



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMÜHENDİSLİK VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM  
DALI**

**KREATİN KİNAZ TAYİNİ İÇİN TEK KULLANIMLIK  
ELEKTROKİMYASAL İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BÜŞRA NUR YENİ**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Üyesi BURÇAK DEMİRBAKAN**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**KREATİN KİNAZ TAYİNİ İÇİN TEK KULLANIMLIK ELEKTROKİMYASAL  
İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÜŞRA NUR YENİ

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi BURÇAK DEMİRBAKAN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 4044

ÇANAKKALE – 2023



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Büşra Nur BAYGIN tarafından Dr.Öğr.Üyesi Burçak DEMİRBAKAN yönetiminde hazırlanan ve **29/08/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Kreatin Kinaz Tayini İçin Tek Kullanımlık Elektrokimyasal İmmunosensör Geliştirilmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN

(Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN

Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

.....

.....

.....

Tez No : .....

Tez Savunma Tarihi : 29/08/2023

.....

Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

.././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.

Büşra Nur YENİ

29/08/2023

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Dr.Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN'a, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği bölüm başkanı ve değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e, akademik deneyimlerini benimle severek paylaşan değerli hocam Dr.Öğr.Üyesi Canan ÖZYURT'a, sorduğum sorulara zaman ve mekan farketmeksizin içtenlikle cevap veren ve tezimin deneysel ve yazım süreçlerinde oldukça yardımcı olan sevgili hocam Dr.Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN'a, yüksek lisans hayatım boyunca deneyimleriyle ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli hocam Arş. Gör. İnci ULUDAĞ'a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve motivasyonumu her zaman yükseltmek için çabalayan sevgili eşim Oğuzhan YENİ'ye, hayatımın her evresinde maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan canım babam Cemil BAYGIN, canım annem Filiz BAYGIN ve canım kardeşim Beyzanur BAYGIN'a, laboratuvarında ve laboratuvar dışında yaşadığım tüm zorluklarda yardımlarını yanımda hissettiğim değerli ekip arkadaşlarım Bahar İNCE, Berfin VURAL, Meltem ÇALIŞKAN, Şeyma ŞENTÜRK ve Ecem UZMAN'a, tüm hayatım boyunca deneyimleriyle ve tavsiyeleriyle bana destek olan canım kuzenim Aybike ŞAHİN ve eşi Ünal ŞAHİN'e son olarak yüksek lisans hayatım boyunca bana moral kaynağı olan ve hep yanımda olan değerli dostlarım Ezgi DEMİRKILIÇ, Elif UZUN YALÇINKAYA ve Leyla ŞAHVERDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.”

Büşra Nur YENİ

Çanakkale, Ağustos 2023

## ÖZET

# KREATİN KİNAZ TAYİNİ İÇİN TEK KULLANIMLIK ELEKTROKİMYASAL İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Büşra Nur YENİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Burçak DEMİRBAKAN

29/08/2023, 46

Kreatin kinaz kreatinin fosfat bağlayıcı alt dallarından biridir. ATP sentezine katılımı ile kas dokusu için önemli bir faktördür. Kardiyovasküler hastalıklarda kreatin kinaz erken teşhis ve tedavi sürecinin takibinde önemli bir biyobelirteç olarak öne çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında kreatin kinaz biyobelirtecinin tespiti için immobilizasyon yöntemleri kullanılarak elektrokimyasal immunosensör tasarlanmıştır. Tasarlanan immunosensörün çalışma elektrodu olarak indiyum kalay oksit kaplı polietilen teraftalat (ITO-PET) kullanılmıştır. Elektrot yüzeyi antikör proteinlerinin kovalent etkileşimleri amacıyla bağlayıcı ajan olan 3-Glisidokpropiltrimetoksisilan (3-GOPS) ile modifiye edilmiştir. Antikör kreatin kinaz (Anti-CK) proteini 3-GOPS sonrası elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Son aşama olarak sığır serum albümin (BSA) elektrot yüzeyindeki kovalent olmayan bağları bloke etmek amacıyla kullanılmıştır. Bunun sonucunda antikörün ITO-PET yüzeyine daha iyi tutunması hedeflenmiştir. Kontrolün sağlanabilmesi amacıyla tasarlanan biyosensörün her aşamasında elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) yöntemleri ile ölçümler alınmıştır. Tasarlanan immunosensörün geniş kapsamlı optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İndiyum Kalay Oksit Kaplı Polietilen Teraftalat Elektrot (ITO-PET Elektrot), Kreatin Kinaz (CK), 3- Glisidokpropiltrimetoksisilan (3-GOPS)

## ABSTRACT

# DETECTION OF CREATINE KINASE BY USING A DISPOSABLE IMMUNOSENSOR BASED ON INDIUM THIN OXIDE COVERED FLEXIBLE ELECTRODES

Büşra Nur YENİ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering and Material Engineering

Supervisor: PhD. Burçak DEMİRBAKAN

29/08/2023, 46

Creatine kinase is one of the phosphate-binding sub-branches of creatinine. It is an important factor for muscle tissue with its participation in the synthesis of ATP. Creatine kinase has the main role as an important biomarker in the early diagnosis and follow-up of the treatment process in cardiovascular diseases. In this thesis, an electrochemical immunosensor was designed using immobilization methods for the detection of creatine kinase biomarker. Indium tin oxide coated polyethylene terephthalate (ITO-PET) was used as the working electrode of the designed immunosensor. It was modified with the binding agent 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane (3-GOPS) for covalent interactions of antibody proteins to the electrode surface. Thus, better adhesion of the antibody to the surface of the ITO-PET electrode was achieved. Measurements were taken with electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and Cyclic voltammetry (CV) methods at every stage of the biosensor designed to provide control. Comprehensive optimization and characterization studies of the designed immunosensor were performed.

**Keywords:** Indium Tin Oxide Coated Polyethylene Terephthalate Electrode (ITO-PET Electrode), Creatin Kinase (CK), 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane (3-GOPS)



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi

### BİRİNCİ BÖLÜM

#### GİRİŞ

1

### İKİNCİ BÖLÜM

#### KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

6

2.1. Önceki Çalışmalar .....	6
------------------------------	---

### ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

9

3.1. Kullanılan Materyaller.....	9
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar .....	9
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	9
3.2. CK İmmunosensörünün Temizlik Prosedürü .....	10

3.3. CK İmmunosensörünün İmmobilizasyon Aşaması .....	10
3.3.1. CK İmmunosensörünün OH İmmobilizasyonu .....	11
3.3.2. CK İmmunosensörünün 3-GOPS İmmobilizasyonu.....	11
3.3.3. CK İmmunosensörünün Anti-CK İmmobilizasyonu .....	12
3.3.4. CK İmmunosensörünün BSA İmmobilizasyonu .....	12
3.4. CK İmmunosensörünün Optimizasyon Aşamaları .....	12
3.4.1. CK İmmunosensörünün 3-GOPS Konsantrasyon Optimizasyonu .....	13
3.4.2. CK İmmunosensörünün Anti-CK Konsantrasyon Optimizasyonu.....	13
3.4.3. CK İmmunosensörünün Anti-CK Süre Optimizasyonu .....	13
3.4.4. CK İmmunosensörünün CK Süre Optimizasyonu .....	14
3.5. CK İmmunosensörünün Karakterizasyon Aşamaları .....	14
3.5.1. CK İmmunosensörünün Tekrarlanabilirlik Aşaması .....	14
3.5.2. CK İmmunosensörünün Tekrar Üretilirlik Aşaması.....	15
3.5.3. CK İmmunosensörünün Seçicilik Aşaması .....	15
3.5.4. CK İmmunosensörünün Rejenerasyon Aşaması.....	15
3.5.5. CK İmmunosensörünün Depo Aşaması.....	16
3.5.6. CK İmmunosensörünün İnsan Serumu ile Çalışma Aşaması .....	16

**DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**  
**ARAŞTIRMA BULGULARI** 17

4.1. CK İmmunosensörünün İmmobilizasyon Aşaması .....	17
4.2. CK İmmunosensörünün Optimizasyon Aşamaları .....	18
4.2.1. CK İmmunosensörünün 3-GOPS Konsantrasyon Optimizasyonu .....	19
4.2.2. CK İmmunosensörünün Anti-CK Konsantrasyon Optimizasyonu.....	21
4.2.3. CK İmmunosensörünün Anti-CK Süre Optimizasyonu Aşaması.....	22
4.2.4. CK İmmunosensörünün CK Süre Optimizasyonu .....	23

4.3. CK Biyosensörünün Lineer Grafiği.....	25
4.4. CK Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamaları .....	27
4.4.1. CK İmmunosensörünün Tekrarlanabilirlik Aşaması .....	27
4.4.2. CK İmmunosensörünün Tekrar Üretilebilirlik Aşaması.....	28
4.4.3. CK İmmunosensörünün İmmunosensörü Seçicilik Aşaması.....	29
4.4.4. CK İmmunosensörünün Rejenerasyon Aşaması.....	30
4.4.5. CK İmmunosensörünün Depo Kapasitesi Aşaması .....	31
4.5. CK İmmunosensörünün SEM Görüntüsü.....	32
4.6. CK İmmunosensörünün AFM Görüntüsü .....	34
4.7. CK İmmunosensörünün Serum Örnekleriyle Çalışma Aşaması .....	37
4.8. CK İmmunosensörü Kramers Kronig Analizi .....	38
<b>BEŞİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	
	40
KAYNAKÇA .....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	I

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
°	Derece
3-GOPS	3-Glisidokpropiltrimetoksisilan
Anti-CK	Anti Kreatin Kinaz
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Ag/AgCl	Gümüş/ Gümüş klorür
BSA	Serum Sığır Albumin
C°	Santigrat
CK	Kreatin Kinaz
cm	Santimetre
CV	Döngüsel Voltamogram
Dk	Dakika
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektrumu
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
Hz	Hertz
ITO	İndiyum Kalay Oksit
ITO-PET	İndiyum Kalay Oksit Kaplı Polietilen Teraftalat
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Miktar Limiti
mm	Milimetre
ng	Nano Gram
NH <sub>4</sub> OH	Amonyum Hidroksit
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
pg/mL	Pikogram/mililitre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TUBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
V	Volt
RSD	Bağıl Standart Sapma

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	CK immunosensörü 3-GOPS konsantrasyon optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve $R^2$ değerleri	20
<b>Tablo 2</b>	CK immunosensörü anti-CK konsantrasyon optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve $R^2$ değerleri	22
<b>Tablo 3</b>	CK immunosensörü anti-CK inkübasyon süresi optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve $R^2$ değerleri	23
<b>Tablo 4</b>	CK immunosensörü CK inkübasyon süresi optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve $R^2$ değerleri	25
<b>Tablo 5</b>	CK immunosensörünün optimizasyon çalışmasına ait değerler	25
<b>Tablo 6</b>	Tekrar üretilebilirlik grafiğinin denklemi ve $R^2$ değerleri	29
<b>Tablo 7</b>	CK İmmunosensörü Serum Örnekleri Çalışması Analizleri	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Biyosensörün Ölçüm Aşamasının İç Akış Şeması	4
Şekil 2	CK immunosensörü için ITO-PET elektrot yüzeyine immobilizasyon şeması	11
Şekil 3	A; CK immunosensörü immobilizasyon aşamalarına ait EIS eğrileri ve CV voltamogramları	18
Şekil 4	CK immunosensörü için 3-GOPS konsantrasyon optimizasyonu CK (pg/mL) - $\Delta$ RCT(OHM) grafiği ve seçilen değer (% 0,05 3-GOPS)	20
Şekil 5	CK immunosensörü için Anti-CK konsantrasyon optimizasyonu CK (pg/mL)- $\Delta$ RCT(OHM) grafiği ve seçilen değer (3,7 ng/mL Anti-CK)	21
Şekil 6	CK immunosensörü için Anti-CK süre optimizasyonu CK (pg/mL)- $\Delta$ RCT(OHM) grafiği ve seçilen değer (45 dakika)	23
Şekil 7	CK immunosensörü için CK süre optimizasyonu CK (pg/mL)- $\Delta$ RCT(OHM) grafiği ve seçilen değer (30 dakika)	24
Şekil 8	CK immunosensörünün BSA adımı sonrasında belirlenen CK konsantrasyonları ile oluşturulmuş EIS eğrileri grafiği	26
Şekil 9	CK immunosensörünün BSA adımı sonrasında belirlenen CK konsantrasyonları ile oluşturulmuş Döngüsel Voltamogram değerleri grafiği	26
Şekil 10	CK immunosensörünün lineer grafiği	27
Şekil 11	CK immunosensörünün tekrar üretilebilirlik grafiği (n=10)	28
Şekil 12	CK immunosensörünün seçicilik grafiği	30
Şekil 13	CK immunosensörünün rejenerasyon grafiği	31
Şekil 14	CK immunosensörü depo kapasitesi grafiği	32
Şekil 15	CK immunosensörü SEM görüntüleri. (A: ITO-PET elektrotunun immobilizasyon işlemleri yapılmadan önceki yüzeyinin görüntüsüdür. B: Hidroksilleme aşamasından sonra alınan ITO-PET elektrot görüntüsüdür. C: Elektrotun GOPS bağlayıcı ajanı gece boyu uygulandıktan sonraki alınan elektrot görüntüsüdür. D: ITO-PET yüzeyine anti-kreatin kinaz ile inkübe ettikten sonra alınan elektrot mikroskop görüntüsüdür. E: BSA uygulamasından sonra alınan elektrot görüntüsüdür. F: CK inkübasyonu sonrası çekilen ITO-PET görüntüsüdür).	33
Şekil 16	CK immunosensörü AFM görüntüleri. (A: ITO-PET elektrotunun immobilizasyon işlemleri yapılmadan önceki yüzeyinin görüntüsüdür. B: Hidroksilleme aşamasından sonra alınan ITO-PET elektrot görüntüsüdür. C: Elektrotun GOPS bağlayıcı ajanı gece boyu uygulandıktan sonraki alınan elektrot görüntüsüdür. D: ITO-PET yüzeyine anti-kreatin kinaz ile inkübe ettikten sonra alınan elektrot mikroskop görüntüsüdür. E: BSA uygulamasından sonra alınan elektrot görüntüsüdür. F: CK inkübasyonu sonrası çekilen ITO-PET görüntüsüdür.)	36
Şekil 17	CK immunosensörü Kramers-Kronig / gerçek zamanlı EIS ölçümleri grafiği	39

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar dünyada yılda 17 milyon ülkemizde yılda 200 bin kadar ölüme sebep olmakla birlikte en yaygın 2. ölüm sebebidir. Türk Kardiyoloji Derneği verilerine göre ülkemizde meydana gelen ölümlerin % 40'ından fazlası kardiyovasküler hastalıklar kaynaklıdır (Türk Kardiyoloji Derneği, 2022). Dünya Sağlık Örgütü bu oranın değiştirilen diyet alışkanlıkları ve spor ile birlikte % 75 azaltılabileceğini bildirmiştir (WHO, 2022). Bu nedenle kardiyovaskülerin hastalıkların erken teşhis hayati önem taşımaktadır.

