında klinik semptomlar gözlenmemektedir bu yüzden erken teşhis için yeterli olmamaktadır. (Moez vd., 2013; Shapiro vd., 2021). Bununla birlikte tedavi açısından da farklı zorlukları bulunan RA için erken teşhis son derece önemli olmuştur. Bütün bu sebeplerden dolayı, hastalığa spesifik, erken teşhis için önemli bir biyobelirtece ihtiyaç duyulmuştur. RA tanısında iki önemli biyobelirteç literatürde yerini almıştır. Bunlar; Romatoid Faktör (RF) ve Anti-

sitrullinlenmiş Protein Antikoru (ACPA)'dur. ACPA, sitrulin, argininin peptidil arginin deiminaz (PAD) enzimleriyle ayrıştırılmasından ortaya çıkan RA için çok spesifik (%94-99) (Steendam vd., 2011) bir otoantikordur. RA'lı hastalarda sitruline fibrin ve vimentin de dahil olmak üzere diğer bazı sitrulin içeren proteinlere karşı antikolar tespit edilmiştir. Bu sayede Sitrulin RA'ya özgü otoantikolar için otoantijenlerin temel bir bileşeni olduğu düşünülmektedir (Soós vd., 2007). Fibrin, vimentin, alfa enolaz ve kolajen otoantikor testi için ELISA'larda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ışığında ACPA'lar için bu hastalığı daha erken öngörebildiği ve RF'den daha spesifik olduğu ortaya çıkmıştır (Blüml vd., 2020).

ACPA mevcudiyeti, sitokin aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu durumda hastaların organ ve dokularında iltihaplanma, ağrı ve eklemlerin düzgün çalışmasını engellemesi gibi RA semptomları görülmektedir. Böylece ACPA, semptomlar açısından da hastalığın teşhisi açısından da erken ve fark edilebilir ölçüde değişikliklere neden olmaktadır. RA'nın erken teşhisi için ACPA son derece uygundur (Iyengar vd., 2022).

Bir çalışmada sitruline peptidler ve bireyselleştirilmiş bir anti-sitruline protein antikorumun (ACPA) RA başlangıcında ve sürecinde etkili olabilecek sitruline proteinleri tanımlamışlardır. Bu çalışma sonucunda ACPA'lar klusterin ve vimentine çapraz reaktivite göstermiştir ve RA'nın erken tanısında bu iki proteinin önemi ortaya konmuştur (Yoshizawa vd., 2021).

ACPA, enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA) veya diğer immünoanalizler kullanılarak tespit edilebilir. Test, RA teşhisine ve hastalık aktivitesinin izlenmesine yardımcı olmak için genellikle RF ve görüntüleme çalışmaları gibi diğer testlerle birlikte yapılır. ACPA için genellikle anti-CCP2 testi kullanılmaktadır. Bu test Anti-CCP2 için %95, RF için %85 özgüllük ve duyarlılık göstermektedir RF'ye göre (anti-CCP2 %67, RF için %69) daha iyi teşhis performansına sahiptir. 2006'da ELISA tabanlı MCV testi geliştirilmiştir. Anti-MCV (anti-MCV 70–82 %, 58–72 % anti-CCP) anti-CCP'den daha spesifik değildir ama karşılaştırılabilir fakat özgüllüğü kanıtlanmıştır (Svärd vd., 2011).



Şekil 1. Mutasyona uğramış sitrullinlenmiş vimentinin romatoid artrit patogenezindeki olası rolü (Egerer vd., 2009)

RA için spesifikliği kanıtlanmış olan sitruline vimentin, RA tanısı için kriter olarak tanımlanmıştır. Sitrulinasyona uğrayan vimentin RA sinoviyal mikroçevresinde bulunmaktadır. Bu yüzden RA için uygun bir otoantikor kabul edilmiştir (Bartoloni vd., 2012).

Biyotanıma (antijen-antikor, DNA-DNA, enzim-substrat, reseptör-ligand vb.) yanıtlarını fizikokimyasal sinyallere dönüştüren cihaza biyosensör adı verilir. Antikor-antijen etkileşimine dayanan biyosensörler immünosensörler olarak adlandırılır. İmmünosensörlerin yanında antijen antikor etkileşimine dayanan immünolojik testler de vardır. Bu testlere örnek olarak klinikte sıkça kullanılan ticari ELISA örnek verilebilir. ELISA’da öncelikle antijen kite tutturulur ve sonra spesifik birincil antikor ile bağlanma gerçekleşir. Daha sonra optik olarak okunabilir etiketli olan ikincil antikor eklenir ve renk değişikliği sayesinde optik sinyal elde edilir. Fakat bu testlerin renk yüzünden oluşan yanlış



sinyaller, uzun bir analiz süresi, fazlaca gereken analit hacmi gibi dezavantajlarına karşın immünosensörlerin pratik oluşu, mikro düzeyde analit kullanımı, düşük maliyet, kullanım kolaylığı, taşınabilirlik, fabrikasyon basitliği, yüksek tayin aralığı, yüksek hassasiyetleri ve seçicilikleri gibi avantajlara sahip olup, analit etkileşimlerini transdüser yardımıyla ölçülebilir bir sinyale dönüştürebilirler (Mollarasouli vd., 2019).

Biyosensörler kullanılan dönüştürücüye göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar optik, elektrokimyasal, mekanik veya manyetik olabilmektedir. Elektrokimyasal immünosensörler analitin saptanması için ölçülebilir bir akım (amperometri), yük birikimi veya potansiyel (potansiyometri) veya iletkenlikte değişiklik (kondüktometri/impedimetri) üretir (Kim vd., 2021).

Biyosensörün tasarlanmasında impedimetrik ve döngüsel voltametrik yöntemlerden yararlanılacaktır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), gerçek ( $Z$  gerçek) ve hayali ( $Z$  imag) olarak temsil edilen bir elektrokimyasal hücreye belirli frekansta AC voltaj uygulayarak malzemedeki direnci ve kapasitansını ölçer. Biyokimyasal bir reaksiyonu yüksek frekanstaki elektron transferini ölçerek stimüle edebilir. Voltametrik ölçümlerde ise elektrot yüzeyi potansiyeli belirli bir potansiyel aralıkta taranır (Zhang vd., 2017).

Tasarlanan biyosensör antikor-antijen etkileşimine dayandığı için ve ölçüm tekniği olarak EIS kullanıldığı için impedimetrik immünosensördür. Çalışma elektrotu olarak ise ITO-PET elektrot tercih edilmiştir.

ITO-PET elektrot, SAM, elektrokimyasal biriktirme, elektroforetik biriktirme, adsorpsiyon ve polimerizasyon gibi birçok immobilizasyona imkân sağlayan, elektriksel iletkenliğe ve optik şeffaflığa sahip, düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı sağlaması açısından çalışma elektrodu olarak elektrokimyasal biyosensörlerde çok fazla kullanılan malzemelerdendir (Çalışkan vd., 2022; Demirbakan vd., 2019; İnce vd., 2021; Özcan, 2023; Uludağ vd., 2022; Vural vd., 2020).

Bu tez kapsamında, Romatoid Artrit 'in önemli bir biyobelirteci olarak literatürde yerini almış olan Anti-sitrullinlenmiş protein antikoları için hassas, spesifik, ekonomik ve pratik analizine imkân sağlayan, tek kullanımlık ITO-PET tabanlı elektrokimyasal biyoalgılama sistemi geliştirilmesi hedeflenmektedir.



## İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatür taramasında genellikle Anti-CCP tayini yapan (ACPA'nın yerini Anti-CCP almıştır) immunosensörler geliştirilmiştir. Anti-MCV ile ilgili immünosensör olmadığı düşünülmektedir. Fakat Anti-MCV, Anti-CCP ile karşılaştırıldığında alternatif bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Zhu vd., 2019).

Schellekens ve arkadaşları; sitrulin içeren peptiti ELISA'nın (enzime bağlı immünosorbent testi) duyarlılığını artırmak için, antikorların daha iyi tanıdığı bir sitrullinlenmiş epitop elde etmek için modifiye etmişlerdir yani peptitleri siklik hale getirmişlerdir (Venrooij vd., 2011).

RA tespiti için tasarlanan çoğu biyosensör peptit bazlı hazırlanmaktadır. Peptitlerin tercih edilmesinde kimyasal olarak çok yönlü olmaları, antikorlara ve enzimlere kıyasla denatürasyona daha dayanıklı olmaları etkili olmuştur.

Lin ve arkadaşları, altın nanoyapıya sahip bir yüzey üzerine empedans temelli elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, peptit immobilizasyonu sağlamak amacıyla altın yüzeye SAM için 11-MUA silan ajanı kullanılmıştır. Daha sonra peptiti bağlamak için çapraz bağlayıcı EDC-NHS kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensörün yüksek hassasiyet ve özgülük gösterdiği rapor edilmiştir (Lin vd., 2022).

Guerrero ve arkadaşları, biyobelirteç olarak kullanılan romatoid faktör (RF) ve anti-siklik sitrullinlenmiş peptit (CCPA) antikorlarının tayini için ekran baskılı karbon elektrot tabanlı karboksilatlı veya nötravidin işlevli manyetik mikro boncuklar içeren ikili elektrokimyasal biyosensör tasarlamışlardır. Ölçüm tekniği olarak amperometri kullanılmıştır. Dual biyosensör, sırasıyla 0,8 IU/mL ve 2,5 IU/mL LOD değerleri ile RF ve CCPA için yüksek hassasiyet sergiler (Guerrero vd., 2020).

Thanh ve arkadaşları, ACPA tespiti için altın nanopartikül ile zenginleştirilmiş birbirine geçmiş elektrotlar (interdigitated) elektrot kullanılarak empedans temelli biyosensörleri tasarlamışlardır. Minyatürleşme kolaylığı, etiketsiz ölçüm ve düşük maliyet

gibi avantajları sayesinde hasta başı uygulamaları için IDE platformu kullanmışlardır. Biyosensörün LOD değeri 0,12 ng/mL'dir (Vu vd., 2020).

SERS, ultra yüksek hassasiyeti, dar bant genişliği nedeniyle biyotanıma elemanlarının tespiti açısından ilgi çekici hale gelmiştir. Bu çalışmada; Hwang ve arkadaşları RA biyobelirteç saptamasının SERS tabanlı çoğullaması için farklı bimetalik ve polimerik bölmelerden oluşan anizotropik bimetal-polimer nanopartiküllerin (ABPN'ler) kontrollü kendi kendine montajını rapor etmişlerdir. Tasarlanan biyosensörün ticari ELISA kitine göre yeterince hassas olduğu ve biyobelirteç konsantrasyonu ile SERS yanıtı arasında mantıklı bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Anti-CCP ve RF IgM'nin tespiti için LOD değerleri sırasıyla 0,034 IU/mL ve 0,072 IU/mL'dir (Hwang vd., 2021).

Chinnadayala ve arkadaşları anti-siklik sitriline peptit/protein antikorları saptanması için birbirine geçmiş zincir şeklinde bir mikroelektrot dizisi üretmiştir. Antikorların immobilizasyonu için merkaptohexanoik asit (MHA) kullanmışlardır. SAM tamamlamak için güçlü biotin-avidin etkileşiminden yararlanmışlardır. Elektrot yüzeyinde oluşan SAM'in yarattığı Ret ölçümüne dayanan empedans temelli bir biyosensör geliştirmişlerdir. Tayin aralığı 1 IU/mL- 800 IU/mL ve LOD değeri 60 mIU/mL dir (Chinnadayala vd., 2020).

Tanaka ve arkadaşları anti-CCP antikorlarının belirlenmesi için kemilüminesans enzim immün test (CLEIA) ile ELISA testini karşılaştırmışlardır. Çalışmada, kemilüminesans temelli testin ELISA'nın tespit edilebilir aralığından on kat fazla bir tayin aralığı olduğunu göstermişlerdir. Bu iki teknik, duyarlılık ve özgüllük olarak karşılaştırıldığında da RA tespitinde aralarında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Süre açısından da CLEIA'nın ELISA'dan çok daha pratik olduğu ortaya konmuştur (Tanaka vd., 2010).

Selvam ve arkadaşları, SPE üzerine karbon bazlı mikro hacim kullanılan MoS<sub>2</sub> mürekkebiyle zenginleştirilmiş daha sonra PANI tabakası elektrokaplama ile tasarlanmış bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Anti-CCP'nin immobilizasyonu EDC-NHS kimyası ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan immünosensörle aCCp (antijen tespiti PBS'te gerçekleştirilmiştir ve LOD değeri 0,16 IU/mL olarak elde edilmiştir. İnsan serumunda

aCCP'yi diğer serum proteinlerinden ayırt ederek mükemmel seçicilik göstermiştir (Selvam vd., 2021).

Drouvalakis ve arkadaşları RA'ya özgü (siklik sitrulin içeren) bir peptit tahlili için, bir kuvars kristali mikro balans (QCM) temelli işlevselleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüp kullanmışlardır. İmmüno sensörün hassasiyeti 34,4 ve 37 fM olarak saptanmıştır. Hassasiyet, ELISA'dan ve mevcut mikrodizi tayin sistemlerinden daha yüksektir (Drouvalakis vd., 2008).

Ramos ve arkadaşları anti-siklik sitruline peptit (anti-CCP) tespiti için mikro cihaz immüno testi geliştirmişlerdir. İmmüno sensör tasarlanırken düz kanallı bir mikro cihaz ve CCP ile konjuge edilmiş manyetik nanopartiküller kullanılmıştır. Kısa bir tespit süresi ve düşük LOD değeri (0,70 U/mL) elde edilmiştir. Geliştirilen mikro cihaz ticari bir ELISA kitinden 9 kat daha hızlı, 16 kat daha hassastır ve analit hacmi olarak sadece 6 µL kullanılmıştır (Ramos vd., 2021).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL YÖNTEM

### 3.1. Kimyasallar ve Aparatlar

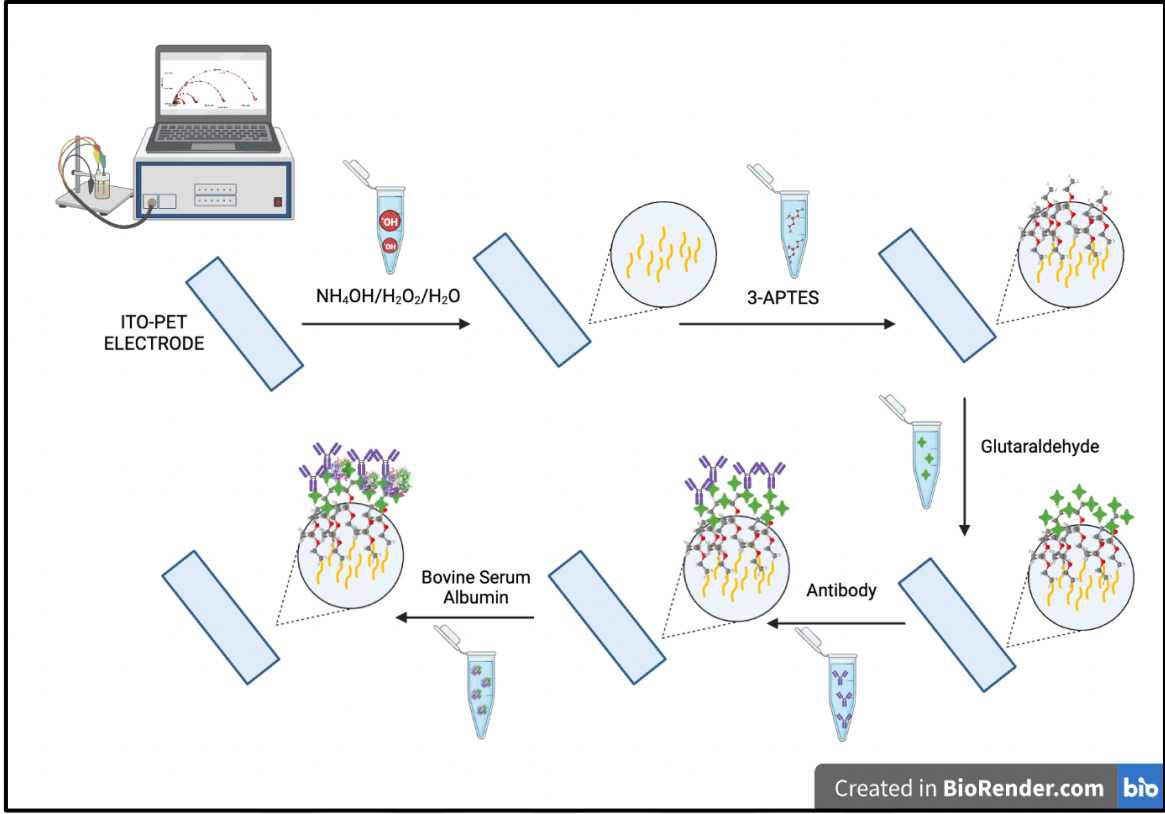
Elektrokimyasal ölçümler için çalışma elektrodu olarak kullanılan ITO-PET filmler (2mm x 20mm) ve bütün kimyasallar Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. Üçlü elektrot sisteminde 3M Ag / AgCl referans elektrot ve karşıt elektrot olarak platin tel iBAS, Warwickshire, UK'den satın alınmıştır. Tespit edilen Anti-sitrullinlenmiş vimentin antikorları Sigma Aldrich'ten (ABD)' den satın alınmıştır ve pH 7.2 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Sitrullinlenmiş vimentin (CV) antijenleri ise Tris-HCl pH 8.0 tamponu ile hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanması için kullanılan saf su (18,2MΩ / cm) Elga Pure Lab Flex sisteminden elde edilmiştir. Ölçümlerin gerçekleşmesi için kullanılan redoks probu 0.1 M KCl içeren 5 mM K<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] (1:1) 50mM PBS çözeltisi (pH 7.0) olarak hazırlanmıştır. Tasarlanan biyosensör için tüm ölçümler Döngüsel Voltametri ve Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında alınmıştır. Tasarlanan biyosensör sisteminin 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

Tasarlanan biyosensörün SAM için yapılan tüm immobilizasyon aşamalarında elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) tekniklerinden yararlanılmıştır. CV için -0,5 -1V potansiyel aralık (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) olarak belirlenmiştir, redoks probu olarak 5 mM K<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] (1:1) kullanılmıştır. EIS tekniği için kullanılan ölçümlerde ise alternatif akım olarak 10 mV seçilmiştir ve aynı redoks çifti ile gerçekleştirilmiştir. İmpedans spektrumlarının bulunduğu frekans aralığı ise 50.000- 0.05 Hz tir.

### 3.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Tayini için Biyosensör İmmobilizasyon Aşamaları

Kullanılan ITO-PET çalışma elektroduna temizlik prosedürü uygulanmıştır. Bu prosedür 10'ar dk aseton, sabun çözeltisi ve ultra saf suda elektrotların ultrasonik banyoda temizlenmesini içermektedir. Daha sonra yüzeyde SAM için 90 dk  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve ultra saf su (1:1:5) ile hazırlanan çözeltide elektrotlar inkübe edilmektedir. Uygulanan bu adımda yüzeyde OH uçları aktifleştirilmiştir. Silanizasyon işlemi için ise elektrotlar %0,05'lik 3-APTES çözeltisinde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. 3-APTES silan ajanı biyosensör çalışmalarında silan bazlı işlevselleştirme işlemlerinde, 3-APTES'in hızla etkileşime girebilme ve kovalent bağ oluşturabilme yeteneği gibi avantajlarıyla sıkça kullanılmaktadır. 3-APTES'in yapısında, üç tane fonksiyonel reaktif etoksi grubu ve silan molekülü başına bir amin grubu vardır. Silanizasyon işlemi için yüzeyde oluşturulan OH gruplarına, 3-APTES etoksi uçlarından bağlanır. (Sypabekova vd., 2022) Daha sonra antikor, bir çapraz bağlayıcı yardımıyla amin grubuna bağlanır. Antikoru silanla immobilize edilmiş yüzeye kovalent bağlanması için çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit (GA) tercih edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak %2,5'luk GA çözeltisi kullanılmıştır ve elektrotlar 15 dk süreyle inkübe edilmiştir. GA, iki aldehit grubu içermesi nedeniyle yüksek reaktiviteye ve hızlı etkileşime girme yeteneğine sahiptir, 3-APTES silan ajanının amin grubu ve proteinin Fab bölgesindeki amin grupları ile etkileşime girerek çapraz bağlayıcı görevi görür (Çalışkan vd., 2022). Antikor immobilizasyonu için uygun yüzey oluşturulduktan sonra elektrotlar 45 dk boyunca 5 ng/mL antikor çözeltisi ile muamele edilmiştir. Elektrot yüzeyinde antikorla etkileşemeyen GA'nın açıkta kalan uçlarını kapatmak için %0,5'lik BSA çözeltisinde elektrotlar 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her aşamadan sonra elektrotlar dikkatlice ultra saf su ile yıkanmıştır ve oda sıcaklığında argon gazı ile kurutulmuştur. Elektrotlar MCV tayini yapılıncaya kadar +4 °C 'de bekletilmiştir.



Şekil 2. ITO-PET tabanlı biyosensörün immobilizasyon aşamaları

### 3.4. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Optimizasyon Aşamaları

Optimizasyon aşaması, tasarlanan biyosensörün hassasiyeti ve tekrar üretilebilirliği için önemlidir. Bu sebeple biyosensörün 3-APTES, Anti-sitrullinlenmiş protein antikor ve Anti-sitrullinlenmiş protein konsantrasyonları ve süreleri optimize edilmiştir.

#### 3.4.1. 3-APTES Konsantrasyon Optimizasyonu

Silanizasyon için kullanılan 3-APTES silan ajanının konsantrasyonu antikorun immobilizasyonunun verimli olabilmesi ve stabil bir yüzey elde edebilmek için son derece önemlidir. İlk olarak silan ajanı olarak kullanılan 3-APTES'in biyosensörün yanıtı üzerindeki etkisini belirlemek için üç farklı konsantrasyonda (%0,05, %0,2, %0,6) muamele edilmiştir ve lineer grafik oluşturulup optimum değer seçilmiştir.



### **3.4.2. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Konsantrasyon Optimizasyonu**

Antikor konsantrasyonu da üç farklı konsantrasyonda (2 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL) denenmiştir ve artan konsantrasyonlarda biyosensörün empedans ölçüm yanıtlarına bakarak en uygun konsantrasyon belirlenmiştir.

### **3.4.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Antikor ve Antijen Süre Optimizasyonu**

Hem Anti-sitrullinlenmiş protein antikor hem de Anti-sitrullinlenmiş protein 3 farklı sürede (30dk ,45 dk,60 dk) inkübasyona bırakılmıştır ve optimum süreler belirlenmiştir.

## **3.5. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamaları**

Tasarlanan biyosensörün tayin aralığını belirlemek için optimum değerler ile Anti-sitrullinlenmiş protein farklı konsantrasyonlarda muamele edilmiştir ve EIS, CV ölçümleri alınmıştır. Her biyosensörün antikor-antijen etkileşimi sonucu yüzeyde oluşan yük transfer direnç farkı eşdeğer devre modeline bağlı olarak hesaplanmıştır ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

### **3.5.1. Kramers-Kronig Dönüşümü**

Empedans ölçümlerinde, Kramers-Kronig ilişkileri, cihazın karmaşık empedansının gerçek ve sanal kısımlarını bir frekans aralığında ilişkilendirmek için kullanılmaktadır. Empedans ölçümlerinin dış etkenlerden etkilenip etkilenmediğini kontrol etmek için Kramers-Kronig dönüşümünden faydalanılmıştır. Bu adım biyosensörün kararlılığı ve doğruluğu için gereklidir. (Özcan vd., 2022)

### **3.5.2. Tekrarlanabilirlik**

Biyosensörün güvenilirliğini kanıtlamak amacıyla tekrarlanabilirlik çalışması yapılmaktadır. Bu çalışmada optimum değerlerle hazırlanan 20 farklı elektrot seçilen Anti-sitrullinlenmiş vimentin konsantrasyonu ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra biyosensörün verdiği Ret farkı yanıtlarından yararlanılarak standart sapma, ortalama değer ve varyasyon katsayısı elde edilmiştir.

### **3.5.3. Tekrar Üretilirlik**

Biyosensör için önemli olan bir diğer aşama ise biyosensörün tekrar üretilebilir olmasıdır. Bu sebeple aynı koşullarda, farklı kişiler tarafından ve farklı zamanlarda 10 farklı biyosensör hazırlanmıştır. Oluşturulan lineer grafikler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen grafikler sayesinde bağıl standart sapma (%RSD) değeri hesaplanmıştır.

### **3.5.4. Depo Ömrü**

Biyosensörün klinik uygulamalara uyumluluğunun test edilmesi için depo ömrü önemli bir parametredir. Belirli aralıklarla ölçüm alınmak üzere aynı zamanda optimum koşullarda elektrotlar hazırlanmıştır ve belirlenen antijen konsantrasyonunda ölçüm yapılan kadar +4°C' de saklanmıştır.

### **3.5.5. Rejenerasyon**

Diğer bir karakterizasyon çalışması ise rejenerasyon çalışmasıdır. Bu çalışmada kullanılan çalışma elektrodu tek kullanımlık olmasına rağmen antikör-antijen arasındaki oluşan kuvvetli etkileşimi seyreltik bir asit yardımıyla bozundurup, tekrar antijen ile inkübe edildiğinde bağlanma verimi gözlemlenmektedir.

### **3.5.6. Seçicilik**

İdeal bir biyosensör için biyosensörün kendi antijenine seçici olması ve başka bir analitle etkileşime girmemesi gerekir. Tasarlanan biyosensörün kendi antijenine seçici olup olmadığını ve başka bir analit olduğunda girişim yapabilme kapasitesi gözlemlenmiştir. Bu çalışma için 7 farklı elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrotlar farklı analitler oluşan bir karışım, antijen dahil bir karışım ve diğer analitlerden oluşan çözeltilerde inkübe edilmiştir.