Kardiyovasküler hastalıkların erken tanısında kullanılan kardiyak biyobelirteçler, akut miyokard enfarktüsleri gibi kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavisinde çok önemli bir role sahiptir (Demirbakan vd., 2022). Çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tanısında kullanılan bazı moleküllerin duyarlılıkları ve özgüllükleri üzerine günümüzde de pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu kapsamda KVH'lere özgüllüğü arttırmak için pek çok yeni molekül biyobelirteç olarak denenmekte ve test edilmektedir. (Thupakula vd.,2022)

Geliştirilen biyobelirteçler KVH'lerin; doğru zamanda, özgül bir şekilde tespitinde ve tedavisinde de büyük önem taşımaktadır (Onat vd., 2022). Doğru zamanda teşhis, müdahale ve tedavinin başlatılması için en kritik özelliktir. Bunun yanında kapsamlı olarak KVH hastalıkların ilk tanısında kullanılan biyobelirteçler; protein/enzim tabanlı, genom tabanlı, karbonhidrat tabanlı ve lipid türevleri olarak da sıralanabilir. Günümüzde kullanılan KVH biyobelirteçleri arasında ilk olarak analiz edilenler; miyokardiyal enzimler, miyokardiyal proteinler, peptidler olarak sıralanabilir. (Thupakula vd.,2022)

Kreatin kinaz enzimi kardiyovasküler hastalıklarda karakterize edilmiş bilinen önemli bir biyobelirteç olarak öne çıkmaktadır (Chaulin ve Duplyakov, 2020). Kreatin Kinaz (CK), en yüksek seviyede kas hücrelerinde yer alan, kas dokusundan kana akan bir enzimdir. Bununla birlikte yüksek ve değişken enerji gereksinimleri olan hücrelerde enerji metabolizması için önemli bir enzim olan kreatin kinaz, bir fosforil grubunun fosfokreatinden ADP'ye geri dönüşümlü transferini katalize eder. CK, iskelet kası,

miyokard ve beyinde büyük miktarlarda bulunan hücre içi bir enzimdir. Hipoksi veya diğer yaralanma nedeniyle hücre zarlarının bozulması, CK'yi hücresel sitozolden sistemik dolaşıma salar. Bu temelde, yüksek serum CK seviyeleri, miyokard enfarktüsü için duyarlı bir test olarak kullanılmıştır (Brewster vd., 2020).

CK, M ve B olarak adlandırılan iki alt birimden oluşan dimerik bir moleküldür. Bu alt birimlerin kombinasyonları vücut dokularında CK-MM (Kas), CK-MB (Kalp) ve CK-BB (Beyin) izoenzimlerini oluşturur (Shah vd., 2007; Christenson vd., 1997). CK'nin kalp kasına spesifik olan izoenzim formu CK-MB'dir. CK'nin izoenzimi olan CK-MB'nin kan serumundaki konsantrasyonu miyokard hücre hasarına oldukça spesifik bir derecede yükseliş gösterir ve akut miyokard enfarktüsü için klinikte bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Lai vd., 2016). Kalp kaslarında zarar olduğunu ortaya koymak için, CK-MB içeriğindeki %5'lik artış önem taşımaktadır.

CK-MB serumda göğüs ağrısının başlangıcından yaklaşık 4 ila 6 saat sonra tespit edilebilmektedir ve miyokard enfarktüsü gibi durumlarda 10 ila 12 saat içerisinde serumda en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Uzun zamandır kardiyoloji alanında , miyokarda meydana gelen hasarın erken tanı konusunda en iyi gösterge olarak kabul görmektedir (Amsterdam vd., 2014). Serumdaki CK-MB düzeylerinin tek bir ölçümden ziyade, belirli periyotlarla ölçülmesi tanı için daha doğru veriler sunmaktadır.

Bu çalışma, Kreatin Kinaz tespiti için bir biyo-tanımaya modeli oluşturmayı amaçlamaktadır.

Biyosensörler temelde tanıma elemanı ve dönüştürücüden oluşan; reaksiyondaki aranan molekülün (enzim, hücre, antikor, antijen vb.) varlığı ve varsa miktarı tespit edilmek istenen ilgili maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak sinyaller üreterek çeşitli reaksiyonları ölçen bir cihazdır (Vigneshvar vd., 2016).

Biyosensörler dinamik ve statik özelliklere sahiptirler. Bu özellikler; seçicilik, tekrar üretilebilirlik, kararlılık, duyarlılık, doğrusallık, tekrarlanabilirlik şeklinde sıralanabilir.



İmmunosensörler, bir antikor antijen bağlanmasını sağlayan immünokimyasal tepkimelerin bir transdüser yardımıyla analiz edilmesine yarayan belirteçlerdir. Başarılı bir immünosensörden artan antijeni tespit etme kabiliyetinin yüksek olması beklenmektedir.

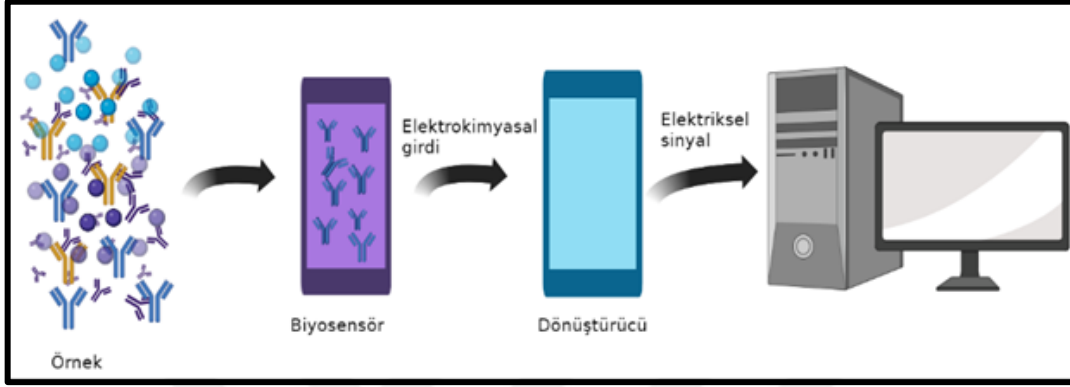
Elektrokimyasal immunosensörler, elektrik enerjisi yardımıyla oluşan reaksiyon sonucunda spesifik antijen-antikor bağlanmasının saptanmasında kullanılan sensörlerdir. Bu sensörler bir belirteç elemanının elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile oluşturulmaktadır. Bir redoks probu içerisinde gerçekleştirilen indirgenme- yükseltgenme tepkimeleri ve bu tepkimeler sonucunda oluşan difüzyona karşı elektrodun verdiği direnç ölçülmektedir (empedans). Ölçülen direnç bir dönüştürücü yardımıyla ekrana sinyal olarak aktarılır ve analiz edilir. Direnç arttıkça sinyalin yükselmesi beklenmektedir (Mollarasouli vd., 2019).

Yapılan çalışmalar bir redoks probu (fosfat tamponu) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle elektrot yüzeyindeki kimyasal etkileşimlerin oluşturduğu potansiyel yük direncinin ölçülebilmesi için elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döğüsel voltametre (CV) yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan her adımda oluşan kimyasal reaksiyonların sebep olduğu akım ve potansiyel değişim EIS ve CV yöntemleri ile kantitatif olarak gözlenmektedir.

EIS temel olarak elektrokimyasal bir reaksiyon içerisinde ölçülen parametrenin reaksiyonda oluşan difüzyona gösterdiği direncin ölçüm yöntemini tanımlamaktadır. EIS, bir biyo algılama sistemi olarak klinik tanıda; elektrotun yüzeyinde oluşan antikor-antijen algılama, hücre tanıma ve enzim-substrat ilişkisinin analizlerinde yaygın olarak kullanılan oldukça kuvvetli bir yöntemdir. Direnç, empedans değeri olarak adlandırılır. Oluşan empedans analiz aşamasında sinyal olarak gösterilmektedir. Noktasal ölçüm alınması dolayısıyla oluşan sinyaller de zamana bağlı tek nokta dirençleri şeklinde grafiğe aktarılır. Analiz yapılırken grafikte empedans arttıkça sinyal artışı gözlemlenmesi beklenmektedir (Magar vd., 2021).

CV yöntemi elektrokimyasal analizlerde indirgenme- yükseltgenme dönüşümlerinin eş zamanlı olarak incelenmesinde kullanılan oldukça faydalı bir yöntemdir. Kullanılan

elektrota aynı oranda düşük ve yüksek potansiyelerde akım verilerek elektrotun potansiyeli gözlemlenir. CV ölçümleri bu deney için elektrot yüzeyinin düzenli ve yüzeyin tamamında aynı kararlılıkta olduğunu göstermek amacıyla yapılmaktadır. EIS metodunu doğrulamak için kullanılmaktadır.



Şekil 1. Biyosensörün Ölçüm Aşamasının İç Akış Şeması

ITO-PET (İndiyum Kalay Oksit Polietilentereftalat) yarı iletken polimer bir film yüzeyine sahip esnek bir elektrot malzemesidir. Tek kullanımlık olan bu elektrot, ucuz ve kolay üretilir olması sebebiyle klinik kullanıma oldukça uygundur (Wang ve Sun, 2022). ITO-PET şeffaf ve iletken olma özelliği ile çeşitli elektrokimyasal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dayanıklı yapısı sayesinde ITO-PET geniş çalışma aralığı sunmaktadır. Çok düşük konsantrasyonların analiz edilmesinde verimli sonuçlar alınan bir elektrot çeşitidir. SAM (Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka) tabakası oluşturulurken yüzey tutunmaları için ITO-PET elverişli bir ortam sunmaktadır. Uygun maliyetli olması sebebiyle aynı uygulamalarda kullanılan diğer elektrotlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedir (Özcan, 2023).

Kurulan elektrokimyasal immünosensör devresi bir redoks probu içerisinde çalışır ve üç elektrot sisteminden oluşur. Bunlardan ilki referans elektrottur. Çalışma elektrotunun potansiyelini belirlemek amacıyla referans noktası olarak kullanılır. Bu çalışma için referans elektrotu olarak Ag/Cl kullanılmıştır. Diğer çalışma elektrotudur. Bu tez çalışması için çalışma elektrotu olarak ITO/PET elektrotu kullanılmıştır. Çalışma elektrotu tüm

immobilizasyon uygulamalarının yapıldığı ölçüm elektrotudur. Üçüncü elektrot ise karşıt elektrot olarak adlandırılır. Devredeki potansiyel akımı tamamlaması için kullanılır. Bu tez çalışmasında karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Üçlü elektrot sistemi potansiyostata bağlıdır ve alınan direnç ölçümleri bir dönüştürücüye aktarılır (Özyurt, 2023).



## İKİNCİ BÖLÜM

### KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Önceki Çalışmalar

Marranni ve arkadaşları optik okumalar yapan cihazlar için daha kaliteli sinyal alabilecekleri bir elektrot arayışına çıkmış ve indirgenmiş grafen oksit (r GO) ile indiyum kalay oksit / polietilen teraftalat ikili ara yüzünü geliştirmişlerdir. PBS tampon solüsyonunda 3 farklı potansiyel değeri (10, 20, 50 Mv/s) denenmiştir. Referans elektrot olarak Ag/AgCl kullanılmıştır. Sonuç olarak aldıkları CV sinyallerini karşılaştırdıklarında tek adımlı metot kolay ve doğrudan olmasına karşın daha az anlaşılabilir sinyal oluşturmuştur, iki adımlı metot ise (r GO / ITO/PET) daha yüksek, açıkça okunabilen ve indirgenme parametrelerinin daha kolay ayarlanabildiği sinyal vermiştir (Marranni vd., 2019).

Supraja ve arkadaşları bir kardiyovasküler biyobelirteç olan Troponin T'nin hidrotermal olarak sentezlenmiş ZnSnO<sub>3</sub> tespiti için camsı karbon elektrot kullanılmıştır ve heterojen bir çalışma ortamı elde edilmiştir. Bunun yanı sıra Supraja ve arkadaşları ITO/PET elektrot ile de çalışmış, ITO/PET üzerine ZnSnO<sub>3</sub>'ün elektrokimyasal olarak bağlanması sağlanmış ve bir ITO/PET çalışma elektrodu elde edilmiştir. Troponin T için çapraz bağlayıcı olarak EDC/NHS kullanılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada oluşturulan elektrot sisteminin ölçüm aralığı en düşük 1 fg/mL ile en yüksek 1 µg/mL olarak belirtilmiştir. Ölçümler EIS yöntemi ile yapılmıştır. Araştırmanın ITO/PET ile yapılan elektrot ölçümlerine dayanarak hesaplanan LOD (ölçüm limiti değeri) 0,571 fg/mL bulunmuştur (Supraja vd., 2019).

Geng ve arkadaşları, altın nano partikülünü (AuNP) kullanarak kardiyovasküler hastalıkların bir biyobelirteci olan CK ölçümü için elektrot tasarlamıştır. Elektrot EIS yöntemi ile ölçülmüştür. Geng ve arkadaşları ölçüm aralığını en düşük 10 ng/mL ile en yüksek 0,5 µg/mL olarak belirlemişlerdir. AuNP kaplama için yüzey olarak ITO glass kullanılmıştır. Redoks probu olarak [Fe (CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>]<sup>4-</sup> (ferri-ferro tamponu) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada LOD değeri 5,3 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Daha sonra klinik

araştırmalara uyarlanabilirliğini gözlemlemek adına elektrot insan serumu ile de çalışılmıştır (Geng vd., 2017).

Ahammad ve arkadaşları kardiyak biyobelirteci troponin I'in elektrokimyasal ölçümleri için altın nanopartikül kaplanmış ve ITO tabanlı elektrot üretmişlerdir. OCP (açık devre potansiyeli) yöntemi kullanılarak ölçümler alınmıştır. Referans aralığı 1 ng/mL- 100 ng/mL arasında belirlenmiştir. GNP-ITO yüzeyi oluşturulurken bağlayıcı ajan olarak sistamin ve gluteraldehit kullanılmıştır (Ahammad vd., 2011).

Demirbakan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada kardiyovasküler hastalıkların biyobelirteci olan kreatin kinaz enziminin tespiti için elektrokimyasal bir immunosensör tasarlamıştır. Tasarlanan sensör grafit kâğıt tabanlıdır. Ölçümler EIS yöntemi ile alınmıştır. Referans aralığı 0,1pg/mL–50 pg/mL olarak belirlenmiştir. Elektrotun stabil durumunu test etmek amacıyla tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, yeniden kullanılabilirlik, seçicilik ve depo kapasiteleri ölçülmüştür. LOD değeri 0,045 pg/mL ve LOQ değeri 0,171 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Elektrot daha sonra insan serumu ile test edilmiştir. Böylece klinik alanında kullanılabilirliği gösterilmiştir (Demirbakan vd., 2022).