### **3.6. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Gerçek Ticari Serum Örneklerinde Uygulaması**

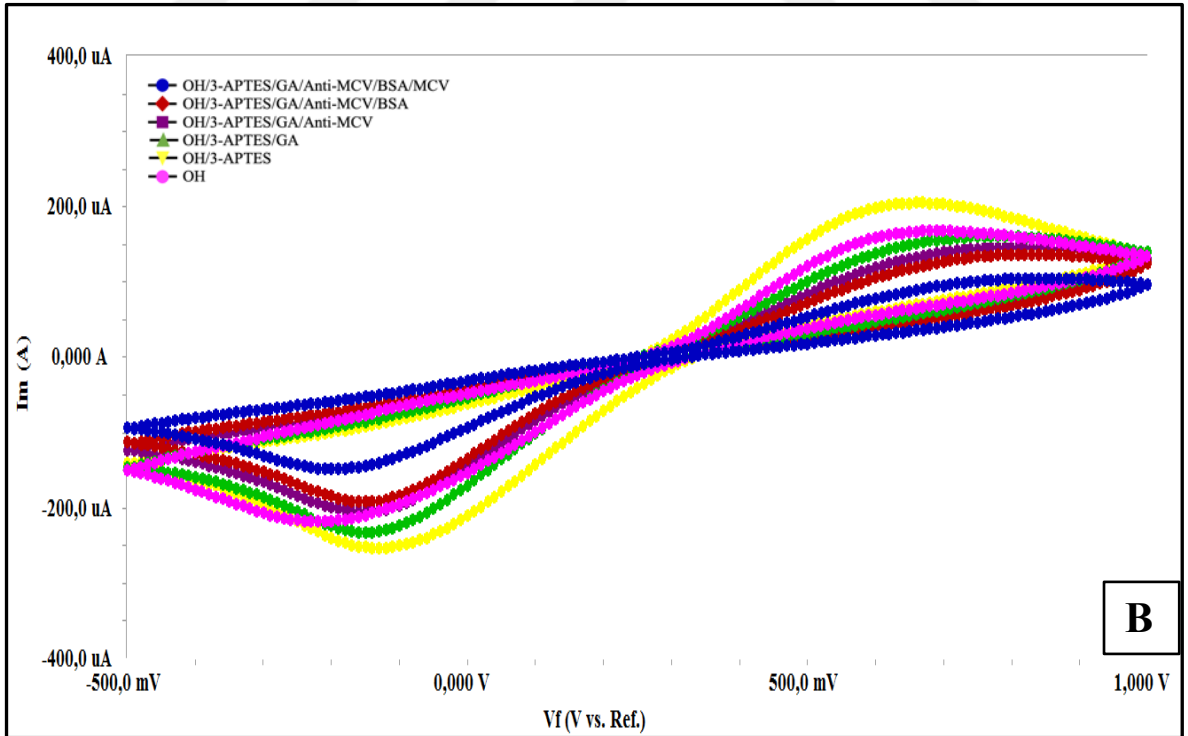
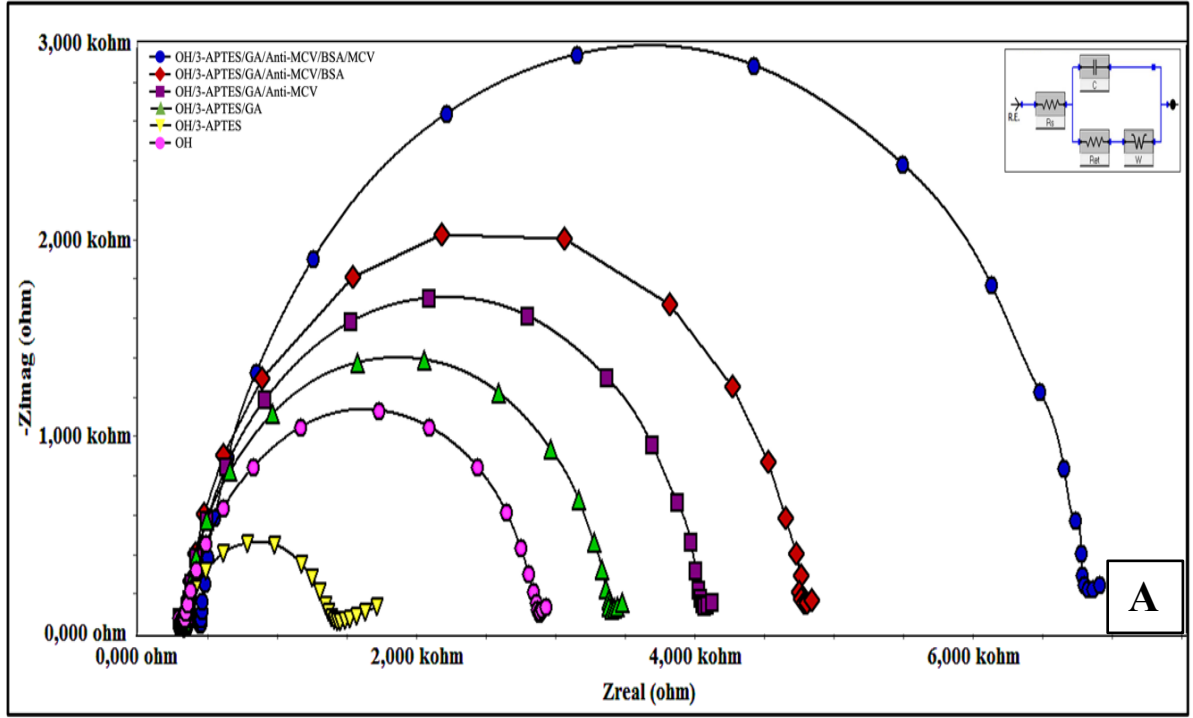
Biyosensörün klinik uygulamalarda kullanılabilirliği açısından gerçek serum örneklerinde denenmesi gereklidir. Biyosensörün gerçek serum örneklerine verdiği yanıtı değerlendirmek için 5 farklı yetişkin serumunda çalışılmıştır.



## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. ITO-PET Elektrotların İmmobilizasyonuna İlişkin Bulgular

ITO-PET elektrot tabanlı sitrullenmiş vimentin tayini için tasarlanan biyosensörün immobilizasyonuna ilişkin EIS spektrumları ve CV voltamogramları incelenmiştir. Temizlik prosedürü uygulanmış çıplak elektrotların yüzeyi ölçümler sonucu elde edilen impedans değerleri ile kontrol edilmiştir. Tasarlanan biyosensörün EIS spektrumları ve CV voltamogramları Şekil 3'te gösterilmiştir. Yüzeyde hidroksil grubu oluşumu için hazırlanan karışımda inkübe edilmiş elektrotların EIS ve CV ölçümü alınmıştır. Hidroksil grubunun yüzeyde aktifleşmesiyle empedans ölçümünde elektrotlar çıplak elektrota göre daha iletken bir tavır sergilemiştir. Silanizasyon için elektrot yüzeyinde hazır hale gelen elektrotlar gece boyu (16 saat) %0,05'lik 3-APTES çözeltisinde inkübe edilmiştir. OH uçları ile silan ajanının etoksi grubuyla etkileşimi ile güçlü kovalent bağ oluşturulmuştur. Silanlama immobilizasyonundan sonra impedans ölçümü alınan elektrotun direnci düşmüştür çünkü 3-APTES silan ajanının sulu çözeltide protonlanmış (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) amino grubu, redoks probunun negatif yükünü çekmiştir bu yüzden Nyquist diyagramının yarıçapı azalmıştır ve elektron transferi daha kolay gerçekleştiği için iletkenlik artmıştır. Daha sonra çapraz bağlayıcı GA %1'lik çözeltisi kullanılmıştır ve impedans ölçümleri alınmıştır. GA'nın sahip olduğu aldehit gruplarının amino grubu ile kovalent bağ oluşturması elektrot yüzeyindeki pozitif yüklü amino gruplarını uzaklaştırmıştır bu yüzden impedans ölçümünde yarıçap artmıştır. Antikor immobilizasyonu gerçekleştikten sonra alınan ölçümde yük transfer direncinin artması da yüzeyin daha yalıtkan hale gelmesi ve direncin artmasıyla açıklanabilir. GA'nın açıkta kalan uçlarının spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek amacıyla %0,5'lik BSA kullanılmıştır ve impedans ölçümü alınmıştır. BSA immobilizasyonu ile yüzey daha yalıtkan hale gelmiştir ve direnç daha da artmıştır. BSA aşamasından sonra tayin aralığı belirlenen immünosensörler farklı antijen konsantrasyonlarında inkübe edilmiştir. Şekil 3'de farklı konsantrasyonlarda EIS ve CV ölçümü alınan elektrotların yanıtları gösterilmiştir. İmpedans ölçümlerinde antijen konsantrasyonu arttıkça yarıçap artmıştır ve daha yalıtkan bir tabaka oluşmuştur.



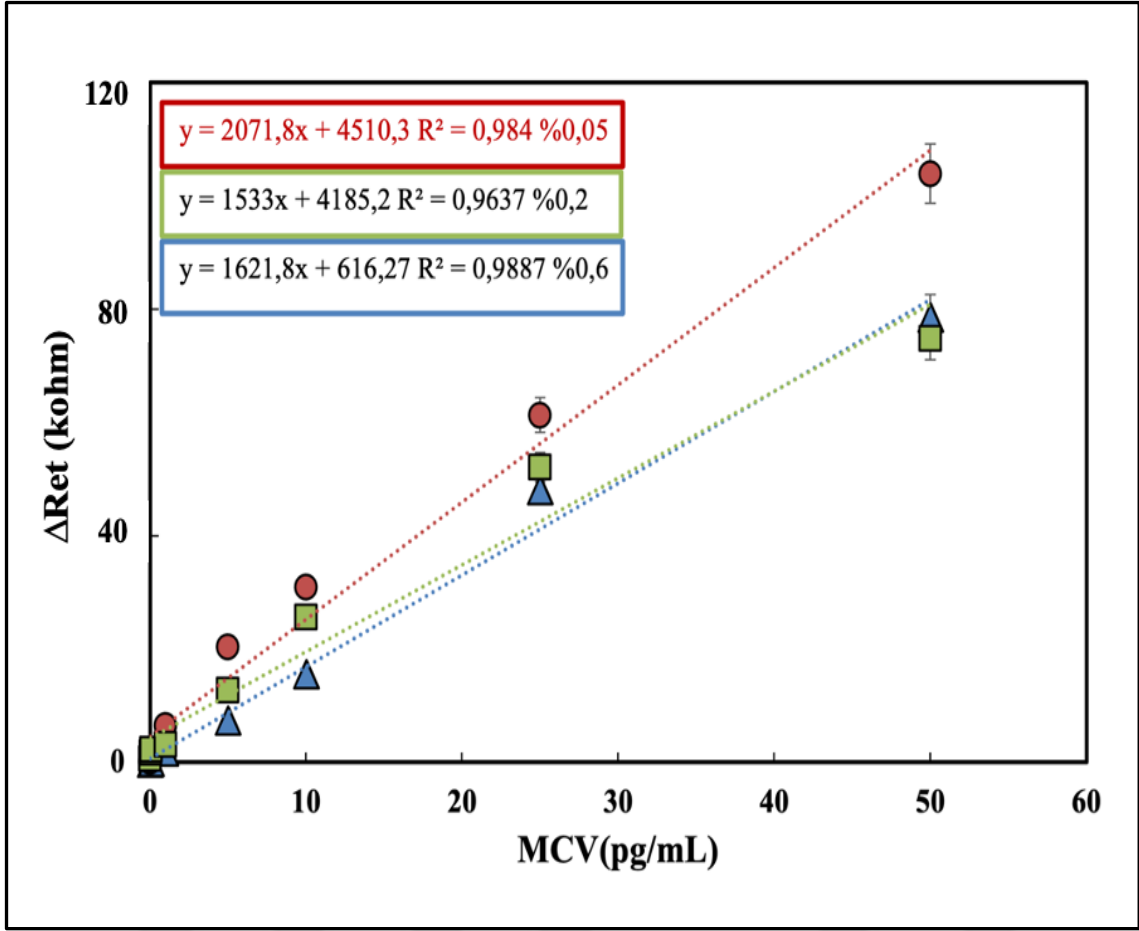
Şekil 3. Anti-MCV biyosensörünün immobilizasyon A) impedans spektrumları ve B) döngüsel voltamogramları

## **4.2. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular**

Optimizasyon çalışmaları için yapılan EIS ölçümlerinden yararlanılarak her parametrenin kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. İmpedans sinyallerine göre Ret farkı en yüksek olan değerler,  $R^2$  değerleri de göz önünde bulundurularak optimum değer olarak seçilmiştir.

### **4.2.1. 3-APTES Konsantrasyon Optimizasyonu**

Tasarlanan immünosensörün immobilizasyon aşamalarından ilki olan 3-APTES silan ajanı için konsantrasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. 3-APTES silan ajanının konsantrasyonu, antikorun etkin immobilizasyonunu sağlamak ve stabil bir yüzey elde etmek için son derece önemlidir. Üç farklı konsantrasyonda (%0,05, %0,2, %0,6) 3-APTES çözeltisinin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensör sistemlerinde alınan impedans ölçümlerinden elde edilen  $\Delta Ret$  değerlerini karşılaştırmak için kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3). Grafikler incelendiğinde; 3-APTES çözeltisinin konsantrasyonu artmasıyla hazırlanan immünosensörlerin düşük  $\Delta Ret$  değerleri gösterdiği gözlemlenmiştir. %0,05'lik 3-APTES konsantrasyonu ile hazırlanan immünosensör denenen diğer iki (%0,2 ve %0,6) konsantrasyona kıyasla yüksek sinyaller göstererek optimum değer olarak seçilmiştir. Artan silan konsantrasyonu ile  $\Delta Ret$  değerlerinde görülen düşüş, silan ajanının yoğunluğunun artması silan tabakasının düzenli oluşması için uygun olmadığını düşündürmektedir.