Moreira ve arkadaşları CK tayini için Au-SPE altın – screen printed elektrot tasarlamışlardır. Elektrot hazırlanırken amin grupları açısından zenginleştirilmek için sistamin uygulanmıştır. EIS ve CV değerleri ölçülerek oluşan bağlanmalar her aşamada kontrol edilmiş ve modifikasyonların gözlenmesi amaçlanmıştır. Analitik özellikler kare dalga voltametri (SWV) ile ölçülmüştür. Üretilen elektrotun seçicilik özelliği CK yerine diğer komponentler (troponin T, BSA, myoglobin) kullanılarak araştırılmıştır. Makalede elektrotun kararlılığı, hassasiyeti, seçicilik özelliği övülmüştür (Moreira vd., 2014).

Wang ve arkadaşları CK -MB saptaması için sandviç modeli baz alınan elektrokimyasal bir immunosensör üretmişlerdir. Komponent PdPtCoNi@Pt-skin AuNP nanostars şeklindedir. Redoks tepkimeleri için tionin kullanılmıştır. Elektrodun lineer aralığı

0,001–2500 ng/mL olarak belirlenmiştir. LOD değeri 0,62 pg/mL, S/N = 3 olarak hesaplanmıştır (Wang vd., 2022).

Dissanayake ve arkadaşları florasan tabanlı bir sensör tasarlayarak CK-MM tayinini amaçlamışlardır. Sensör florasan titanyum nanocluster TiNC olarak adlandırılmaktadır. Referans aralığı 0,625 U/L- 10 U/L olarak belirlenmiş olan sensör insan serumunda çalışıldığında LOD değeri 0,2513 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer 0,3465 ng/ml gibi minimum değerdeki insan serumundan elde edildiği için makalede elektrotun ölçüm hassasiyeti övülmüştür. Titanyumun fosfat ile yaptığı güçlü bağlar referans alınarak kararlı bir sensör yapısı oluşturulduğuna değinilmiştir (Dissanayake vd., 2022).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Materyaller

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışma üçlü elektrot sistemi ile yapılmıştır. Referans elektrotu olarak 3M Ag/AgCl, çalışma elektrotu olarak ITO-PET elektrotlar (2 mm x 20 mm), karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Kimyasal olarak aseton, sabun solüsyonu, amonyum hidroksit, hidrojen peroksit, 3-GOPS, toluen, BSA (sığır serum albümin), PBS (fosfat tamponu), kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler için redoks probu olarak  $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$  kullanılmıştır. ITO-PET elektrotunun klinik uyumluluğunun test edilmesi için insan serumu uygulamaları amacıyla yapay Kreatin Kinaz antijeni Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır.

Bütün kimyasallar ve ITO-PET filmler Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tüm çalışma boyunca kullanılan ultra saf su, Elga LC134 sisteminden (18,2M $\Omega$  / cm) elde 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  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  50mM PBS çözeltisi (pH 7,4) içinde yapılmıştır.

Biyosensörün immobilizasyon adımlarında yüzeyde meydana gelen morfolojik değişimleri inceleyebilmek için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOBİLTUM)

Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde mevcut olan JEOL JSM-7100F marka Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır.

### **3.2. CK İmmunosensörünün Temizlik Prosedürü**

2mm x 20 mm boyutlarındaki ITO-PET elektrodu iletken kısmı koruyucu bir film ile kaplı halde gelmektedir. Buna karşın elektrodun stabilitesini koruyabilmek adına dış analitlerden temizlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple elektrot yıkama aşamalarından geçirilmiştir. Bu aşamalar sırasıyla;

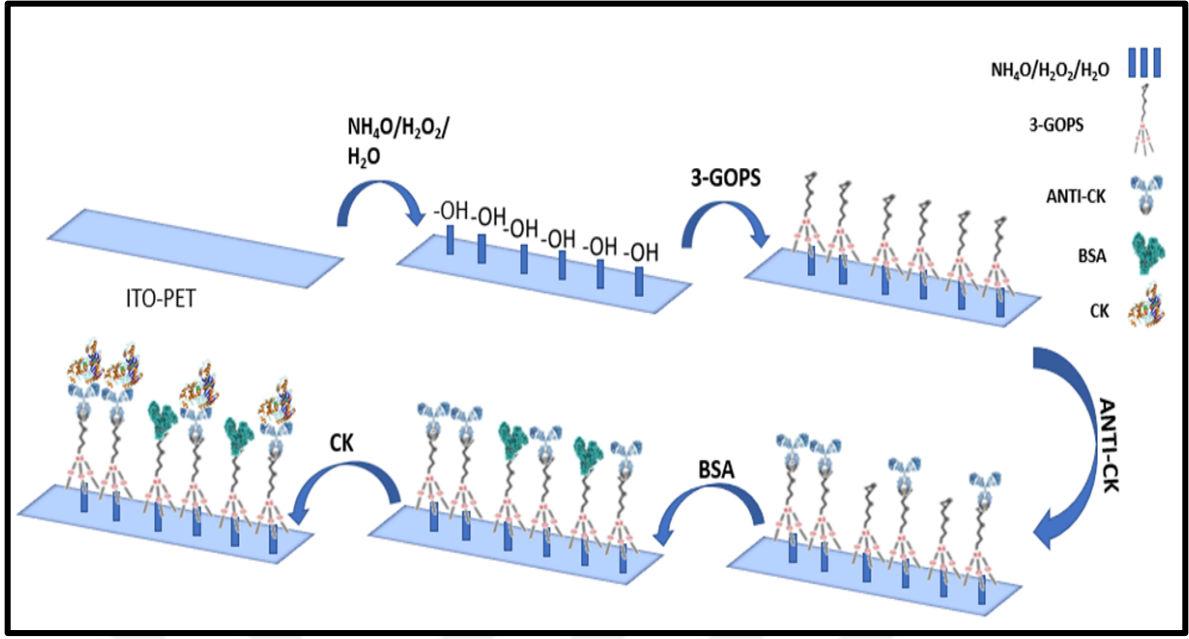
- 1) 10 dakika aseton solüsyonu içerisinde inkübasyon.
- 2) 10 dakika sabun solüsyonu içerisinde inkübasyon.
- 3) 10 dakika ultra saf su içerisinde inkübasyon.

Bu aşamaların hepsi 24 °C'de sonikasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yıkama aşamasında elektrot yüzeyini daha kararlı ve doğru sonuçlar elde edebilmek adına immobilizasyon aşamasına hazırlamak amaçlanmıştır. Kısaca immobilizasyonun başarılı ve homojenize dağılımının temel aşaması iyi bir yıkama ile başlamaktadır.

### **3.3. CK İmmunosensörünün İmmobilizasyon Aşaması**

İmmobilizasyon aşaması bir biyo-algılama sisteminde kararlı ve doğrusal sonuçlar elde edilmesi için en önemli adımlardan biridir. Tüm elektrot yüzeyini eşit miktarda ve homojenize şekilde immobilize etmek, oluşturulan immunosensörün ölçüm çıktılarının doğruluğunu ve stabil oluşunu desteklemektedir. Sırasıyla birbirini takip eden OH; 3-GOPS; Anti-CK; BSA modifikasyon adımları sonucunda elektrot yüzeyinin SAM tabakası tamamlanmış olur.





Şekil 2. CK immunosensörü için ITO-PET elektrot yüzeyine immobilizasyon şeması

İmmunosensörün immobilizasyon aşamasında ITO-PET elektrot yüzeyine sırasıyla, OH, 3-GOPS, ACK ve BSA modifikasyonları yapılmıştır (Şekil 2). İnkübasyonlar sonrası CK immunosensörü ultra saf su ile yıkanmıştır. Her aşama EIS ve CV yöntemleri ile ölçülmüştür.

### 3.3.1. CK İmmunosensörünün OH İmmobilizasyonu

OH immobilizasyonu için 0,5 ml hacmindeki ependoflara Amonyum Hidroksit/ Hidrojen peroksit/ Ultra Saf Su (1:1:5) solüsyonu hazırlanmıştır. Yıkanan elektrotlar 90 dakika boyunca hazırlanan solüsyon ile inkübe edilmiştir. Amaç elektrot yüzeyini hidroksil grupları açısından zenginleştirmektir. Böylece antikor bağlayıcı ajan olan 3-GOPS'un tutunması için uygun SAM yüzeyi oluşturmak hedeflenmiştir.

### 3.3.2. CK İmmunosensörünün 3-GOPS İmmobilizasyonu

3-GOPS kimyasal yapı olarak silan ve metoksi uçlara sahip bir bileşiktir. Gerçekleştirilen literatür araştırmaları ışığında 3-GOPS'un metoksi ucunun hidroksillenmiş

elektrot yüzeyine bağlanması ve silan uçlarının açık kalarak hedeflenen antikoru amonyum uçlarından yakalaması beklenmektedir. Bu amaçla %1, %0,5, %0,1 konsantrasyonlarında 3-GOPS/ Toluen solüsyonu hazırlanarak elektrot hazırlanan solüsyon içerisinde 16 saat boyunca (over night) inkübe edilmiştir.

### **3.3.3. CK İmmunosensörünün Anti-CK İmmobilizasyonu**

İmmobilizasyonun bu aşamasında verimli CK yanıtı alabilmek için Anti-CK' nın yüzeye eşit dağılımını sağlamak gerekmektedir. Böylece elektrot yüzeyinin herhangi bir bölgesine CK tutunması olduğunda, ölçüm sırasında aynı kalitede kararlı empedans sinyali almak hedeflenmektedir. Anti-CK stok çözeltisi için tampon olarak PBS kullanılmıştır.

### **3.3.4. CK İmmunosensörünün BSA İmmobilizasyonu**

BSA modifikasyonu immobilizasyonun son aşamasıdır. Amaç 3-GOPS – ACK bağlanmasından sonra bağlanmadan kalan 3-GOPS silan uçlarını bloklamaktır. Böylece EIS ve CV ölçümü alınırken redoks probu içinde oluşan yükseltgenme – indirgenme tepkimeleri sırasında difüzyonda yanıltıcı değişiklikler olmasını ve non-spesifik bağlanmaları engellemektir. Bu amaçla, %0,5 oranında hazırlanan BSA kullanılmıştır. Elektrotlar BSA'da 60 dakika inkübe edilmiştir.

## **3.4. CK İmmunosensörünün Optimizasyon Aşamaları**

CK immunosensörünün tasarımında optimum konsantrasyon ve inkübasyon süresi değerlerini bulmak amacıyla geniş kapsamlı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Detaylı literatür incelemeleri sonucunda belirlenen optimizasyon çalışma değerleri ile her bir optimizasyon çalışması için immobilizasyon aşaması ve sonucunda CK inkübasyonu sonrası EIS ve CV ölçümleri alınarak doğrusal grafikler oluşturulmuştur. Böylece grafiklerin denklemleri ve  $R^2$  değerleri gözlemlenerek ölçümler hem kalitatif hem de kantitatif olarak değerlendirilmiştir. İmmunosensörün immobilizasyon aşaması sırasıyla; 3-GOPS

konsantrasyon optimizasyonu, Anti-CK konsantrasyon optimizasyonu, Anti-CK süre optimizasyonu ve CK süre optimizasyonu şeklinde ilerlemektedir.

### **3.4.1. CK İmmunosensörünün 3-GOPS Konsantrasyon Optimizasyonu**

3-glisidoksi-propiltrimetoksisilan (3-GOPS), silan grupları aracılığıyla yüzeydeki hidroksil gruplarıyla kuvvetli kovalent etkileşimlerde bulunarak elektrot yüzeyinde güçlü SAM tabakasının oluşturulması için avantajlı bir ajandır. 3-GOPS konsantrasyonunun optimize edilmesi, güçlü bir kimyasal yapıya sahip olduğundan daha sonraki aşamalar için önemli bir adımdır. 3-GOPS konsantrasyonunun optimizasyonu için elektrotlar sırasıyla %0,1- %0,5- %1 oranlarında 3-GOPS/ Toluen çözeltisi ile muamele edilmiştir. Elektrotlar gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası elektrotlar öncelikle tolüen ile daha sonra da ultra saf su ile yıkanmıştır.

### **3.4.2. CK İmmunosensörünün Anti-CK Konsantrasyon Optimizasyonu**

Anti-CK konsantrasyon optimizasyonu çalışması kapsamında 3,7- 7,4- 1,8 ng/mL konsantrasyonlarda Anti-CK hazırlanmıştır. Çözelti tamponu olarak PBS kullanılmıştır. Bu aşamada en verimli Anti-CK- CK bağlanması sağlayacak konsantrasyonu tespit etmek hedeflenmiştir. İnkübasyon sonrası elektrotlar ultra saf su ile yıkanmıştır.

### **3.4.3. CK İmmunosensörünün Anti-CK Süre Optimizasyonu**

Bu aşamada 3-GOPS modifikasyonu sonrası elektrot yüzeyine immobilize edilecek olan Anti-CK'nın inkübasyon süresinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Anti-CK süre optimizasyonu çalışmaları için 3 farklı inkübasyon süresi seçilmiştir. Bunlar; 30 dk, 45 dk ve 60 dk şeklindedir.

### 3.4.4. CK İmmunosensörünün CK Süre Optimizasyonu

CK süre optimizasyonu çalışmaları kapsamında immobilizasyon aşamaları (OH, 3-GOPS, ACK, BSA) tamamlanmış olan ITO-PET elektrot tez çalışması dahilinde belirlenen 8 farklı (0,1 pg/ mL – 0,5 pg/mL – 1 pg/mL – 5 pg/mL– 25 pg/mL – 50 pg/mL – 125 pg/mL – 250 pg/mL ) konsantrasyonda inkübe edildikten sonra EIS ölçümleri yapılmaktadır. CK inkübasyonunda optimum sürenin belirlenmesi amacıyla bu aşama 3 farklı zaman aralığı seçilerek gerçekleştirilmiştir. Bu süreler sırasıyla; 30 dk, 45 dk ve 60 dk şeklindedir.

### 3.5. CK İmmunosensörünün Karakterizasyon Aşamaları

Optimizasyon sonrası seçilen optimum değerler ışığında karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları için sırasıyla; tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, rejenerasyon, seçicilik ve depo deneyleri yapılmıştır. Sonuçlar EIS ve CV yöntemleri ile ölçülmüştür.