Şekil 4. 3-APTES konsantrasyonlarının MCV immünosensörlerine etkisi (Kırmızı (-●-●-): %0,05 , Yeşil (-■-■-): %0,2 , Mavi (-▲-▲-): %0,6 )

Tablo 1

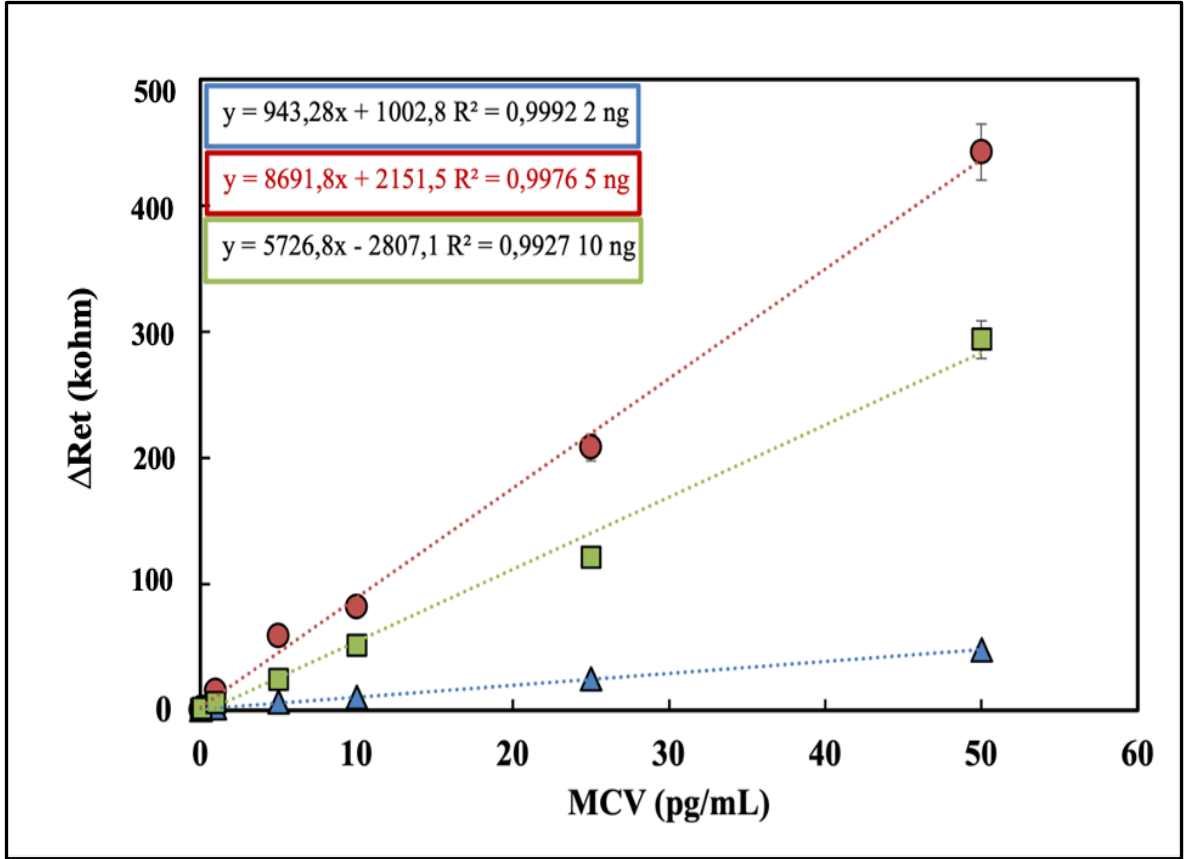
3-APTES Konsantrasyonlarının Optimizasyonun Grafiklerinin R<sup>2</sup> leri ve Denklemleri

3-APTES Konsantrasyon Optimizasyonu	R <sup>2</sup>	Denklem
%0,05	0,984	$y = 2071,8x + 4510,3$
%0,2	0,9637	$y = 1533x + 4185,2$
%0,6	0,9987	$y = 1621,8x + 616,27$

#### 4.2.2. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Konsantrasyon Optimizasyonu

Verimli bir SAM için optimize edilmesi gereken parametrelerden biri de antikor konsantrasyonudur. Antikor konsantrasyon optimizasyonu için 2 ng/mL, 5ng/mL ve 10 ng/mL olmak üzere 3 farklı Anti-MCV konsantrasyonunda elektrotlar 45 dk boyunca inkübe edilmiştir ve impedans ölçümleri alınmıştır. İmmünoensörlerin farklı Anti-MCV konsantrasyonlarına göre verdiği cevaplara ilişkin grafik Şekil 4' te gösterilmiştir. Antikor konsantrasyonu 2 ng/mL olarak hazırlanan immünoensörlerin lineer grafikte en düşük sinyallere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sinyallerin oldukça düşük olması 2 ng/mL antikor konsantrasyonunun immobilizasyon için yetersiz kalması olarak yorumlanabilir. Antikor konsantrasyonu 10 ng/mL olarak hazırlanan immünoensörlerin verdiği sinyaller ile grafikte de görüldüğü üzere antikor konsantrasyonu 5 ng/mL olarak hazırlanan immünoensörlere göre hem iyi  $R^2$  değeri hem de en yüksek sinyale sahip olması nedeniyle optimum değer olarak belirlenmiştir.





Şekil 5. Anti-MCV antikor konsantrasyonlarının immünosensör üzerindeki etkisi (Mavi (-▲-▲-): 2 ng/mL Anti-MCV, Kırmızı (-●-●-): 5 ng/mL, Yeşil (-■-■-): 10 ng/mL)

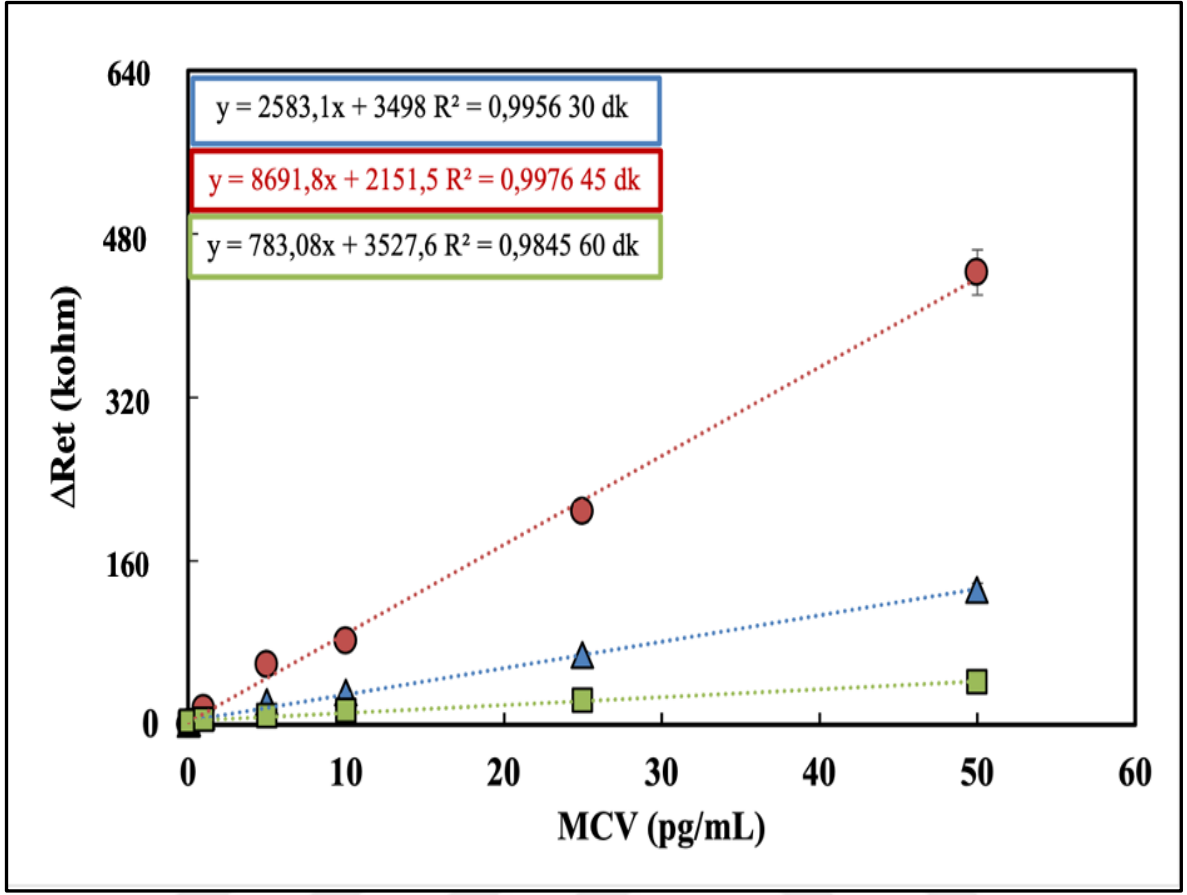
Tablo 2

Anti-MCV antikor konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R<sup>2</sup> değerleri ve denklemleri

Anti-MCV Antikorları Konsantrasyonu Optimizasyonu (ng/mL)	R <sup>2</sup>	Denklem
2	0,9992	$y = 943,28x + 1002,8$
5	0,9976	$y = 8691,8x + 2151,5$
10	0,9927	$y = 5726,8x - 2807,1$

#### 4.2.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Antikor Süre Optimizasyonu

Optimum Anti-MCV konsantrasyonu belirlendikten sonra, antikorların tasarlanan immunosensör yüzeyine en verimli bağlandığı süreyi belirleyebilmek için Anti-MCV inkübasyon süre optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Anti-MCV süre optimizasyonu immünosensörün hem verimli olabilmesi hem de pratik olabilmesi için gereklidir. Hazırlanan immünosensörlerin 3 farklı inkübasyon süresinde (30 dk, 45 dk ve 60 dk) verdiği sinyal yanıtları karşılaştırılması için lineer grafik oluşturulmuştur. Anti-MCV süre optimizasyonuna ait lineer grafik Şekil 5’de gösterilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi inkübasyon süreleri karşılaştırıldığında en düşük sinyaller 60 dklık inkübasyon süresinde gözlemlenmiştir. Anti-MCV inkübasyon süresi 60 dk olarak hazırlanan elektrotların yüzeyinde oluşan biyoaktif tabakanın daha yoğun olması bu yüzden difüzyona engel olarak sinyallerde düşüş meydana geldiği düşünülmektedir. Anti-MCV inkübasyon süresi 30 dk olarak yapılan çalışmada ise sinyaller artsa da tam verimli bir yanıt elde edilememiştir, 30 dk antikor inkübasyon süresinin antikorun yüzeye immobilize olabilmesi için yeterli bir süre olmaması olarak açıklanabilir. Bu sebeple en yüksek sinyallerin elde edildiği 45 dk inkübasyon süresi optimum süre olarak seçilmiştir. Anti-MCV ‘nin inkübasyon süresi için yapılan optimizasyon grafiğinin  $R^2$  değeri ve denklemleri Tablo 3’te verilmiştir.



Şekil 6. Anti-MCV süre optimizasyonunun immünoşansör üzerindeki etkisi (Mavi (-▲-▲-): 30 dk, Kırmızı (-●-●-): 45 dk, Yeşil (-■-■-): 60 dk)

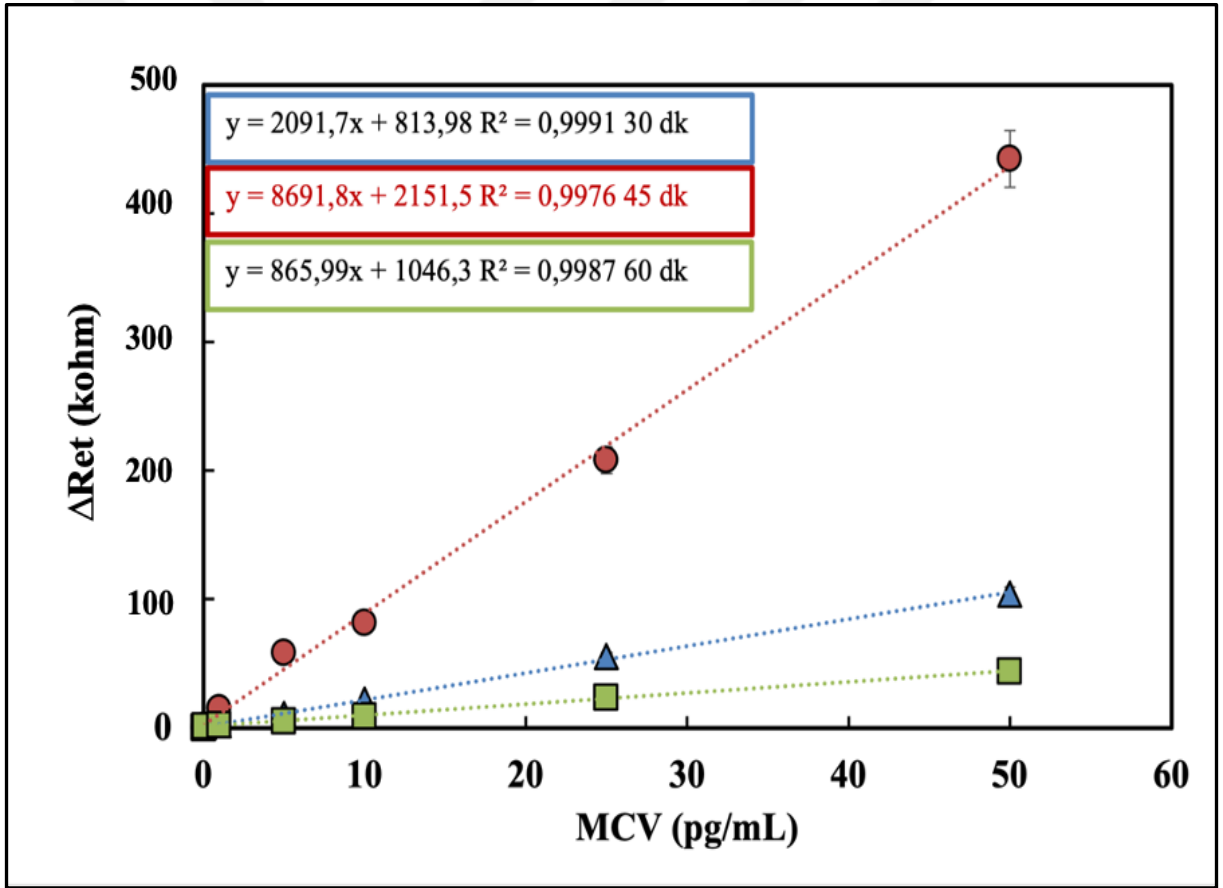
Tablo 3

Anti-MCV süre optimizasyonunun grafiklerinin R<sup>2</sup> değerleri ve denklemleri

Anti-MCV Süre Optimizasyonu	R <sup>2</sup>	Denklem
30	0,9956	$y = 2583,1x + 3498$
45	0,9976	$y = 8691,8x + 2151,5$
60	0,9845	$y = 783,08x + 3527,6$

#### 4.2.4. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Antijen Süre Optimizasyonu

İmmünoensör optimizasyonlarının son aşaması olan MCV inkübasyon süre optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 3 farklı inkübasyon süresi (30 dk, 45 dk ve 60 dk) denenmiştir. Farklı inkübasyon sürelerinde hazırlanan immünoensörlere ait standart grafikler Şekil 6'da gösterilmiştir. Grafikte gösterildiği gibi 45 dk inkübasyon süresiyle hazırlanan immünoensörler, 30 dk ve 60 dk inkübasyon süresiyle hazırlanan immünoensörlere göre impedans sinyallerinde oldukça yüksek artış göstermiştir. Bu nedenle optimum inkübasyon süresi 45 dk olarak belirlenmiştir. MCV'nin inkübasyon süresi için yapılan optimizasyon grafiğinin  $R^2$  değeri ve denklemleri Tablo 4'te verilmiştir.



Şekil 7. MCV süre optimizasyonunun immünoensör üzerindeki etkisi (Mavi (-▲-▲-): 30 dk, Kırmızı (-●-●-): 45 dk, Yeşil (-■-■-): 60 dk )

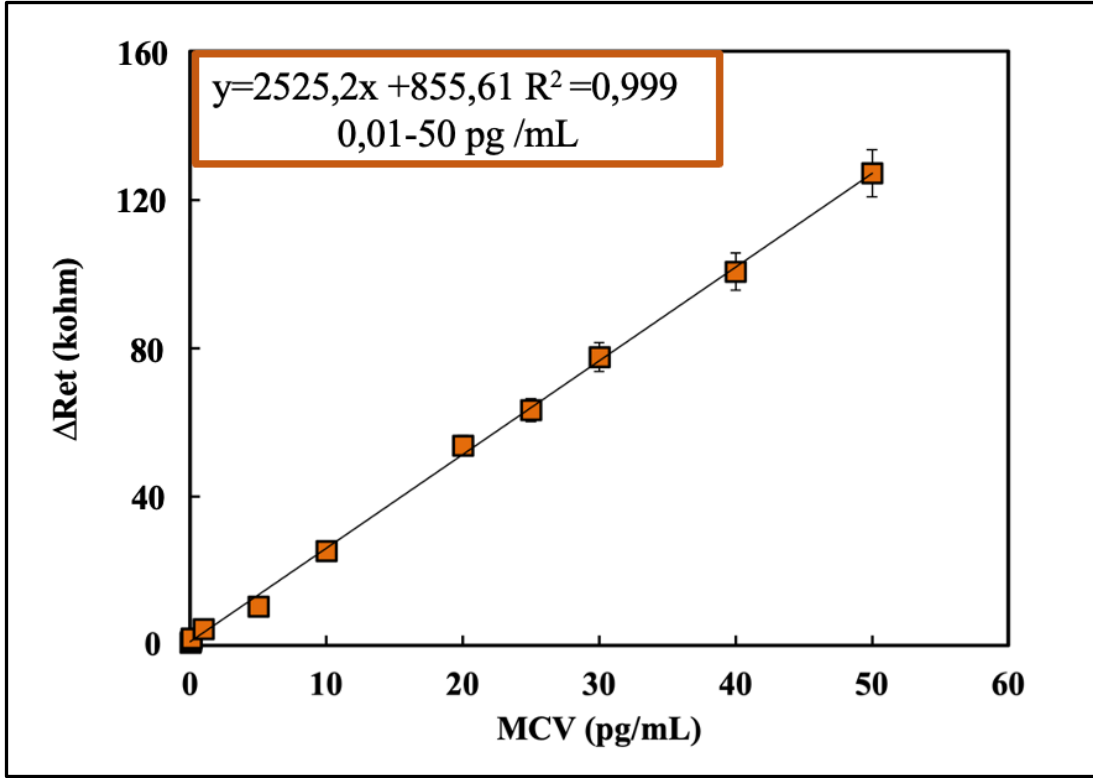
Tablo 4

MCV Süre Optimizasyonunun Grafiklerinin R<sup>2</sup> Değerleri ve Denklemleri

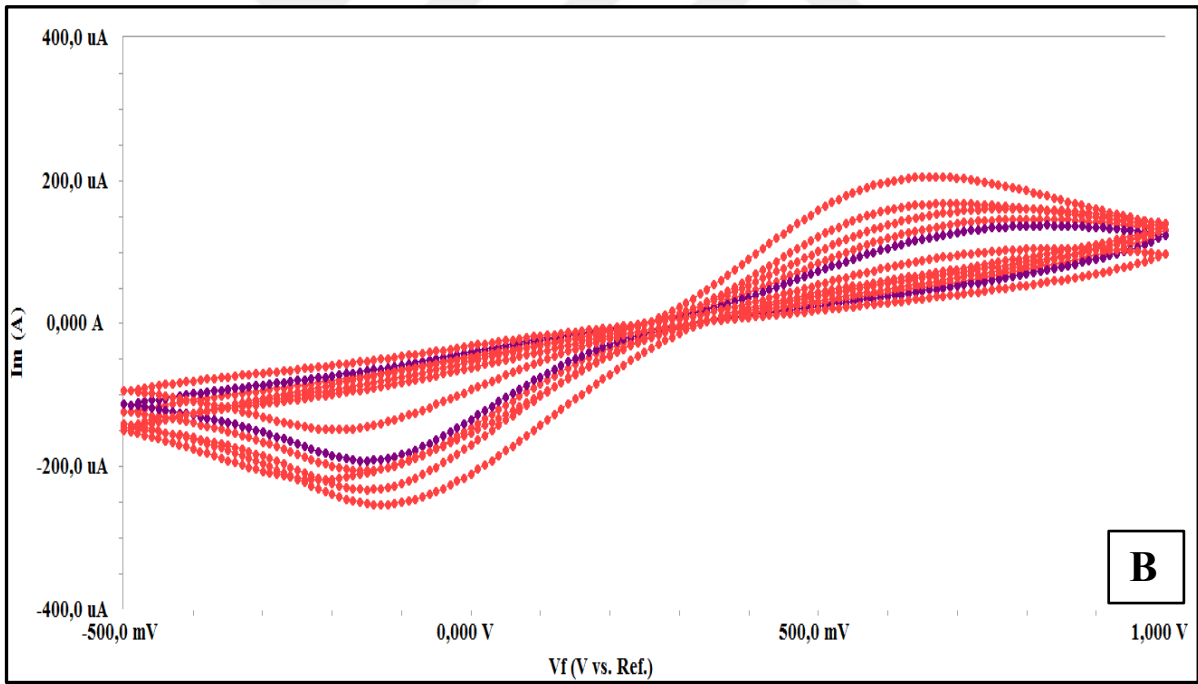
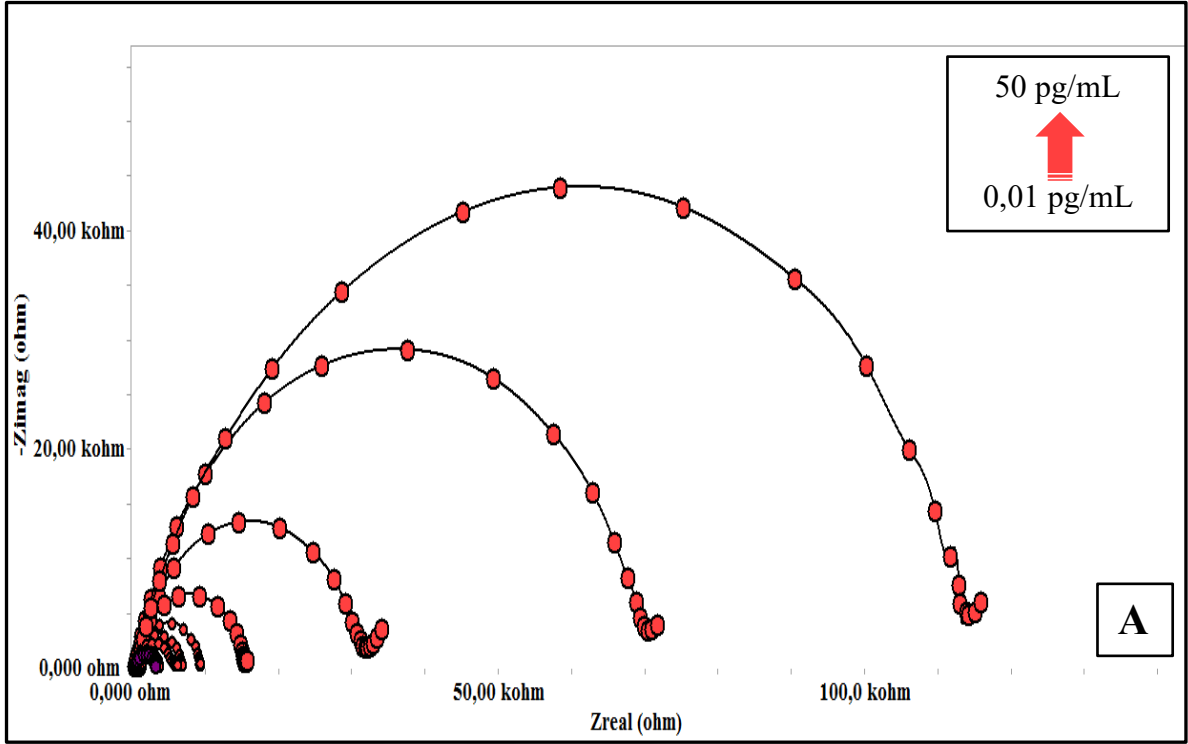
MCV Süre Optimizasyonu	R <sup>2</sup>	Denklem
30	0,9991	$y = 2091,7x + 813,98$
45	0,9976	$y = 8691,8x + 2151,5$
60	0,9987	$y = 865,99x + 1046,3$

### 4.3. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

İmmünoensöre ait tüm parametrelerin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra optimum değerlerle 11 farklı MCV konsantrasyonunda hazırlanan immünoensörlerin EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümlerle hazırlanan lineer grafik Şekil 8'de gösterilmiştir. Tayin aralığı 0,01 pg/mL -50 pg/mL olarak belirlenen immünoensörün LOD değeri 0,00063 ve LOQ değeri ise 0,0021 olarak hesaplanmıştır. Tasarlanan immünoensörün belirlenen lineer aralıkta artan antijen konsantrasyon değerlerinde EIS spektrumları ve CV voltamogramları Şekil 9'da gösterilmiştir. CV'de x eksenini uygulanan potansiyel, y eksenini ise bu potansiyele karşı verdiği yanıt yani oluşan akımdır. Döngüsel voltamogramlarda Nernst denklemine göre ortaya çıkan ördek başı benzeri grafikte görüldüğü gibi konsantrasyon arttıkça yani yüzeyde doluluk arttıkça indirgenme ve yükseltgenme tepeleri birbirinden uzaklaşır. (Elgrishi vd., 2018)



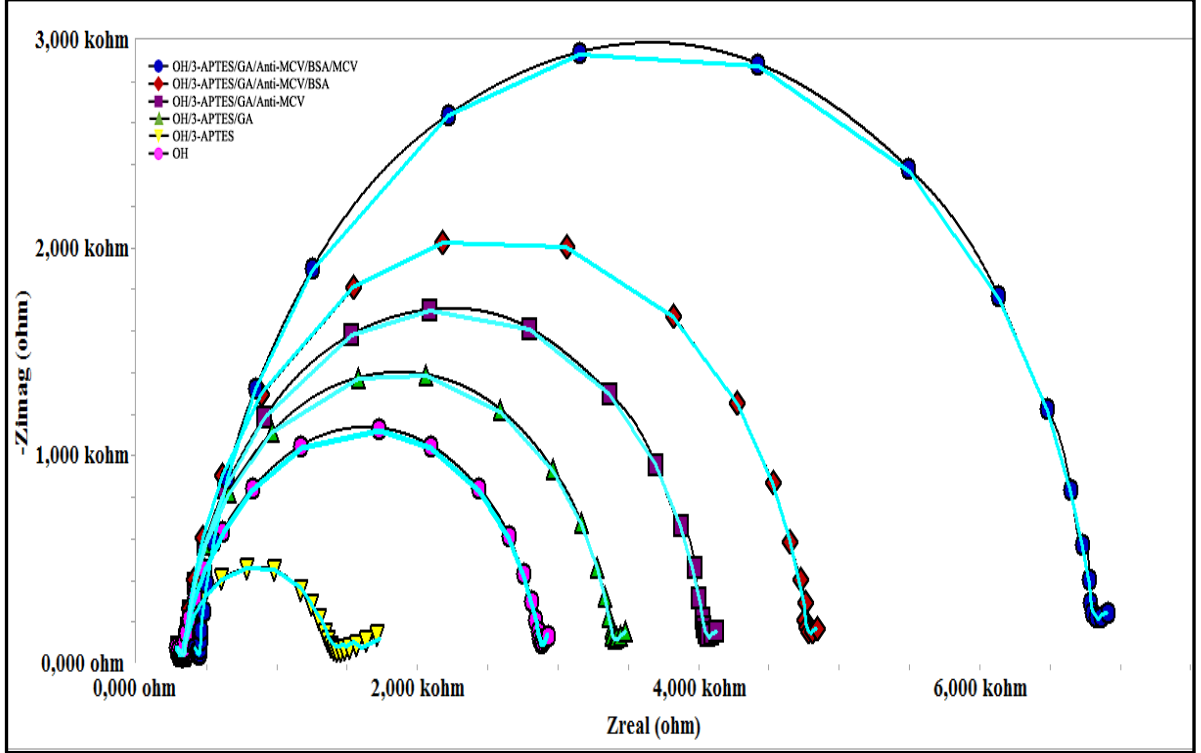
Şekil 8. MCV immünosensörünün kalibrasyon grafiği



Şekil 9. Artan konsantrasyonlarda MCV tespiti A) impedans spektrumları ve B) döngüsel voltamogramları