#### 3.5.1. CK İmmunosensörünün Tekrarlanabilirlik Aşaması

Tekrarlanabilirlik bir biyosensörün kararlılığının kanıtlanması için büyük öneme sahiptir. Tekrarlanabilirlik aşaması için lineer grafikte seçilen sabit bir CK antijen konsantrasyonunda, aynı koşullarda hazırlanmış 20 elektrot ölçümü gerçekleştirilmiştir. Uygulamanın amacı elektrotların 20 tekrarlı ölçüm boyunca kabul görecekte sonuç vermesi ve düşük standart sapmaya sahip olmasıdır. Bu çalışmada belirlenen CK konsantrasyonu 125 pg/ mL'dir. Aynı koşullar altında 20 ayrı elektrot, immobilizasyon aşamaları uygulandıktan sonra 125 pg/mL konsantrasyondaki CK ile inkübe edilmiştir. Çıkan sonuçlara göre standart sapma, ortalama değer, varyasyon katsayısı ve bağıl standart sapma değeri (RSD) hesaplanmıştır.

### **3.5.2. CK İmmunosensörünün Tekrar Üretilirlik Aşaması**

Tekrar üretilirlik deneyleri lineer grafik oluşturulurken belirlenen konsantrasyonlar üzerinden her bir konsantrasyonun 10 defa tekrar edilmesini kapsamaktadır. Bu çalışma ile çalışılan elektrotun her konsantrasyonda beklenen ölçüm aralığında sonuç verdiğini göstermek amaçlanmaktadır. Belirlenen konsantrasyon aralığı 0,1 pg/mL – 250 pg/mL 'dir. Sırasıyla belirlenen 8 nokta konsantrasyonu; 0,1- 0,5 - 5 – 10 -25 – 50 – 125 -250 pg/mL şeklindedir. 8'li gruplar halinde 10 set elektrot immobilizasyon aşamaları tamamlandıktan sonra her bir elektrot seçilen bir konsantrasyonda inkübe edilmiştir. Daha sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

### **3.5.3. CK İmmunosensörünün Seçicilik Aşaması**

Seçicilik çalışmasının amacı diğer analitler ile tespit edilmesi hedeflenen antijeni (CK) elektrot üzerinde karşılaştırabilmektir. Elektrotun CK antijenini seçmekteki yetkinliğini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bunun için 5 ayrı parametre belirlenmiştir; CK, Askorbik Asit, Aflatoxin B, Leptin ve Glutamat. Ek olarak bütün parametrelerini içeren karışım da hazırlanmıştır. Asıl önemli nokta bütün parametrelerin aynı konsantrasyonda olmasıdır. Bu deney için seçilen konsantrasyon 125 pg/mL'dir. Her bir parametre için 3'er elektrot hazırlanmıştır.

### **3.5.4. CK İmmunosensörünün Rejenerasyon Aşaması**

Gerçekleştirilen deneyin amacı elektrotun ölçebilme ve tekrar kullanılabilme kapasitesini değerlendirmektir. Bu kapsamda immobilize edilen elektrot belirlenen konsantrasyondaki CK ile inkübe edilmiştir. EIS ve CV ölçümleri alınır. Daha sonra %0,1 konsantrasyondaki HCL solüsyonunda 3 dakika inkübe edilerek elektrottan marker (CK) uzaklaştırılmıştır. İşlem EIS ölçümlerinde anlamlı değerler alınamayacak seviyeye kadar

tekrar edilmiştir. Bu çalışmada rejenerasyon deneyi 3 tekrar yapılabilmiştir, 2. tekrarda verim düşmüş olup 3. tekrarda elektrot anlamlı bir empedans yanıtı oluşturmamıştır.

### **3.5.5. CK İmmunosensörünün Depo Aşaması**

Depo deneyleri kapsamında elektrotlar immobilize edildikten sonra her hafta bir elektrot CK antijeni ile inkübe edilerek ölçümü alınacak şekilde 11 haftalık ölçümleri kaydedilmiştir. Bu ölçümlerin amacı üretilen ve immobilize edilen elektrotun depo ömrünün tespit edilmesi ve ilerleyen haftalardaki sinyal veriminin ilk haftalar ile karşılaştırılarak immunosensörün kararlı yapısının ölçülmesidir.

### **3.5.6. CK İmmunosensörünün İnsan Serumu ile Çalışma Aşaması**

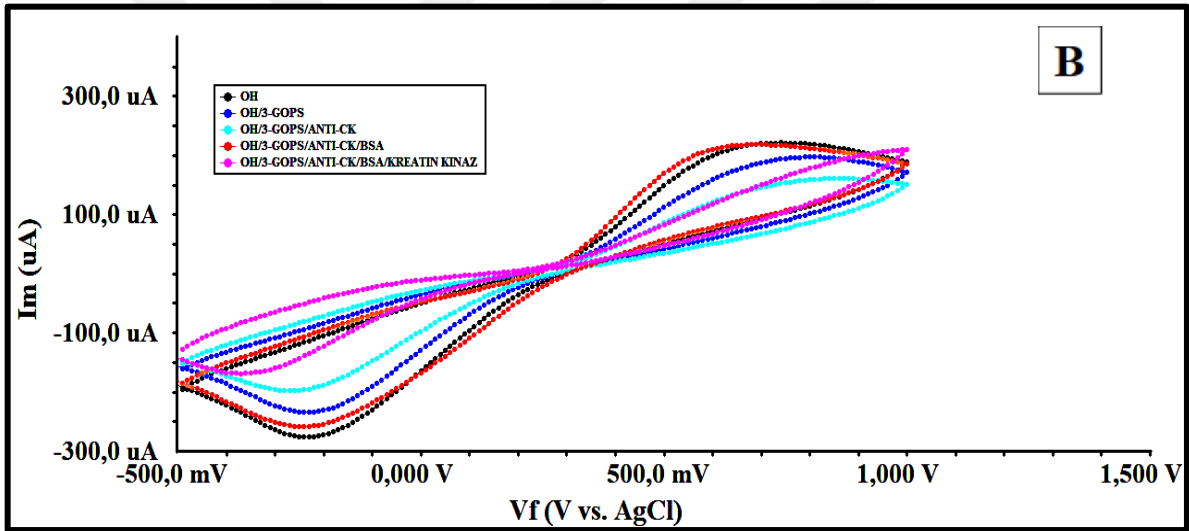
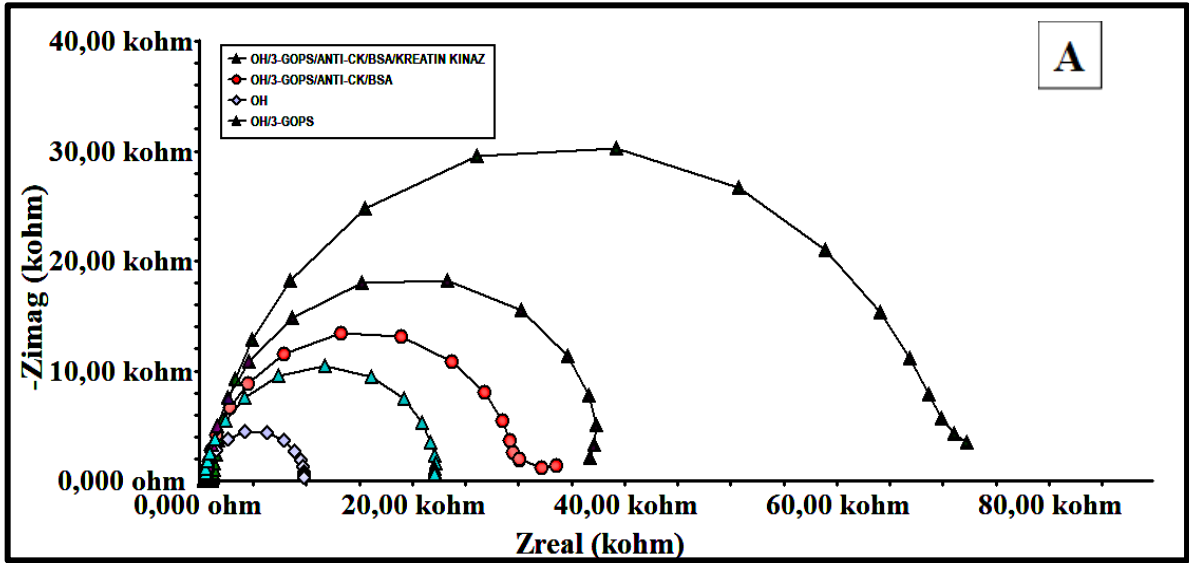
Kreatin kinaz tespiti için üretilen ITO-PET elektrotun optimizasyon ve karakterizasyon deneyleri sonucunda sentetik insan serumu ile ölçümler yapılmıştır. Serumlar test edilmeden önce PBS kullanılarak %0,5 konsantrasyonda hazırlanmıştır. 5 farklı sentetik insan serumu örneği ile 3 eklemeli yöntem kullanılarak çalışma yürütülmüştür. Serum çalışması için bilinen iki farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Bu tez çalışması için belirlenen CK konsantrasyonları 5 pg/mL ve 25 pg/mL'dir. Daha sonra her CK konsantrasyonu (5 pg/mL ve 25 pg/mL) için 5 farklı serum örneğinden üçer adet kopya hazırlanmıştır. Toplamda 30 adet serum örneği elde edilmiştir. Bu örnekler sırasıyla 1. serum örneği için ilk 3'lü grup 5 pg/mL, sonraki 3'lü grup 25 pg/mL ile muamele edilmiştir, inkübasyondan sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. 5 serum örneği için de aynı işlem tekrarlanmıştır. Amaç bilinen bir konsantrasyon değerinin üstüne eklenen bilinmeyen konsantrasyonları belirleyebilmektir. Böylece alınan 3 farklı EIS değeri lineer denklem aracılığıyla hesaplanmış ve ortalaması alınmıştır. Sentetik insan serumlarıyla ölçümlerin amacı üretilen elektrodun klinik araştırmalara uygulanabilirliğinin ispat edilmesidir.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. CK İmmunosensörünün İmmobilizasyon Aşaması

İmmobilizasyon çalışmaları kapsamında sırasıyla OH- 3-GOPS- Anti-CK- BSA ile modifiye edilen ITO-PET elektrotunun her aşamada EIS ve CV ölçümleri alınmış ve yapılan modifikasyonlar kantitatif olarak gözlenmiştir. İmmobilizasyon aşamaları sonucunda elektrotun yüzeyinde SAM tabakası oluşturulmuştur. SAM tabakasının tüm elektrot yüzeyine eşit bir şekilde dağılarak oluşturulması ve kararlı bir yapıda olması yapılan immobilizasyonun başarısı ile doğru orantılıdır. EIS ve CV ölçüm grafikleri Şekil 3 A ve Şekil 3 B’de gösterilmektedir. Şekil 3 A’da gösterildiği gibi OH grupları ITO/PET elektrotu yüzeyine immobilize edildikten sonra yüzey iletkenliği arttığı için (İnce ve Sezgintürk, 2021) direnç azalmaktadır bu nedenle de ölçülen yarım daire EIS sinyali diğer ölçümlere göre düşük çıkmaktadır. 3-GOPS immobilizasyonu sonrası yüzey metoksi ve silan grubuna sahip 3-GOPS ile tamamen kaplandığı için yalıtkanlığı oldukça artmıştır bu nedenle yüksek direnç gösterir ve EIS ölçümü diğer immobilizasyonlara göre yüksektir. 3-GOPS yüzeyde kalabalık bir morfoloji gösterdiği (Şekil 14 C) için ölçüm sonunda içe dönük bir sinyal karakteri sergilemiştir. Anti-CK immobilizasyonu sonrası oluşan EIS grafiği göstermektedir ki yüzeyin iletkenliği 3-GOPS’ a göre artmıştır. Bu nedenle EIS grafiğinde (Şekil 3 A) 3-GOPS yarım daire grafiğinden daha aşağıdadır. BSA immobilizasyonda açık silan uçlarını ve oluşabilecek kovalent olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla kullanıldığı ve moleküler yapı olarak büyük bir protein olduğu için immobilizasyon sonrası ITO-PET elektrot yüzeyinde iletkenlik azalmış ve EIS grafiğinde 3-GOPS’tan düşük fakat Anti-CK’ dan daha yüksek bir yarım daire grafiği oluşturmuştur. Ölçümlere ek olarak son aşamada immobilizasyonu gerçekleştirilen CK immunosensörü 125 pg/mL CK ile inkübe edilmiştir. Şekil 3 A’ daki grafikte yer alan OH/3-GOPS/Anti-CK/BSA/CK ( ▲ ) eğrisi CK ile inkübasyon sonrası EIS ölçüm sonucunu göstermektedir. Böylece immobilizasyonun başarısı CK bağlanma oranı ile ispat edilmiştir. Tüm immobilizasyon aşamalarında ölçülen CV grafiğinde (Şekil 3 B) görülmektedir ki yüzeydeki yalıtkanlık oranı arttıkça oluşan yükseltgenme – indirgenme eğrilerinin arasındaki mesafe kısalmaktadır. Buna göre en kısa CV mesafesine immobilizasyon sonrası CK ile inkübe edilen ITO-PET elektrotun CV grafiğinin sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3. A) CK immunosensörünün immobilizasyon aşamalarına ait EIS eğrileri ve B) CV voltamogramları

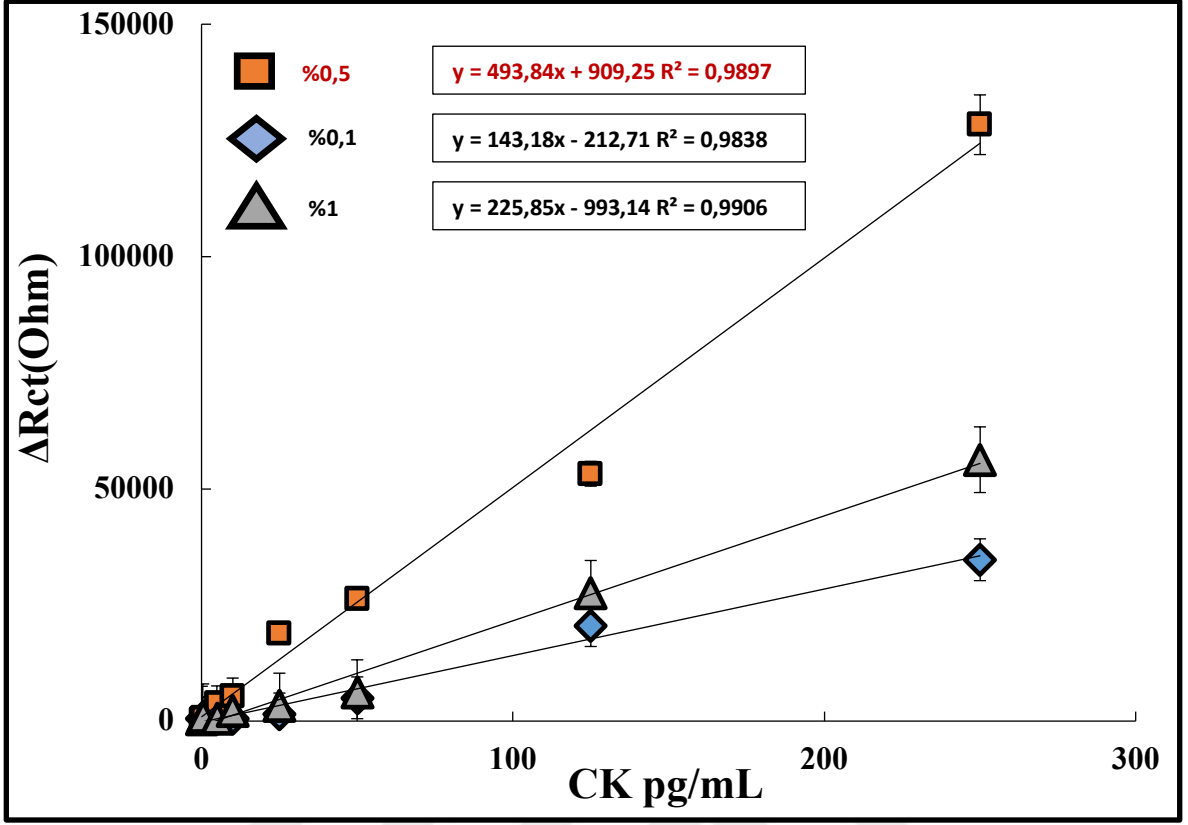
#### 4.2. CK İmmunosensörünün Optimizasyon Aşamaları

CK immunosensörünün optimizasyon sonuçları değerlendirilirken belirlenen optimizasyon parametreleri sonucunda oluşan grafikler, elde edilen sinyal yorumlanarak optimum verimdeki değerler seçilmiştir. Oluşan her grafik için eğim çizgisi, grafiğin denklemi ve  $R^2$  değerleri hesaplanmıştır.