### 4.3.1 Kramers-Kronig Dönüşümü

Empedans ölçümlerinde deneysel dalgalanmalar ve hatalar yanlış sonuçlara sebep olabilmektedir. Bu yanlış sonuçlar ise yanlış yorumlar ortaya çıkarabilmektedir. Kramers-Kronig ilişkileri empedans ölçümlerinin analizinde, özellikle empedans spektrumlarının yorumlanmasının karmaşık olabildiği biyolojik ve elektrokimyasal sistemlerin incelenmesinde önemli bir araç haline gelmiştir (Reséndiz vd., 2020). Kramers-Kronig dönüşümleri, elektrokimyasal ölçümler ile tutarlı sıfır ve sonsuz frekans sınırlarına, elektrokimyasal sinyallerin oluşturduğu bilinen veri noktaları dışında denklemlerle elde edilen sistemin doğrusal, kararlı ve nedensel olduğu varsayımları oluşturmaktadır. (Wang vd., 2021) Bu nedenle hatalardan kaçınmak için EIS ölçümlerinde Kramers-Kronig transformu uygulanmıştır. Hazırlanan immünoensörün immobilizasyon aşamalarının EIS spektrumlarına ait grafiğin Kramers-Kronig transformu uygulanmış hali Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. MCV immünoensörünün Kramers-Kronig transformu

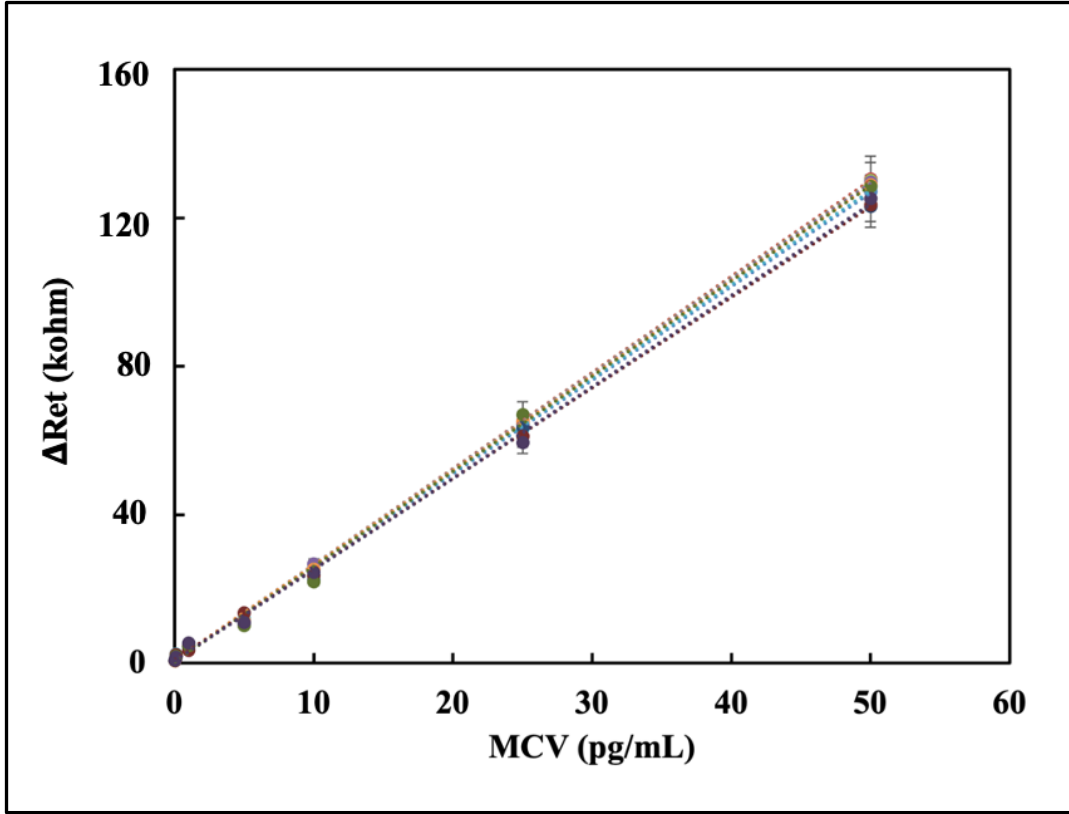


#### 4.3.2. Tekrarlanabilirlik

Bir immünoensör tasarlanırken çalışılan bir çok parametre olduğu için ve elektrotlar bir çok aşamadan geçtiği için çalışılan ortam ve koşullardan etkilenip ölçümlerde büyük değişimler gözlenebilir bu yüzden immünoensörün hassaslığı açısından tekrarlanabilirlik çalışması uygulanması gerekmektedir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında optimum değerlerle hazırlanan immünoensörler aynı MCV konsantrasyonunda art arda ölçüm yapılarak gerçekleştirilir. Aynı koşullarda hazırlanan 20 farklı elektrot seçilen MCV konsantrasyonunda (25 pg/mL) inkübe edilmiştir ve EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümler doğrultusunda lineer grafik denkleminde yararlanılarak ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı sırasıyla 25,5 pg/mL ,  $\pm 0,53$  pg/mL , %0,27 olarak elde edilmiştir.

#### 4.3.3 Tekrar Üretilirlik

Bir immünoensörün standart olabilmesi için incelenmesi gereken karakterizasyon aşamalarından biri de tekrar üretilebilirlik çalışmasıdır. Bu sayede immünoensörün rutin analizlerde kullanılabilmesi denenmektedir. Tekrar üretilebilirlik çalışmasında aynı şartlarda ve aynı özelliklerde, farklı zamanlarda hazırlanan immünoensörler değerlendirilmiş ve birbirleriyle kıyaslanmıştır. MCV konsantrasyonlarına karşı elde edilen Ret değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen 10 farklı grafik birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Grafikler Şekil 11' de sunulmuştur. Elde edilen grafik denklemlerinden yararlanılarak eğim ve intercept için relatif standart sapma değerleri (%RSD) sırasıyla %2,207 ve %24,6 olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiklerine ait denklemler Tablo 5'te verilmiştir.



Şekil 11. MCV immünoşensörünün tekrar üretilebilirlik grafiği

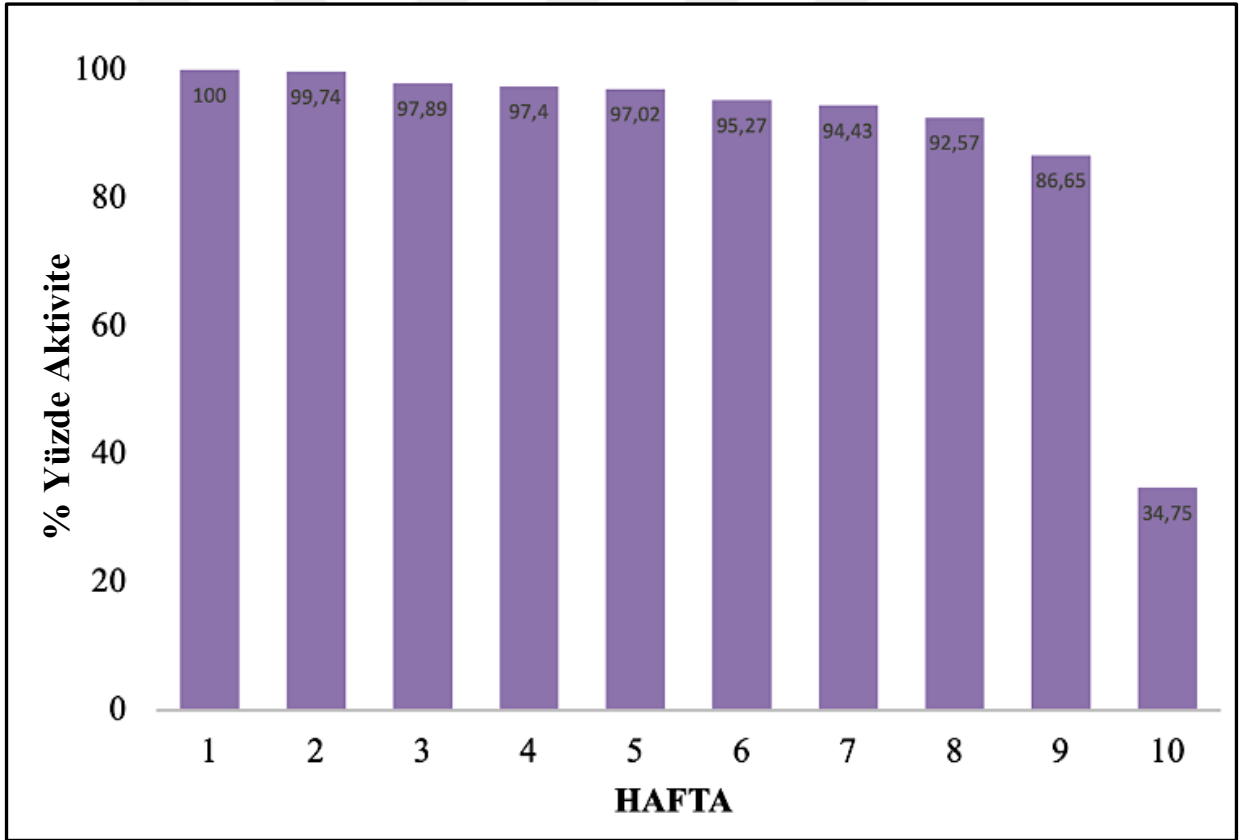
Tablo 5

Tekrar üretilebilirlik çalışmasına ait grafiklerin  $R^2$  değerleri ve denklemleri

Tekrar üretilebilirlik	$R^2$	Denklem
1	0,9992	$y = 2588,4x + 633,81$
2	0,9992	$y = 2521,3x + 597,97$
3	0,9993	$y = 2577x + 728,93$
4	0,9991	$y = 2569,9x + 743,49$
5	0,9989	$y = 2530,7x + 776,45$
6	0,9994	$y = 2558x + 785,69$
7	0,9986	$y = 2454,4x + 569,77$
8	0,9996	$y = 2441,7x + 891,5$
9	0,9974	$y = 2569,2x + 290,03$
10	0,9985	$y = 2459,6x + 665,33$

#### 4.3.4. Depo Ömrü

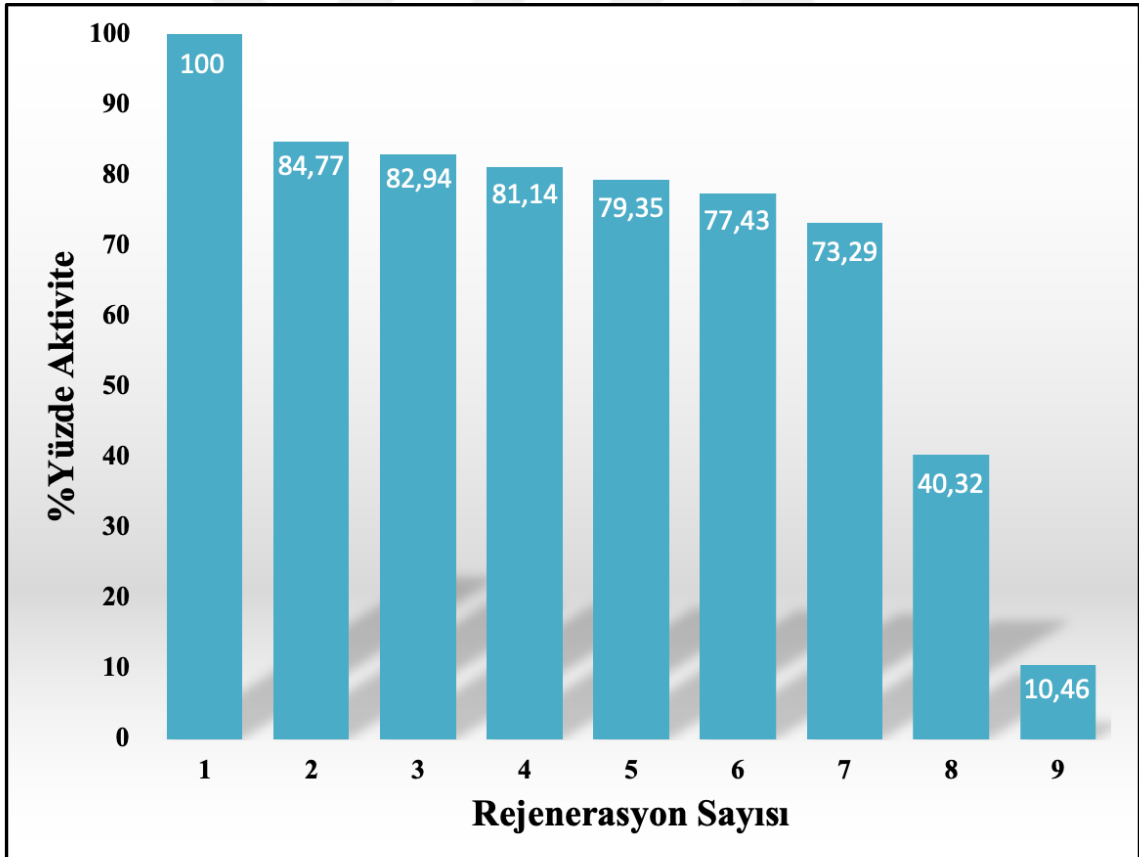
Hazırlanan immünoşensörün raf ömrünü belirleyebilmek adına BSA adımına kadar olan immobilizasyon aşaması tamamlanan elektrotlar depolanmak için +4 °C’de saklanmıştır. Depolanan 10 farklı elektrot her hafta 25 pg/mL MCV ile inkübe edilerek EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Elektrotların haftalık periyotlarla antijen inkübasyonunun ardından elde edilen Ret değerleri yüzdeler olarak hesaplanarak grafik oluşturulmuştur. Grafik Şekil 12’de gösterilmiştir. Hazırlanan immünoşensörlerin 9. haftadan sonra antikor-antijen etkileşim verimi %50’ den daha fazla oranda düşmüştür ve 10. haftada hazırlanan immünoşensör ancak veriminin %34,75 ini koruyabilmiştir.



Şekil 12. MCV immünoşensörünün depo ömrü grafiği

#### 4.3.5. Rejenerasyon

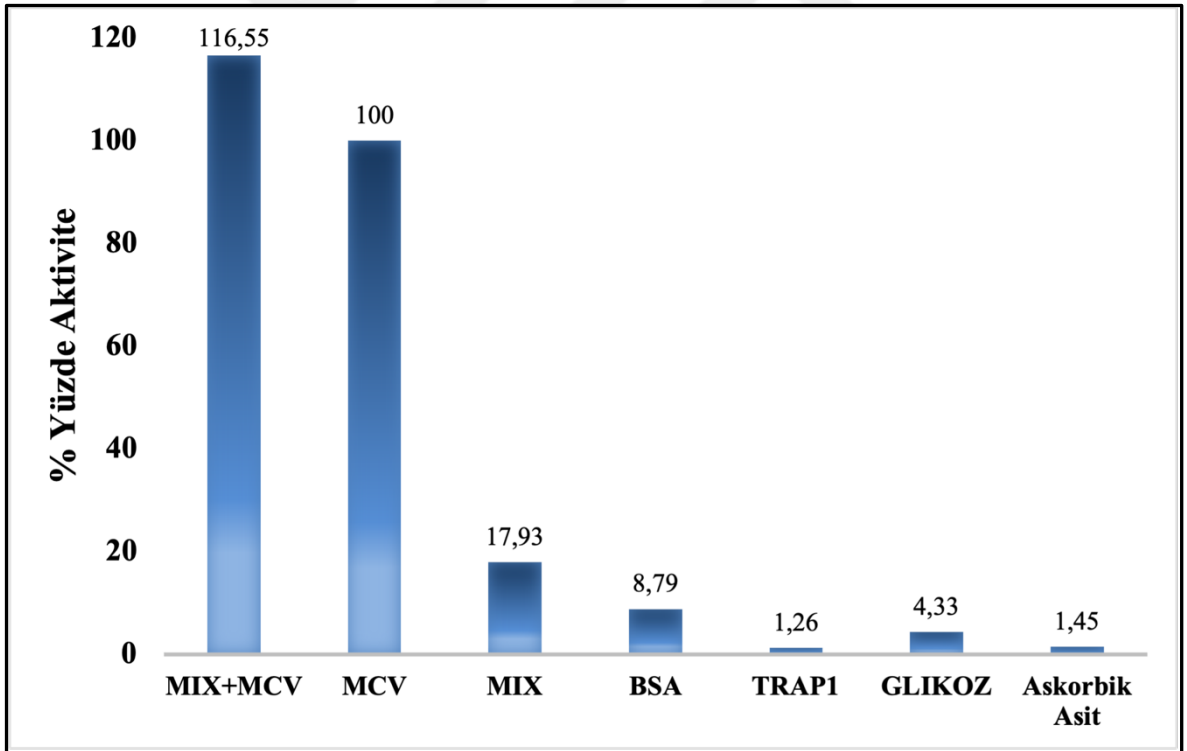
Rejenerasyon çalışması genellikle tek kullanımlık elektrotlarda uygulanmamaktadır. Ancak, SAM'in ne kadar sağlam oluştuğunun tespit edilmesi için önemli ve gerekli bir çalışmadır. Bu çalışmada MCV bağlandıktan sonra  $\Delta Ret$  değeri hesaplanmıştır daha sonra elektrot %0,05 lik bir HCl çözeltisinde 1 dk bekletilmiştir. Burada beklenen durum elektrotun asitle muamele edilmesiyle SAM 'in zarar görmemesi ve sadece antikor-antijen etkileşiminin sonlandırılmasıdır. Tekrar antijen ile muamelenin ardından başarılı bir bağlanma gözlenmesi hedeflenmiştir. Rejenerasyon adımı için hazırlanan grafik Şekil 13'te gösterilmiştir. Bu rejenerasyon döngüsünün 8. adımında biyosensör aktivitesinin %40,32 ye düştüğü, işlem bir kez daha tekrarlandığında aktivitenin neredeyse tamamının kaybolduğu gözlenmiştir.



Şekil 13. MCV immünosensörünün rejenerasyon grafiği

#### 4.3.6 Seçicilik

Seçicilik çalışması, tasarlanan immünoşensörün kendi antijenine ne kadar spesifik olduğunu belirleyebilmek için uygulanan bir adımdır. Tasarlanan immünoşensörün spesifik olmayan bileşenlerden etkilenip etkilenmediğini anlamak için farklı analitler kullanılarak 7 farklı elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrotlar anti-MCV, BSA, TRAP1 antijeni, glikoz, askorbik asit ve bu analitlerin eşit olarak birleşiminden oluşan bir karışım ve karışımla birlikte MCV'den oluşan sıvı içerisinde ayrı ayrı optimize edilen sürede (45 dk) inkübe edilmiştir. MCV'nin serumda bulunma aralığına göre diğer analitlere gerekli seyreltmeler yapılarak elektrotlar inkübasyona bırakılmıştır daha sonra immünoşensöre etkisini görmek için elektrotlar ölçüm alınmıştır. Daha sonra ölçüm alınan elektrotların  $\Delta Ret$  değerlerine göre sıralanmıştır Şekil 14'te gösterilmiştir. İmmünoşensör beklendiği gibi diğer analitlerle daha az etkileşime girerek kendi antijenine daha spesifik olduğunu göstermiştir.



Şekil 14. MCV immünoşensörünün seçicilik grafiği

#### 4.4. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün Gerçek Ticari Serum Örneklerinde Uygulaması

Tasarlanan immünosensör standart ekleme yöntemiyle 5 farklı gerçek ticari insan serum örneği için denenmiştir. Tablo 6’ da gösterildiği gibi ölçümlerden sonra kalibrasyon grafiği denklemine göre hesaplanan bağıl standart sapma ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; MCV tayini için tasarlanan biyosensörün klinik uygulama potansiyelinin yüksek olduğu söylenebilmektedir.

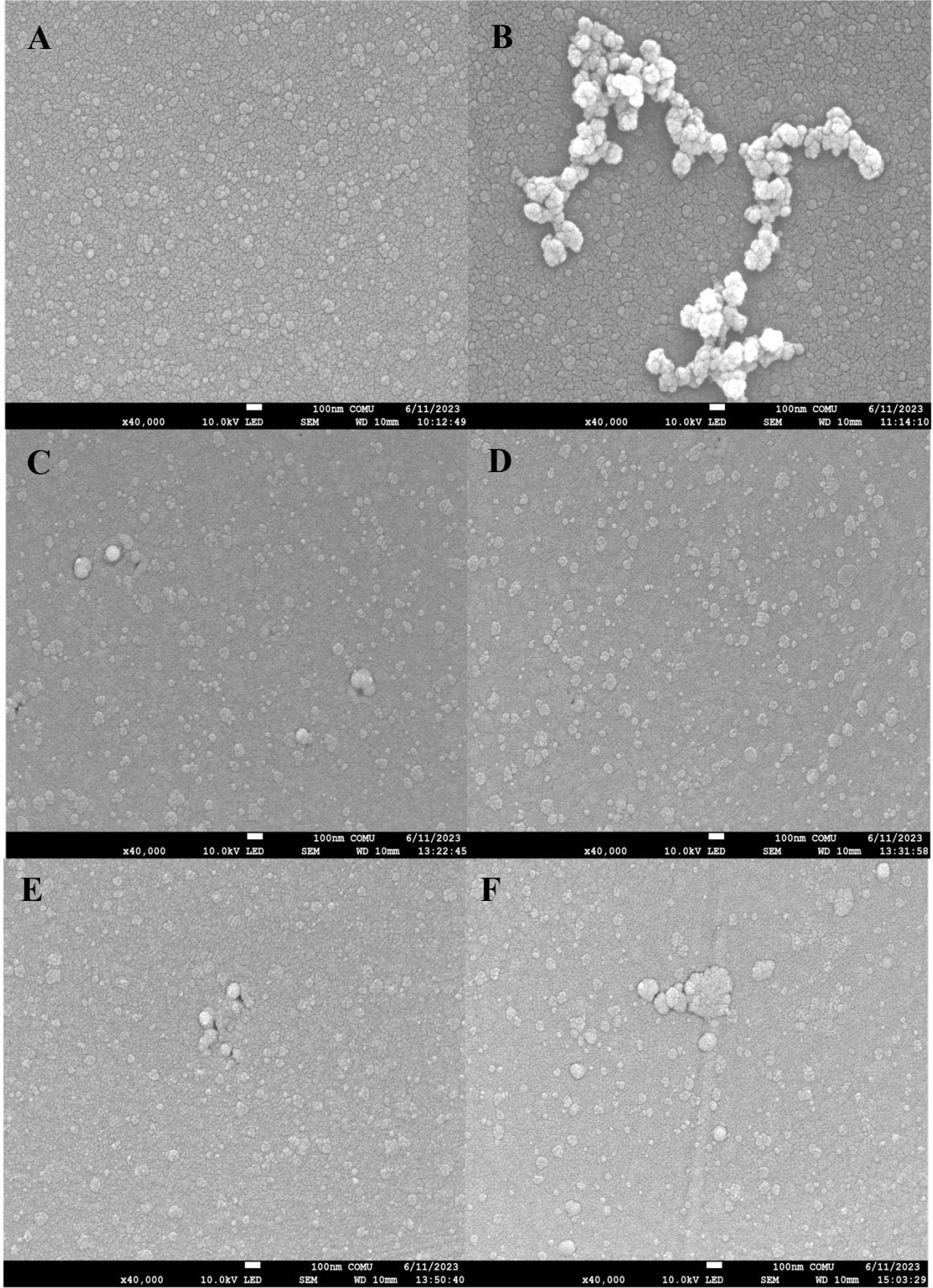
Tablo 6

MCV immünosensörünün gerçek ticari insan serum örneklerinde uygulanabilirliği

Serum	MCV Konsantrasyon (pg/mL)	Standart Eklenen Konsantrasyon (pg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (pg/mL)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	1,57	5 25	6,74/6,65/6,39 28,85/27,02/24,68	0,3 1,05	100,3 101,05
2	2,84	5 25	8,17/6,89/7,73 26,35/25,77/33,65	3,19 1,94	96,81 98,06
3	4,6	5 25	9,69/9/10,36 29,6/29,38/29,95	0,83 0,74	100,83 99,26
4	4,43	5 25	9,09/8,87/10,25 29,89/29,9/28,94	0,32 0,48	99,68 100,48
5	5,33	5 25	9,58/9,42/12,07 24,83/34,86/34,55	0,19 3,56	100,19 103,56

#### **4.5. Anti-Sitrullinlenmiş Protein Antikorları Biyosensörünün SEM ve AFM aracılığı ile Morfolojik Karakterizasyonun İncelenmesi**

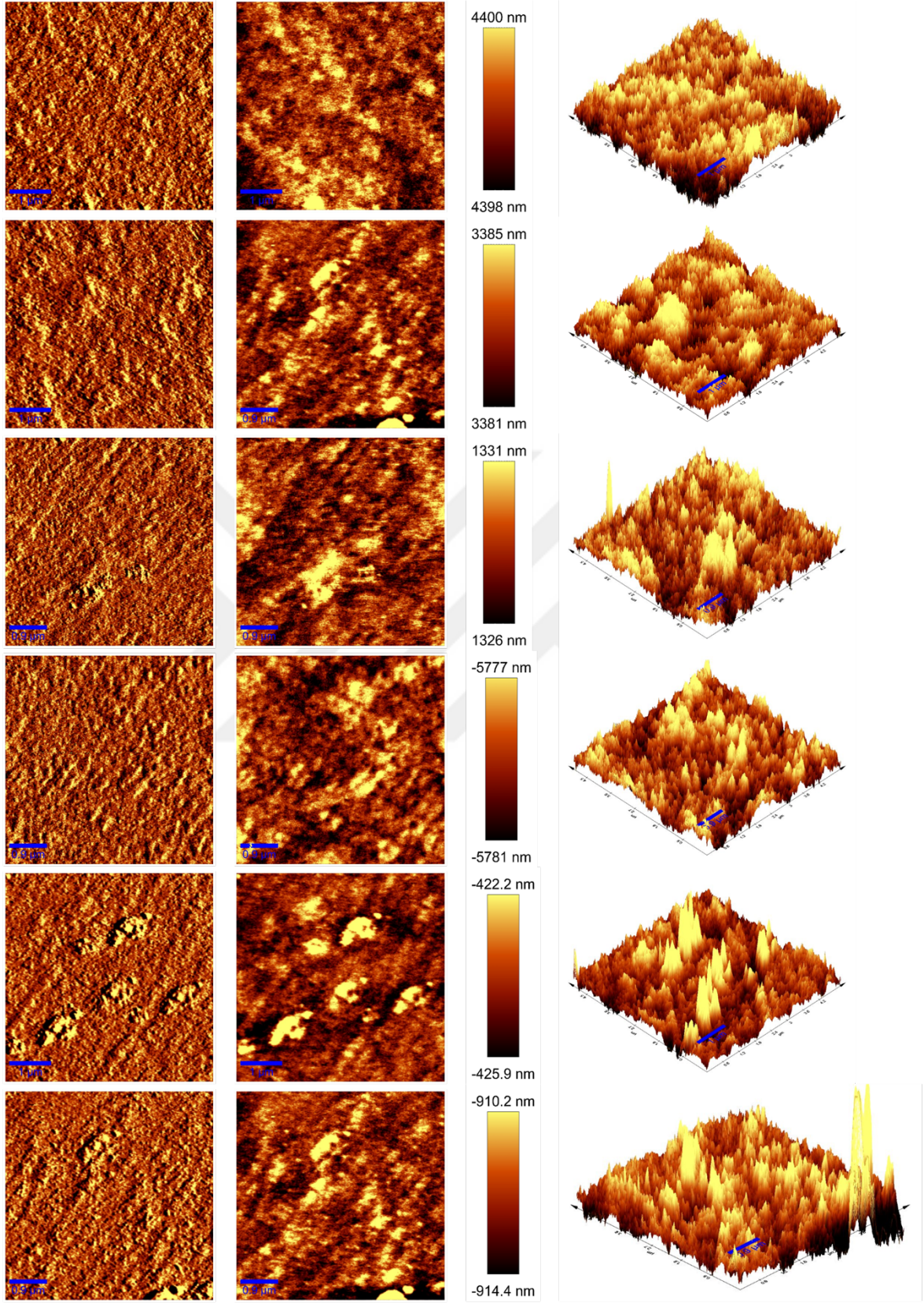
Önerilen immunosensörün immobilizasyon adımları gerçekleştirilirken immobilize edilen biyobileşenlerin yüzeyde oluşturduğu morfolojik değişiklikleri incelemek adına SEM ve AFM görüntüleme cihazları kullanılmıştır. Hazırlanan immünosensörlerin SEM görüntüleri Şekil 15'te gösterilmiştir. Şekil 15A, hidrosilasyon işlemi ile elektrot yüzeyinde immobilize olan hidrosil gruplarına ait SEM görüntüsüdür. Hidrosil gruplarının yüzeyde boncuk benzeri yapıda homojen bir dağılıma sahip olduğu görüntülenmiştir. 3-APTES silan ajanı yüzeye immobilize edildikten sonra elde edilen SEM görüntüsü Şekil 15B'de gösterilmiştir. Silan ajanının hidrosil gruplarına bağlanmasıyla elektrot yüzeyinde SAM oluşmuştur. Şekilde küresel hidrosil grupları ile yüzeye tutunan 3-APTES'in varlığı görülmektedir. Daha sonra çapraz bağlayıcı GA ile muamele edilen ve anti-MCV ile muamele edilen elektrotun yüzeyinde belirgin bir morfolojik bir değişime uğradığı SEM görüntüsü sırasıyla Şekil 15C ve Şekil 15D'de gösterilmiştir. BSA ve MCV immobilizasyonuna ait oluşan yeni yüzey morfolojileri Şekil 15E ve Şekil 15F'de verilmiştir.