#### 4.2.1. CK İmmunosensörünün 3-GOPS Konsantrasyon Optimizasyonu

3-GOPS konsantrasyon optimizasyonu çalışması amacıyla belirlenen 3 farklı 3-GOPS konsantrasyon değeri ölçülmüştür. Bu değerler; %0,5, %0,1, %1 şeklindedir. Şekil 4'te gösterildiği üzere, %0,5 konsantrasyondaki 3-GOPS değeri; %0,1 ve %1 konsantrasyondaki 3-GOPS değerlerine oranla daha yüksek sinyal vermiştir. Bu çalışmada optimizasyon değerleri arasında karşılaştırma yapılırken %1 konsantrasyondaki 3-GOPS ile yapılan çalışmanın ortaya çıkardığı grafiğin  $R^2$  değeri; %0,5 konsantrasyonda 3-GOPS ile yapılan çalışmadan daha yüksek çıkmış olmasına rağmen, optimizasyon çalışması bütüncül olarak değerlendirildiğinde iki konsantrasyon arasındaki sinyal artışı farkı göz ardı edilemeyecek düzeyde yüksek olduğu için optimum değer seçimi buna göre yapılmıştır. Yapılan immobilizasyonun sinyal çıktıları karşılaştırıldığında %0,5 konsantrasyondaki 3-GOPS, %0,1 3-GOPS ve %1 konsantrasyonlardaki 3-GOPS'a oranla daha yüksek bir yanıt oluşturmuştur. Literatür incelendiğinde görülmektedir ki (İnce vd., 2021), (Demirbakan vd., 2019) yüksek konsantrasyondaki 3-GOPS'un ITO-PET elektrot yüzeyindeki yerleşimi immobilizasyonun geri kalan adımlarını ve özellikle antikor (Anti-CK) immobilizasyonu için dezavantaj oluşturmaktadır. Sonuç olarak; %0,5 konsantrasyondaki 3-GOPS seçilmiştir. Seçim için yapılan analizlerin kantitatif sonuçları Şekil 4'te detaylı olarak gösterilmektedir. Bir sonraki immobilizasyon aşamalarında %0,5 konsantrasyondaki 3-GOPS ile devam edilmiştir.



Şekil 4. CK immunosensörü için 3-GOPS konsantrasyon optimizasyonu CK (pg/mL)-  $\Delta R_{ct}$  (Ohm) grafiği ve seçilen değer (%0,5 3-GOPS)

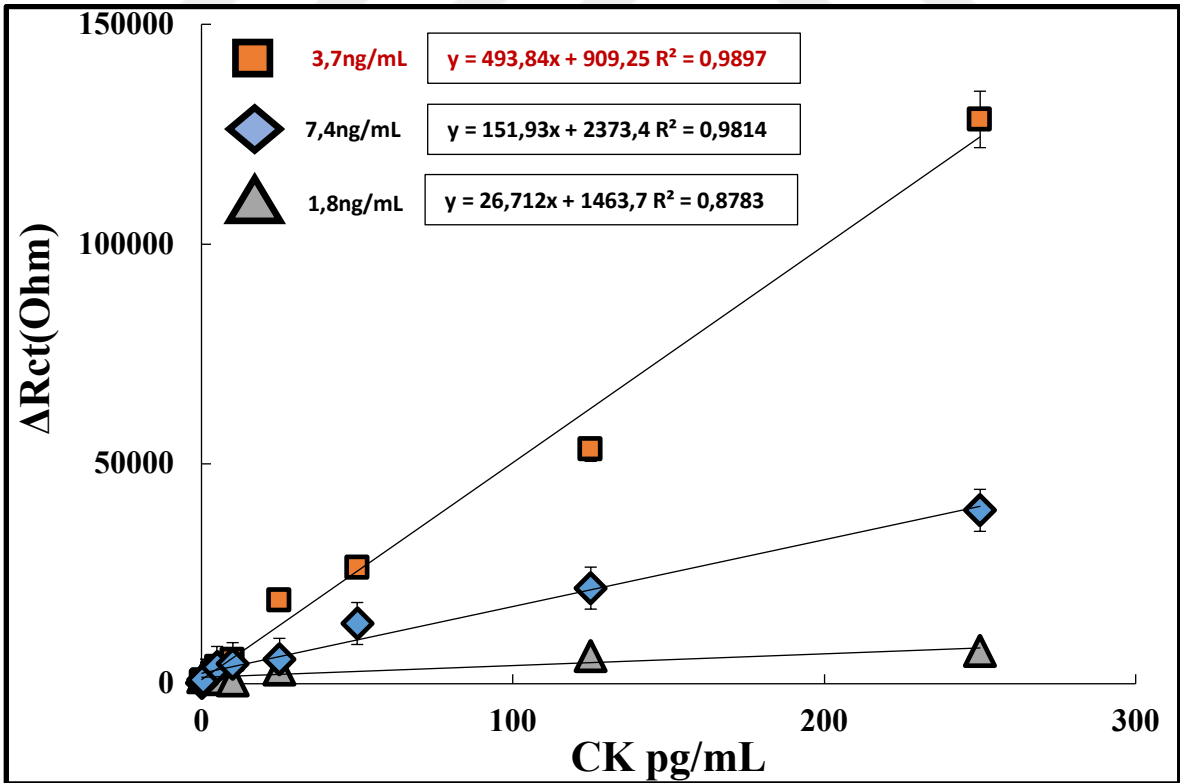
Tablo 1

CK immunosensörünün 3-GOPS konsantrasyon optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve R<sup>2</sup> değerleri

3-GOPS Konsantrasyonu	Doğrunun Denklemi	R <sup>2</sup> Değeri
%0,5	$y = 493,84x + 909,25$	$R^2 = 0,9897$
%0,1	$y = 143,18x - 212,71$	$R^2 = 0,9838$
% 1	$y = 225,85x - 993,14$	$R^2 = 0,9906$

#### 4.2.2. CK İmmunosensörünün Anti-CK Konsantrasyon Optimizasyonu

Anti-CK konsantrasyon optimizasyon çalışması dahilinde belirlenen 3 konsantrasyon ile çalışma yürütülmüştür. Bu konsantrasyonlar; 1,8 ng/ mL , 3,7 ng/ mL , 7,4 ng/ mL şeklindedir. Sonuç olarak alınan ölçümler ile oluşturulan grafik değerlendirildiğinde 3,7 ng/ mL konsantrasyondaki Anti-CK'nın en iyi bağlanmayı gerçekleştirdiği bu nedenle de en yüksek sinyali verdiği ve doğruluk değeri en iyi olan  $R^2$  sonucuna sahip olduğu gözlenmektedir. Öte yandan 1,8 ng/mL Anti-CK yeterli bağlanma gerçekleştiremediği için grafik üzerinde en düşük eğime sahip olan değer olurken, 7,4 ng/mL Anti-CK ise maksimum (yaklaşık) 40000  $\Delta R_{ct}$  değerine yükselen bir eğim doğrusu oluşturmaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak ITO-PET elektrotun Anti-CK konsantrasyonu açısından 3,7 ng/mL değerinden sonra doygunluk noktasına gelip bağlanma gerçekleştirememesi dolayısıyla 7,4 ng/mL yoğunlukta, 3,7 ng/mL konsantrasyondaki değerlerden daha düşük seviyede sinyal gözlenmektedir.



Şekil 5. CK immunosensörü için Anti-CK konsantrasyon optimizasyonu CK (pg/mL) –  $\Delta R_{ct}$  (Ohm) grafiği ve seçilen değer (3,7 ng/mL Anti-CK)

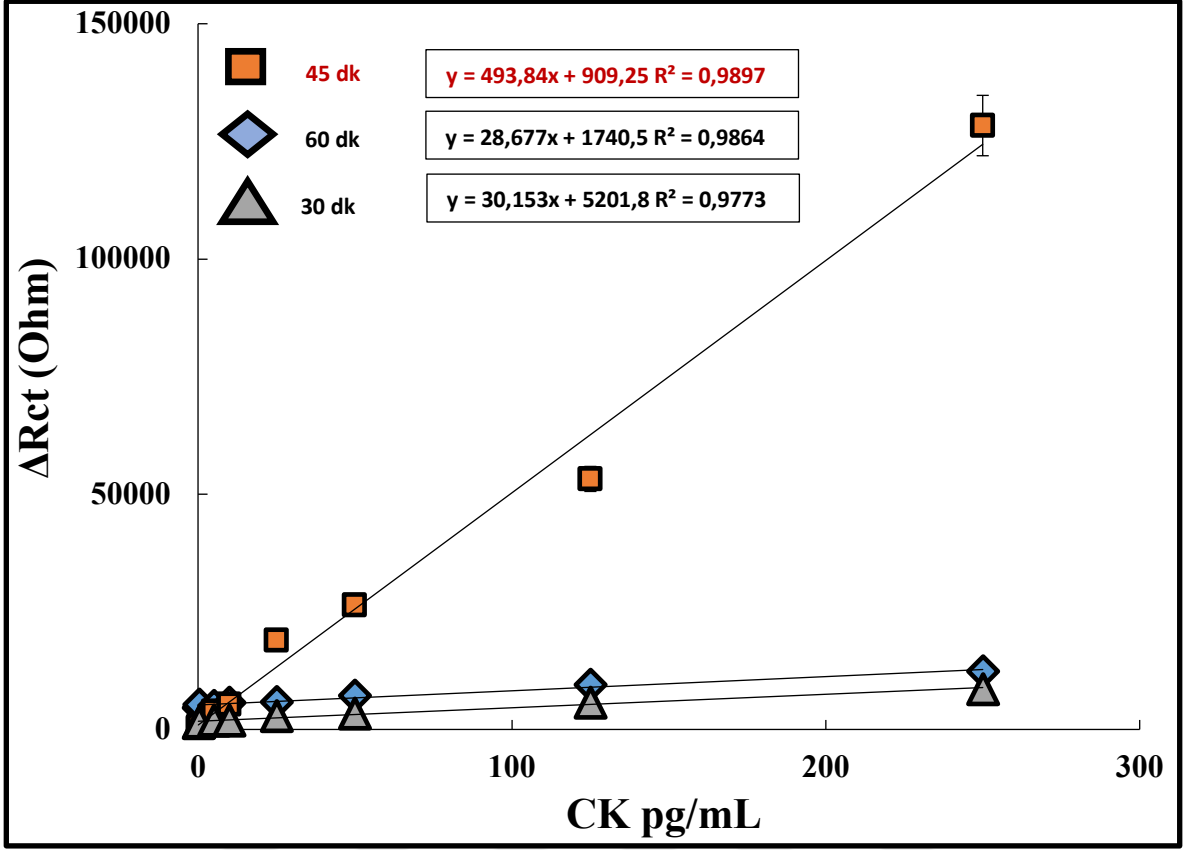
Tablo 2

CK immunosensörünün anti-CK konsantrasyon optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve  $R^2$  değerleri

Anti-CK Konsantrasyonu (ng/mL)	Doğrunun Denklemi	$R^2$ Değeri
3,7	$y = 493,84x + 909,25$	$R^2 = 0,9897$
7,4	$y = 151,93x + 2373,4$	$R^2 = 0,9814$
1,8	$y = 26,712x + 1463,7$	$R^2 = 0,8783$

#### 4.2.3. CK İmmunosensörünün Anti-CK Süre Optimizasyonu Aşaması

Anti-CK süre optimizasyonu çalışmaları için 3 adet farklı süre belirlenmiş olup bunlar; 30 dk, 45 dk ve 60 dakikadır. Çalışma sonucunda CK konsantrasyonuna bağlı bir  $\Delta R_{ct}$  grafiği oluşturulmuştur (Şekil 6). Grafikten alınan sonuçlara göre 45 dakika olan inkübasyon süresi optimize değer olarak seçilmiştir. Grafikte diğer seçenekler olan 30 dk ve 60 dk inkübasyon süreleri grafikte 45 dakikanın altında yer almaktadır. Bu farkın sebebi 30 dakika inkübasyon süresindeki CK proteini bağlanmasının 45 dakikaya göre daha az bağlanma gerçekleştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla beraber 45 dakika sonunda ortamdaki CK proteinlerinin elektrot yüzeyine bağlanma kapasitesinde doygunluk seviyesine ulaşmış olması sebebiyle 60 dk inkübasyon sonucunda sinyal çıktısında düşüş gözlenmiştir.