Şekil 15. ITO-PET elektrot yüzeyindeki SEM görüntüleri: A) OH, B) OH/3-APTES, C) OH/3-APTES/GA, D) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV, E) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA, F) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA/MCV



Tasarlanan immünosensörün elektrot yüzeylerini analiz etmek için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılmıştır, elektrot yüzeyine ait 2D ve 3D görüntüler Şekil 16'da gösterilmiştir. OH, OH/3-APTES, OH/3-APTES/GA, OH/3-APTES/GA/Anti-MCV, OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA, OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA/MCV immobilize edilmiş elektrotların yükseklik profilleri incelenmiştir. AFM ölçümlerinden yararlanılarak SA (ortalama pürüzlülük) ve SQ (kök ortalama kare pürüzlülük) değerleri elde edilmiştir. Şekil 16 A'da hidroksil gruplarının yüzeyde homojen bir şekilde immobilize olduğu görülmektedir. Hidroksilleme adımına ait görüntülerin SA değeri 118,557 nm ve SQ değeri 137,923 nm olarak elde edilmiştir. Şekil 16B ve Şekil 16C sırasıyla silanizasyon ve GA çapraz bağlama adımına ait yüzey morfolojilerini temsil etmektedir, bu adımlardan sonra SA değeri 163,256 nm ve SQ değeri 166,355 nm olarak elde edilmiştir. Değerlerdeki artış silan ajanı 3-APTES ve çapraz bağlayıcı GA moleküllerinin varlığı olarak yorumlanabilir. Yüzeye anti-MCV molekülleri immobilize edildikten sonra Şekil 16D'de yeni bir yüzey morfolojisi oluştuğu görülmektedir. Yüzeyde açıkta kalan uçları bloke etmek amacıyla kullanılan BSA moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra SA değeri 213,169 nm ve SQ değeri 246,162 nm'ye yükselmiştir, Şekil 16E'de BSA aşamasının yüzey morfolojisine ait görüntü verilmiştir. Immobilizasyonun son aşaması olan MCV moleküllerinin immobilizasyonunun oluşturduğu yeni yüzey morfolojisi Şekil 16F'de görüntülenmektedir.



Şekil 16. ITO-PET elektrot yüzeyindeki AFM görüntüleri: A) OH, B) OH/3-APTES, C) OH/3-APTES/GA, D) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV, E) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV /BSA, F) OH/3-APTES/GA/Anti-MCV/BSA/MCV

## BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ VE ÖNERİLER

RA, prevalansı artmakta olan, yüksek mortalite değerlerine sahip; kalp, böbrek, akciğer, sindirim sistemi, göz, deri ve sinir sistemi dahil olmak üzere hem eklemlere hem de eklem dışı organlara zarar verebilen, kronik bir enflamatuvar süreçle ilişkili sistemik bir otoimmün hastalıktır. RA hastalarının klinik durumu, son yıllarda hastalık aktivitesini azaltmayı ve sistemik komplikasyonları önlemeyi mümkün kılan erken tanı ile iyileşmiştir. Erken tanıda büyük rolü olan, hastaların yüksek maliyetteki tedavilerden kaçınmasını sağlayabilecek biyosensörlerdeki gelişmeler bu konudaki önemini kanıtlamıştır.

Literatürde RA teşhisine yönelik birçok immünosensör bulunmasına rağmen ve MCV' nin de RA tanısında potansiyel bir biyobelirteç olması göz önüne alındığında MCV immünosensörüne rastlanmamıştır. Bu çalışmada MCV biyobelirtecinin potansiyelini belirlemek adına pratik, hassas, tek kullanımlık, maliyeti düşük ve yüksek kararlılıkta bir immünosensör geliştirilmiştir. Hassas bir immünosensör geliştirmek için ilk adım olarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7

MCV immünosensörünün optimizasyon değerleri

Optimizasyonlar	Seçilen Değerler
3-APTES konsantrasyonu	%0,05
Anti-MCV konsantrasyonu	5 pg/mL
Anti-MCV inkübasyon süresi	45 dk
MCV inkübasyon süresi	45 dk
Tayin aralığı	0,01 pg/mL – 50 pg/mL

Daha sonra tasarlanan immünosensörü karakterize edebilmek için tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır ve gerçek ticari serum örneklerine uygulanmıştır. Bu sonuçlar immünosensörün uygulanabilirliğini ve potansiyelini kanıtlamaktadır.

RA için potansiyel olarak gösterilen MCV biyobelirteci için hassas, spesifik, tekrarlanabilen, kolay kullanım sağlayan, maliyet olarak ucuz tek kullanımlık bir immünosensör geliştirilmiştir.



## KAYNAKÇA

- Almutairi, K., Nossent, J., Preen, D., Keen, H., & Inderjeeth, C. (2021). "The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review." *Rheumatology international*, 41(5), 863-877.
- Bartoloni, E., Alunno, A., Bistoni, O., Bizzaro, N., Migliorini, P., Morozzi, G., ... & Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA) investigators. (2012). "Diagnostic value of anti-mutated citrullinated vimentin in comparison to anti-cyclic citrullinated peptide and anti-viral citrullinated peptide 2 antibodies in rheumatoid arthritis: an Italian multicentric study and review of the literature." *Autoimmunity reviews*, 11(11), 815-820.
- Chinnadayala, S. R., & Cho, S. (2020). "Electrochemical immunosensor for the early detection of rheumatoid arthritis biomarker: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in human serum based on avidin-biotin system." *Sensors*, 21(1), 124.
- Cooper, G. S., & Stroehla, B. C. (2003). "The epidemiology of autoimmune diseases." *Autoimmunity reviews*, 2(3), 119-125.
- Çalışkan, M., Vural, B., & Sezgintürk, M. K. (2022). "A Novel Disposable Immunosensor for Early Diagnosis of Cardiovascular Diseases." *ChemistrySelect*, 7(29), e202200061.
- Davidson, A., & Diamond, B. (2001). "Autoimmune diseases." *New England Journal of Medicine*, 345(5), 340-350.
- Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. K. (2019). "A novel electrochemical immunosensor based on disposable ITO-PET electrodes for sensitive detection of PAK 2 antigen." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 848, 113304.

- Drouvalakis, K. A., Bangsaruntip, S., Hueber, W., Kozar, L. G., Utz, P. J., & Dai, H. (2008). "Peptide-coated nanotube-based biosensor for the detection of disease-specific autoantibodies in human serum." *Biosensors and Bioelectronics*, 23(10), 1413-1421.
- Egerer, K., Feist, E., & Burmester, G. R. (2009). "The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens." *Deutsches Ärzteblatt International*, 106(10), 159.
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). "A practical beginner's guide to cyclic voltammetry." *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206.
- Guerrero, S., Sánchez-Tirado, E., Martínez-García, G., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2020). "Electrochemical biosensor for the simultaneous determination of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in human serum." *Analyst*, 145(13), 4680-4687.
- Hwang, E. Y., Lee, J. H., & Lim, D. W. (2021). "Directional self-assembly of anisotropic bimetal-poly (aniline) nanostructures for rheumatoid arthritis diagnosis in multiplexing." *Analytica Chimica Acta*, 1174, 338699.
- Iyengar, K. P., Vaish, A., & Nune, A. (2022). "Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) and Rheumatoid arthritis: Clinical relevance." *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 24, 101729.
- Lin, C. Y., Nguyen, U. T. N., Hsieh, H. Y., Tahara, H., Chang, Y. S., Wang, B. Y., ... & Fan, Y. J. (2022). "Peptide-based electrochemical sensor with nanogold enhancement for detecting rheumatoid arthritis." *Talanta*, 236, 122886.
- Lin, Y. J., Anzaghe, M., & Schülke, S. (2020). "Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis." *Cells*, 9(4), 880.

- Moez, S., John, P., & Bhatti, A. (2013). "Anti-citrullinated protein antibodies: role in pathogenesis of RA and potential as a diagnostic tool." *Rheumatology international*, 33, 1669-1673.
- Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S., & Ozkan, S. A. (2019). "The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis." *Biosensors*, 9(3), 86.
- ÖZCAN, B. (2023). "A practical and single-use ITO-PET based immunosensing platform for detection of Tumor Necrosis Factor-alpha biomarker." *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 51(2), 201-214.
- Özcan, B., & Sezgintürk, M. K. (2022). "Fabrication of an ultrasensitive and single-use graphite paper based immunosensor for Neuropeptide Y detection: A promising biosensing system for early detection of childhood obesity." *Materials Today Communications*, 33, 104797.
- Ramos, K. C., & Macías, M. D. P. C. (2021). "Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection." *Talanta*, 224, 121801.
- Reséndiz, R., Rodríguez, A., Larios, E. R., Torres, J., Castañeda, F., & Antaño-López, R. (2022). "Exploration of new analytical correlations as an alternative to the Kramers-Kronig transforms for the assessment of impedance spectroscopy data." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 904, 115879.
- Selvam, S. P., Chinnadayala, S. R., & Cho, S. (2021). "Electrochemical nanobiosensor for early detection of rheumatoid arthritis biomarker: Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies based on polyaniline (PANI)/MoS<sub>2</sub>-modified screen-printed electrode with PANI-Au nano matrix-based signal amplification." *Sensors and Actuators B: Chemical*, 333, 129570.
- Shapiro, S. C. (2021). "Biomarkers in rheumatoid arthritis." *Cureus*, 13(5).

- Soós, L., Szekanecz, Z., Szabó, Z., Fekete, A., Zeher, M., Horváth, I. F., ... & Lakos, G. (2007). "Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis." *The Journal of rheumatology*, 34(8), 1658-1663.
- Stephan Blüml, Josef S. Smolen, Chapter 34- Rheumatoid Arthritis, Editor(s): Noel R. Rose, Ian R. Mackay, "The Autoimmune Diseases (Sixth Edition)", *Academic Press*, 2020.
- Svärd, A., Kastbom, A., Söderlin, M. K., Reckner-Olsson, Å., & Skogh, T. (2011). "A comparison between IgG-and IgA-class antibodies to cyclic citrullinated peptides and to modified citrullinated vimentin in early rheumatoid arthritis and very early arthritis." *The Journal of rheumatology*, 38(7), 1265-1272.
- Sypabekova, M., Hagemann, A., Rho, D., & Kim, S. (2022). "3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) Deposition Methods on Oxide Surfaces in Solution and Vapor Phases for Biosensing Applications." *Biosensors*, 13(1), 36.
- Tanaka, R., Takemura, M., Sato, M., Yamada, Y., Nakagawa, T., Horibe, T., ... & Shimizu, K. (2010). "Comparison of chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) with ELISA for the determination of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies." *Clinica Chimica Acta*, 411(1-2), 22-25.
- Uludağ, İ., & Sezgintürk, M. K. (2022). "A direct and simple immobilization route for immunosensors by CNBr activation for covalent attachment of anti-leptin: obesity diagnosis point of view." *3 Biotech*, 12(1), 33.
- Van Steendam, K., Tilleman, K., & Deforce, D. (2011). "The relevance of citrullinated vimentin in the production of antibodies against citrullinated proteins and the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Rheumatology*, 50(5), 830-837.
- Van Venrooij, W. J., Van Beers, J. J., & Pruijn, G. J. (2011). "Anti-CCP antibodies: the past, the present, and the future." *Nature Reviews Rheumatology*, 7(7), 391-398.



- Vu, T. T., Song, S., Lai, H. D., Mai, N. L., Trinh, T. T., Do, H. T., ... & Nguyen, A. H. (2020). "Coverage degrees of colloids on electrochemical electrodes and signal amplification for anti-citrullinated peptide antibody detection." *Sensing and Bio-Sensing Research*, 27, 100322.
- Vural, B., Çalişkan, M., & Sezgin Ürk, M. K. (2020). "Development of a biosensor platform based on ITO sheets modified with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane for early detection of TRAP1." *Turkish Journal of Chemistry*, 44(2), 461-471.
- Wang, S., Zhang, J., Gharbi, O., Vivier, V., Gao, M., & Orazem, M. E. (2021). "Electrochemical impedance spectroscopy." *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 41.
- Zhang, X., Zambrano, A., Lin, Z. T., Xing, Y., Rippey, J., & Wu, T. (2017). "Immunosensors for biomarker detection in autoimmune diseases." *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 65, 111-121.