Şekil 6. CK immunosensörü için Anti-CK süre optimizasyonu CK (pg/mL)-  $\Delta R_{ct}$  (Ohm) grafiği ve seçilen değer (45 dakika)

Tablo 3

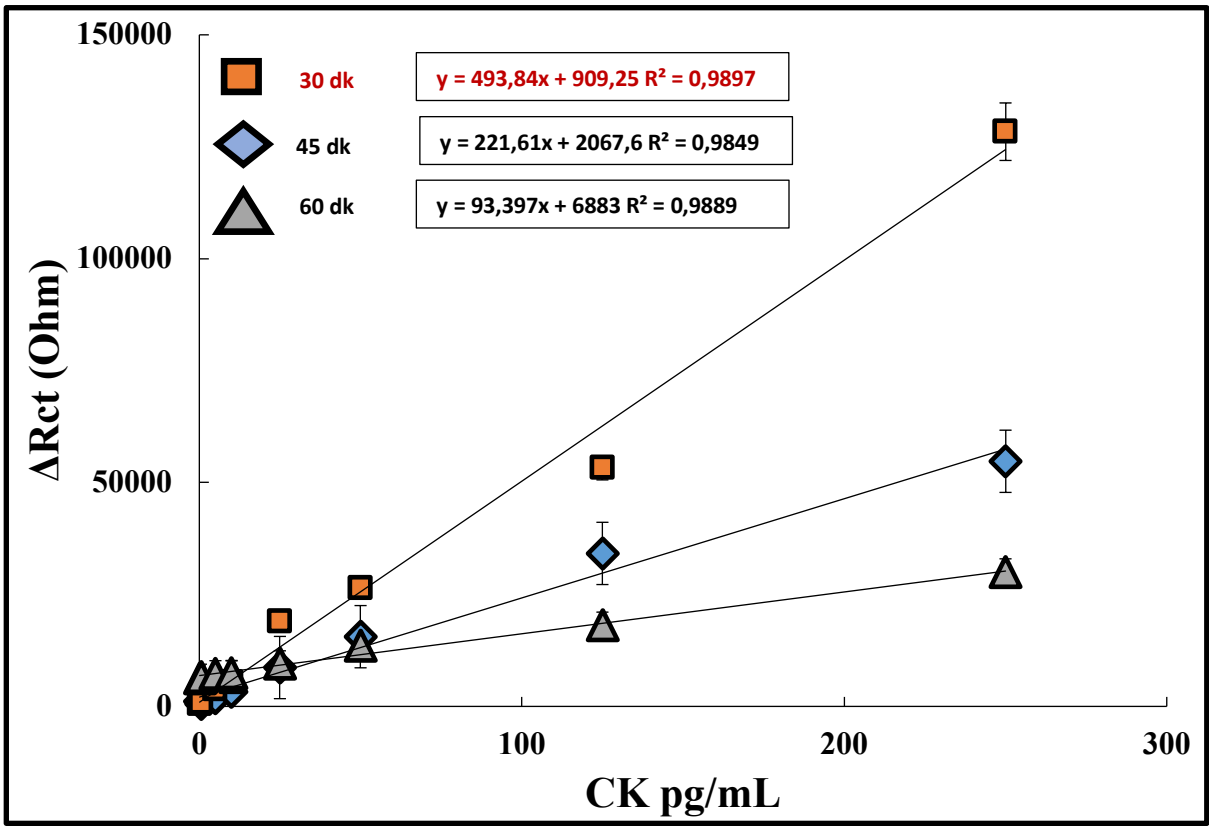
CK immunosensörünün anti-CK inkübasyon süresi optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve R<sup>2</sup> değerleri

ANTI-CK İnkübasyon Süresi (dk)	Doğrunun Denklemi	R <sup>2</sup> Değeri
45	$y = 493,84x + 909,25$	$R^2 = 0,9897$
60	$y = 28,677x + 1740,5$	$R^2 = 0,9864$
30	$y = 30,153x + 5201,8$	$R^2 = 0,9773$

#### 4.2.4. CK İmmunosensörünün CK Süre Optimizasyonu

CK immunosensörü için belirlenen 8 CK konsantrasyonunun optimum inkübasyon süresini belirlemek için 3 farklı inkübasyon süresi seçilmiştir. Seçilen inkübasyon süreleri; 30 dk, 45 dk ve 60 dakikadır. EIS ölçümü yapılan ve Şekil 7’de gösterilen CK- $\Delta R_{ct}$  grafiği

çıkıtısına göre 30 dakika optimum CK inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. 45 dk ve 60 dk inkübasyon süreleri grafikte 30 dakikanın altında bir doğrusallık göstermektedir. Buna göre literatürde sinyal artışının CK inkübasyon süresi ile doğru orantılı (Ferreira ve diğ., 2021) olmasına karşın yüzeydeki Anti-CK yoğunluğuna bağlı olarak optimum inkübasyon süresinin değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ölçüm sonuçları elektrot yüzeyindeki Anti-CK ve ortamdaki CK bağlanmasının maksimum doygunluk seviyesine gelmesi için 30 dakikanın yeterli olduğunu göstermektedir.



Şekil 7. CK immunosensörü için CK süre optimizasyonu CK (pg/mL)- ΔRct (Ohm) grafiği ve seçilen değer (30 dakika)

Tablo 4

CK immunosensörünün CK inkübasyon süresi optimizasyonuna ait doğru denklemleri ve R<sup>2</sup> değerleri

CK İnkübasyon Süresi (dk)	Doğrunun Denklemi	R <sup>2</sup> Değeri
30	$y = 493,84x + 909,25$	$R^2 = 0,9897$
45	$y = 221,61x + 2067,6$	$R^2 = 0,9849$
60	$y = 93,397x + 6883$	$R^2 = 0,9889$

Geniş kapsamlı yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen optimum değerler Tablo 5’ te gösterilmektedir. Bu optimum değerler doğrultusunda tasarlanan immunosensörün lineer grafiği oluşturulmuş ve bu aşamayı takiben karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Tablo 5

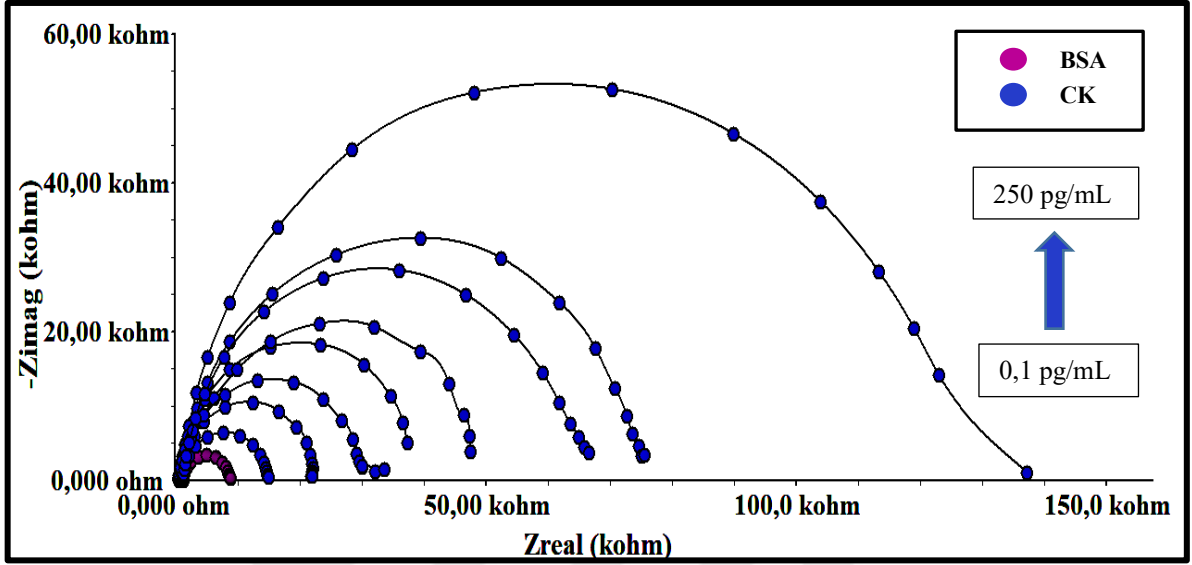
CK immunosensörünün optimizasyon çalışmasına ait değerler

İmmobilizasyon Adımları	Optimum Değerler
3-GOPS konsantrasyonu	%0,05
Anti-CK konsantrasyonu	3,7 ng/mL
Anti-CK inkübasyon süresi	45 dk
CK konsantrasyonu	0,1 pg/mL – 250 pg/mL
CK inkübasyon süresi	30 dk

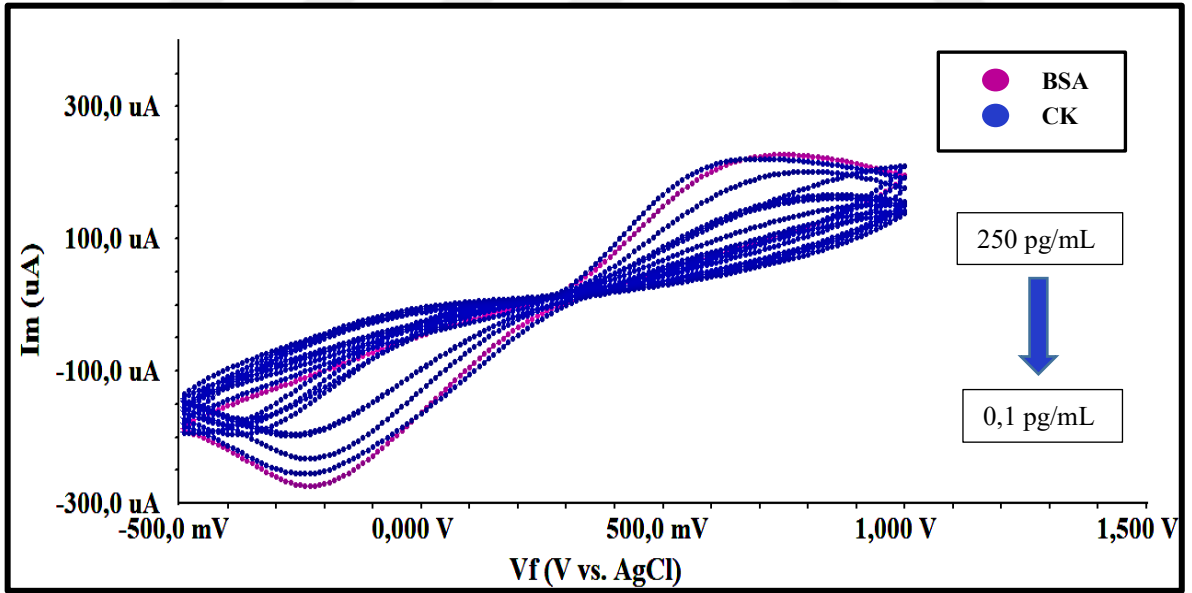
### 4.3. CK Biyosensörünün Lineer Grafiği

Optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen optimum değerler (Tablo 5) doğrultusunda tez çalışması tekrarlanmış olup, çalışmanın lineer grafiği oluşturulmuştur (Şekil 9). Geliştirilen immunosensörün tayin aralığı 0,1 pg/mL – 250 pg/mL olarak belirlenmiştir. LOD değeri 0,013 pg/mL ve LOQ değeri 0,044 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Lineer grafikte görüldüğü üzere seçilen immobilizasyon değerleri ile seçilen CK konsantrasyon değerleri eğim çizgisi doğrultusunda minimum sapma farkı ile sunulan

hipotez ile karakterizedir. BSA fabrikasyonu sonrasında seçilen CK konsantrasyonları ile 8 ekleme yöntemi ile oluşturulan EIS ölçüm sonuçları Şekil 8'de gösterilmektedir.

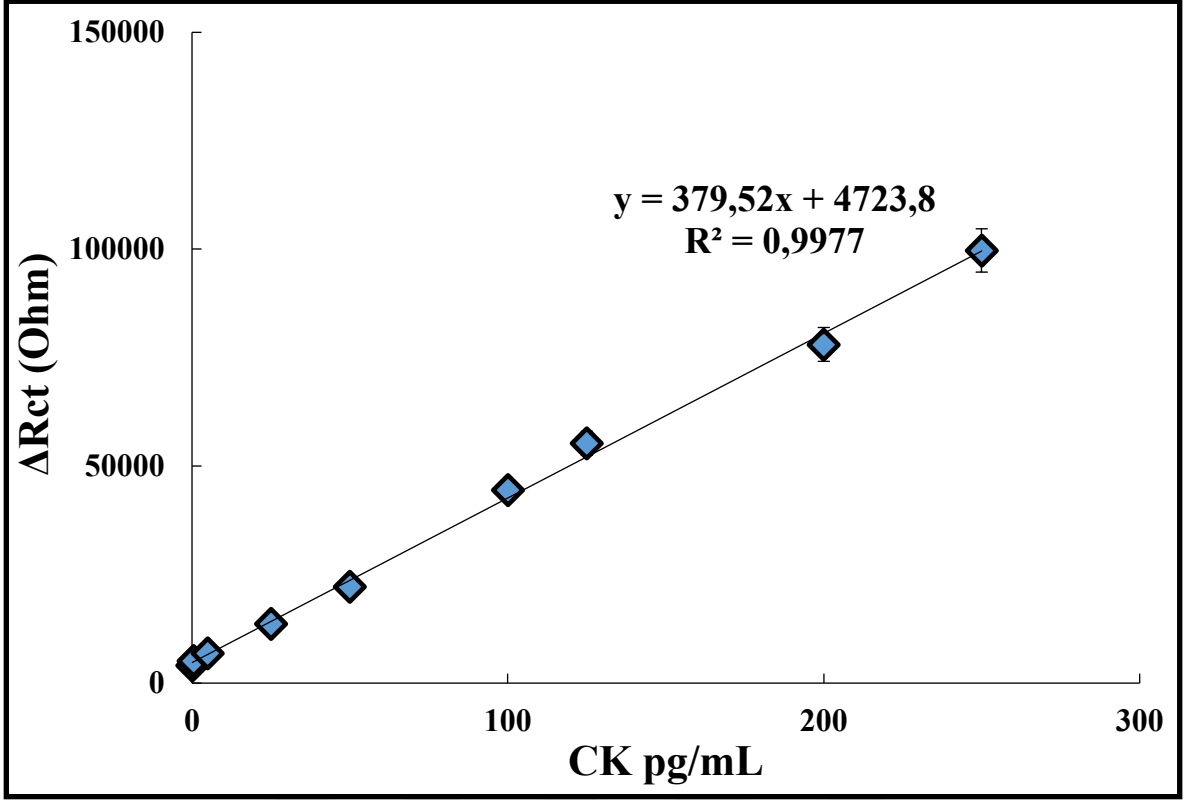


Şekil 8. CK immunosensörünün BSA adımı sonrasında belirlenen CK konsantrasyonları ile oluşturulmuş EIS eğrileri.



Şekil 9. CK immunosensörünün BSA adımı sonrasında belirlenen CK konsantrasyonları ile oluşturulmuş Döngüsel Voltamogram değerleri.





Şekil 10. CK immunosensörünün lineer grafiği.

#### 4.4. CK Biyosensörünün Karakterizasyon Aşamaları

CK immunosensörü optimizasyon çalışmaları sonucunda optimum değerler seçilmiştir. Daha sonra karakterizasyon çalışmaları yapılarak tasarlanan biyoalgılama sisteminin kararlılığı ve kapasitesi birçok yönden test edilmiştir. CK immunosensörü için yapılan; tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, seçicilik rejenerasyon ve depo kapasitesi karakterizasyon çalışmalarının sonucunda oluşturulan kantitatif analizler aşağıda verilmiştir.

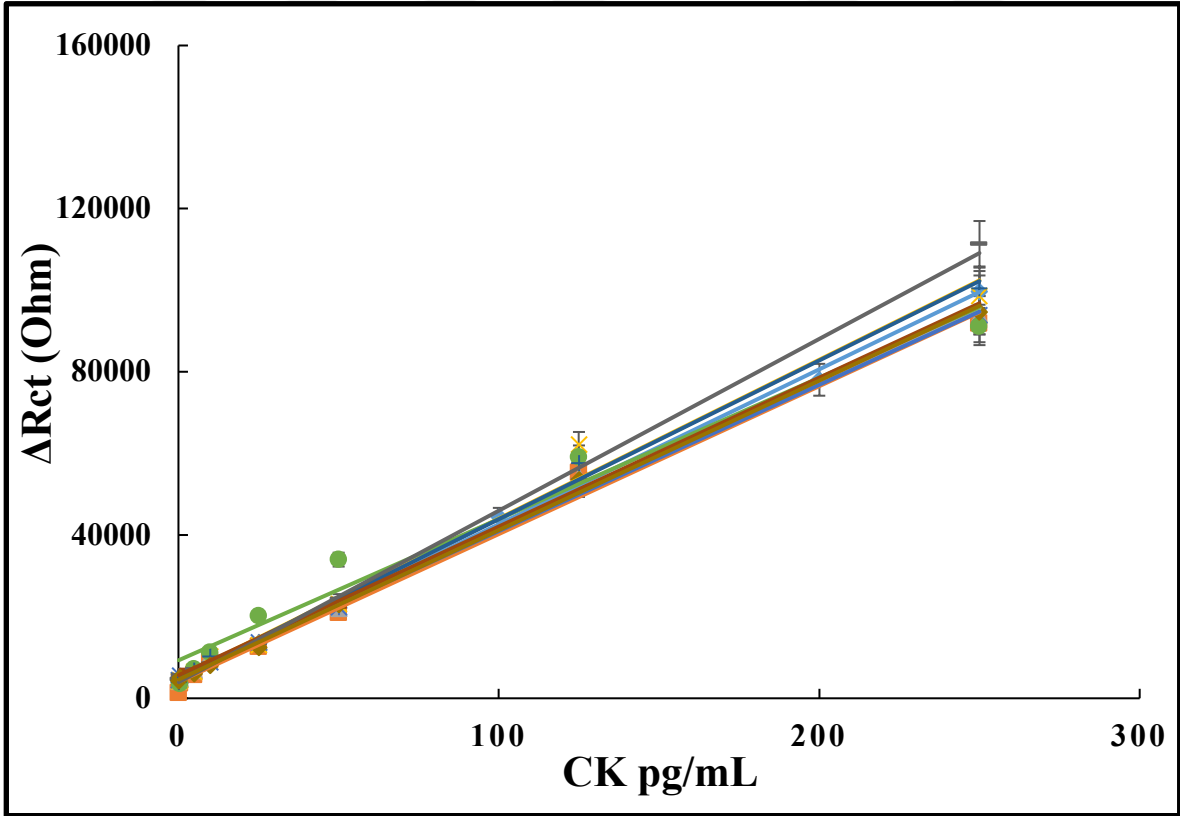
##### 4.4.1. CK İmmunosensörünün Tekrarlanabilirlik Aşaması

Tekrarlanabilirlik çalışması için 20 adet aynı koşullarda hazırlanmış olan CK immunosensörünün aynı konsantrasyonda CK (125 pg/mL) inkübe edildikten sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Daha sonra çıkan sonuçların aritmetik ortalaması alınmıştır. Bu aşamayı takiben standart sapma, ortalama değer ve varyasyon katsayısı ve RSD değeri hesaplanmıştır. Bulunan değerler sırasıyla; 0,013 pg/mL, 54,70 pg/mL, %1,356 ve %1,35

olarak hesaplanmıştır. Verilen standart sapma değeri kabul edilebilir sınırların içindedir. Böylece tekrarlanabilirlik adımının başarıyla tamamlandığı, aynı koşullarda üretilen 20 immunosensörün seçilen 125 pg/mL konsantrasyonda yüksek ölçüm kararlılığına sahip olduğu gözlenmiştir.

#### 4.4.2. CK İmmunosensörünün Tekrar Üretilirlik Aşaması

Tekrar üretilebilirlik çalışması kapsamında aynı koşullarda hazırlanmış olan 10 farklı set ITO-PET elektrotun EIS ve CV ölçümleri yapılmıştır. Sonuç olarak tekrar üretilebilirlik deneyleri grafiği Şekil 10'da gösterilmektedir. Bu deneyin amacı herhangi bir konsantrasyon için elektrotun tekrar üretilebilir olduğunu ve her ölçümde aynı aralıkta sonuçlar alınabildiğini göstermektir. Yapılan tekrar üretilebilirlik deneyleri sonucunda üretilen ve immobilize edilen elektrodun tekrar üretilebilirlik verileri stabil ve olumlu sonuçlar vermiştir.



Şekil 9. CK immunosensörünün tekrar üretilebilirlik grafiği (n=10)

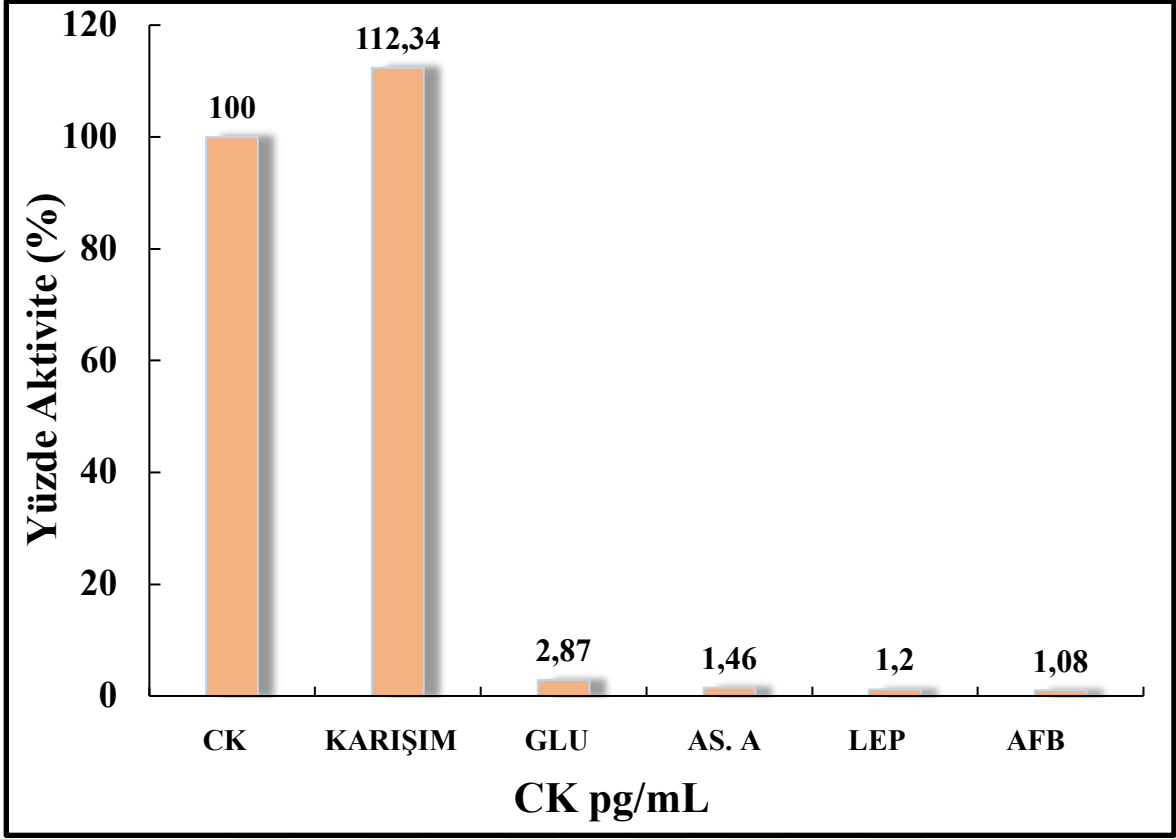
Tablo 6

Tekrar üretilebilirlik grafiğinin denklemi ve R<sup>2</sup> değerleri

Tekrar üretilebilirlik	Doğrunun Denklemi	R <sup>2</sup> Değeri
1	$y = 420,86x + 3908,6$	$R^2 = 0,9971$
2	$y = 346,35x + 9297,9$	$R^2 = 0,9718$
3	$y = 366,49x + 4576,4$	$R^2 = 0,9981$
4	$y = 358,61x + 5116,5$	$R^2 = 0,9991$
5	$y = 362,45x + 4014,7$	$R^2 = 0,9924$
6	$y = 364,67x + 5637,8$	$R^2 = 0,9963$
7	$y = 379,52x + 4723,8$	$R^2 = 0,9977$
8	$y = 389,03x + 5002,8$	$R^2 = 0,9969$
9	$y = 389,21x + 5141,9$	$R^2 = 0,9888$
10	$y = 361,49x + 5223,4$	$R^2 = 0,9965$

#### 4.4.3. CK İmmunosensörünün İmmunosensörü Seçicilik Aşaması

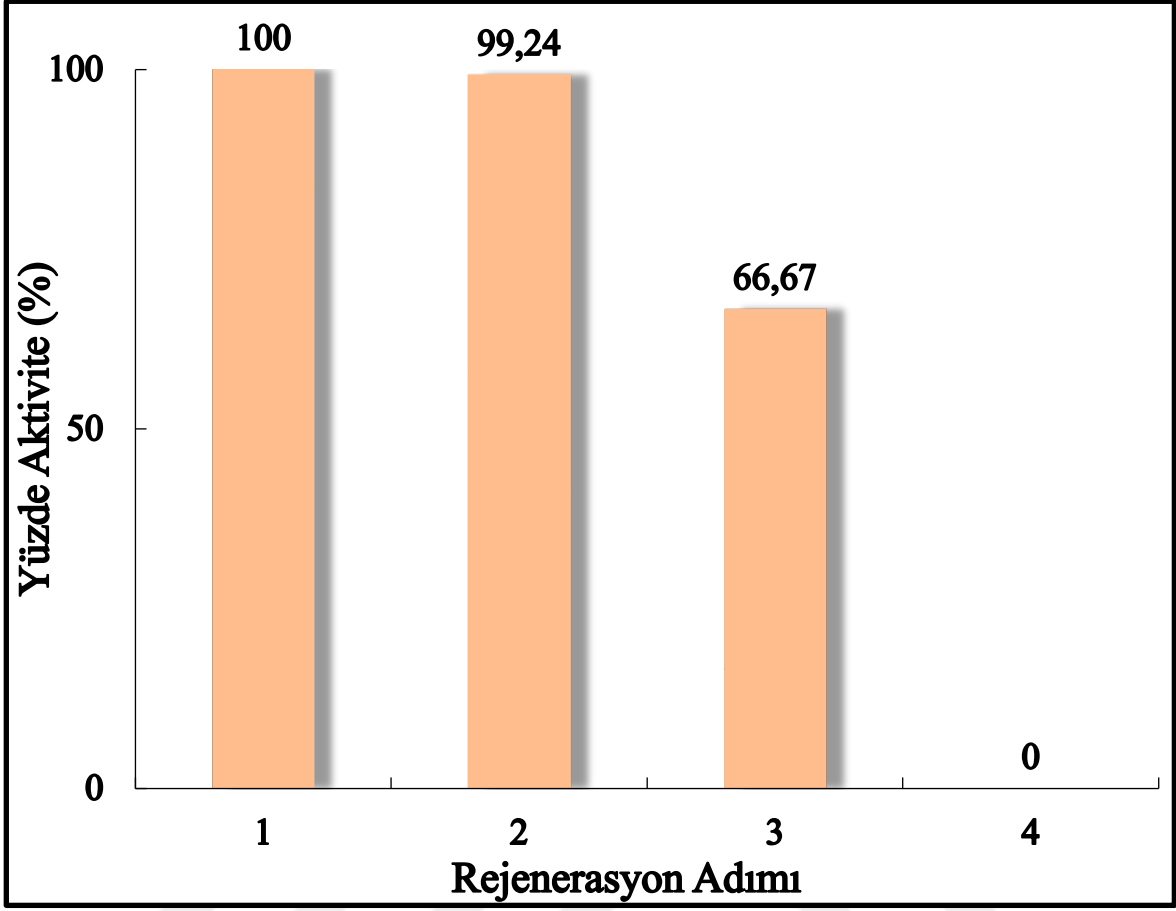
Bu çalışma sonucunda, Kreatin kinaz antijeninin var olmadığı solüsyonlardaki EIS ölçümleri anlamlı ölçüde bir sinyal çıktısı vermezken, kreatin kinaz olan immunosensör beklenen sinyali oluşturmuştur. Son olarak CK, aflatoksin B, leptin, glutamat, askorbik asit koyularak hazırlanan karışım ile inkübe edilen immunosensörün EIS ölçümünde de anlamlı bir sinyal oluşumu gözlenmiştir. Bu sinyal artışı karışımdaki CK varlığı ve aynı zamanda karışımda kullanılan diğer moleküllerin de verdiği düşük miktardaki sinyal artışlarının toplamından kaynaklanmaktadır.



Şekil 10. CK immunosensörünün seçicilik grafiği.

#### 4.4.4. CK İmmunosensörünün Rejenerasyon Aşaması

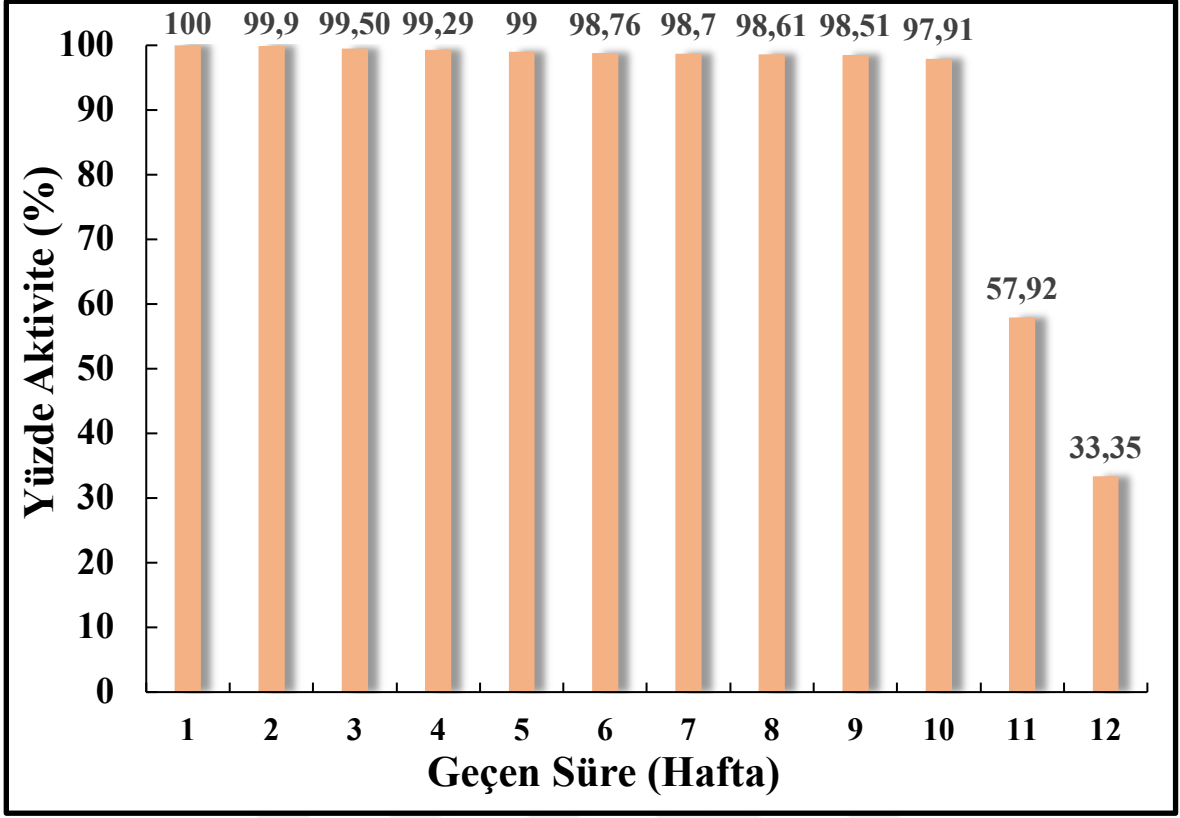
Rejenerasyon deneyleri ITO-PET elektrotunun tekrar kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu çalışma sonucunda aynı zamanda oluşturulan SAM tabakasının kararlılığı da gözlemlenmiş olmaktadır. Elektrot rejenerasyon çalışmaları sonucunda 3. Denemede verimliliği yaklaşık %40 oranında düşmüştür. Bu tez çalışması tek kullanımlık CK immunosensörü önermektedir. Bu nedenle rejenerasyon çalışmaları tez önerisi ile tutarlıdır.



Şekil 11. CK immunosensörünün rejenerasyon grafiği.

#### 4.4.5. CK İmmunosensörünün Depo Kapasitesi Aşaması

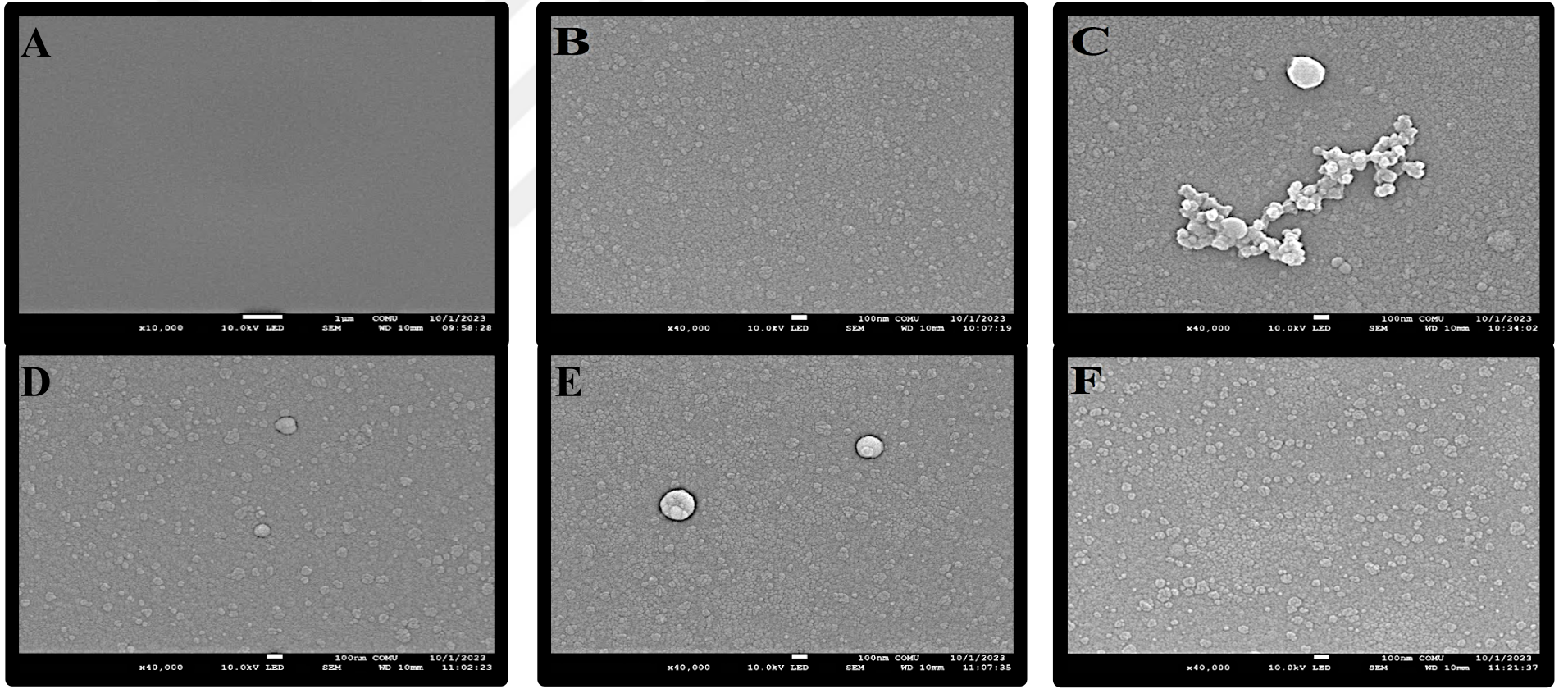
Depo çalışmalarının yapılması tasarlanan immunosensörün, üretim aşamasından ölçüm yapılacağı zamana kadar aktif ölçüm dayanıklılığını kaybetmeden ne kadar süre stabil kalabildiğini deneysel olarak gözlemlemeyi amaçlamaktadır. Depo çalışmaları kapsamında +4 °C sıcaklıkta saklanan elektrotlar sırasıyla 12 hafta boyunca ölçülmüştür. Sonuç olarak 10. haftaya kadar elektrotlar %100- 97 verim ile devam etmesine karşın, 11. haftada verim anlamlı kabul edilen değerlerin altına inmiştir.



Şekil 12. CK immunosensörü depo kapasitesi grafiği.

#### 4.5. CK İmmunosensörünün SEM Görüntüsü

Üretilen biyoalgılama sistemi kapsamında ITO-PET elektrotlarının her bir immobilizasyon aşamasının SEM görüntüleri alınmıştır. Görüntüler Şekil 14 A-F'de gösterilmektedir.



Şekil 13. CK immunosensörünün SEM görüntüleri. (A: ITO-PET elektrotunun immobilizasyon işlemleri yapılmadan önceki yüzeyinin görüntüsüdür. B: Hidroksilleme aşamasından sonra alınan ITO-PET elektrot görüntüsüdür. C: Elektrodun GUPS bağlayıcı ajanı gece boyu uygulandıktan sonraki alınan elektrot görüntüsüdür. D: ITO-PET yüzeyine anti-kreatin kinaz ile inkübe ettikten sonra alınan elektrot mikroskop görüntüsüdür. E: BSA uygulamasından sonra alınan elektrot görüntüsüdür. F: CK inkübasyonu sonrası çekilen ITO-PET görüntüsüdür.)

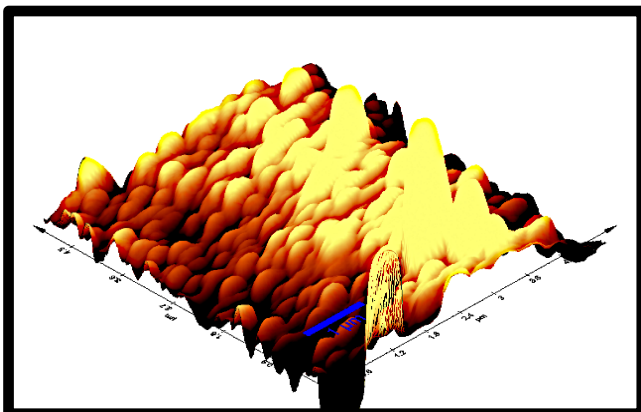
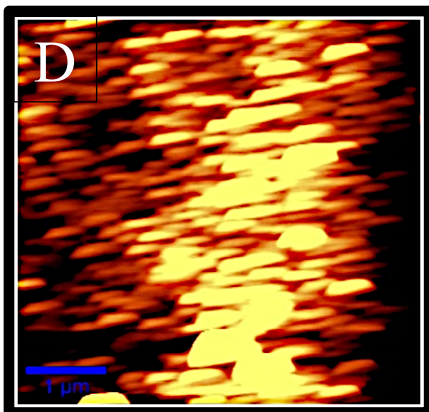
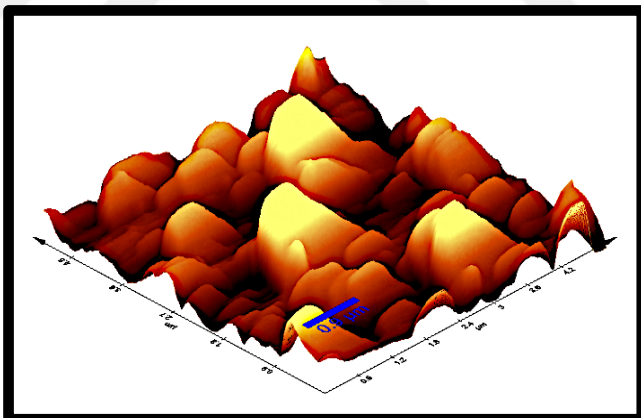
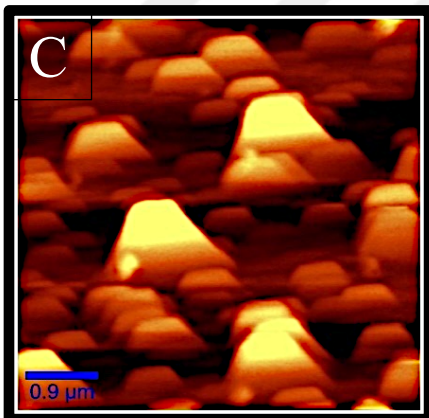
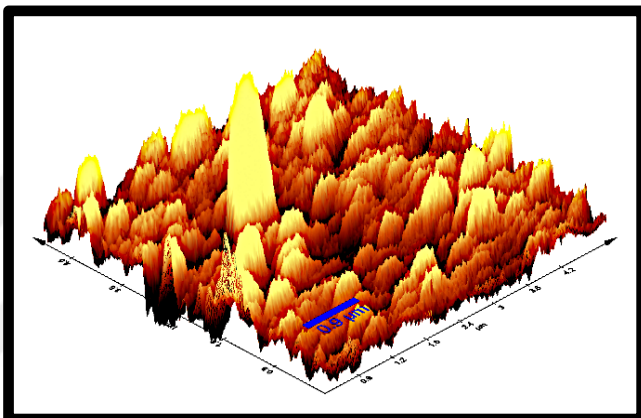
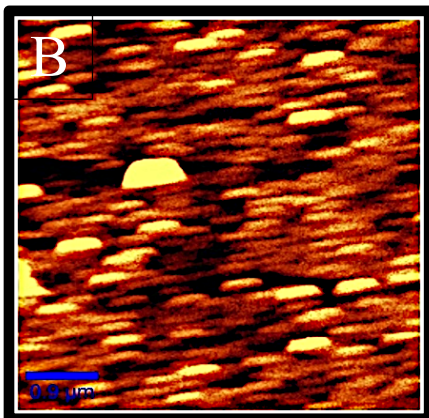
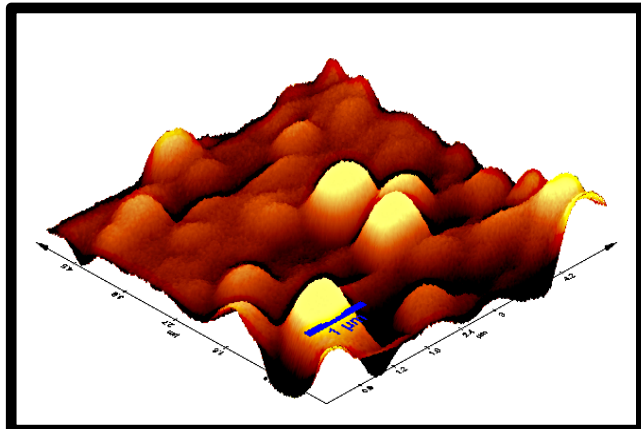
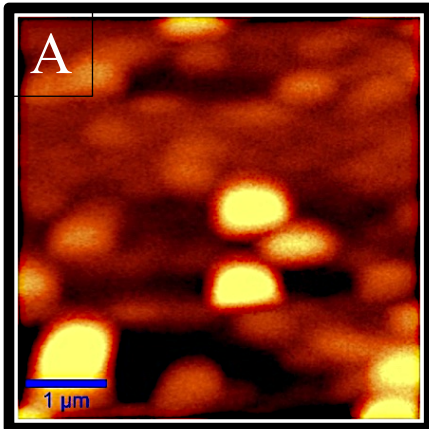
Geliştirilen CK immunosensörünün immobilizasyon aşamaları sırasıyla SEM tekniği ile görüntülenmiştir. Böylece immobilize edilen elektrotun morfolojik olarak incelenmesi sağlanmıştır. ITO-PET elektrotunun SEM görüntüleri Şekil 14'te verilmiştir. Şekil 14 A'da ITO-PET elektrotunun yüzeyinin temizlendikten sonraki görüntüsü gösterilmektedir. Böylece ITO-PET elektrot yüzeyinin kirlilikten arındırıldığı morfolojik olarak görülmektedir. Şekil 14 B'de yer alan hidroksilleme aşaması elektrot yüzeyindeki pürüzlü görüntü ile doğrulanmaktadır. Şekil 14 C'de ITO-PET üzerine 3-GOPS immobilizasyonu görülmektedir. Yüzeydeki hidroksil grupları ile 3-GOPS bağlanması net bir şekilde gözlemlenebilmektedir. Böylece immobilizasyonun başarılı bir şekilde ilerlediği söylenebilir. Sonraki aşamada şekil 14 D'de Anti-CK immobilizasyonu gösterilmiştir. Yüzeyin daha yoğun bir kalabalığa sahip olması gerçekleştirilen immobilizasyon adımını doğrular niteliktedir. BSA modifikasyonu şekil 14 E'de gösterilmektedir. Yoğun bir yüzey kaplanması gözlenmiştir. CK immobilizasyonu şekil 14 F'de görüldüğü üzere yüzeyde kalabalık ve büyük yuvarlaklar halinde kendini belli etmektedir.

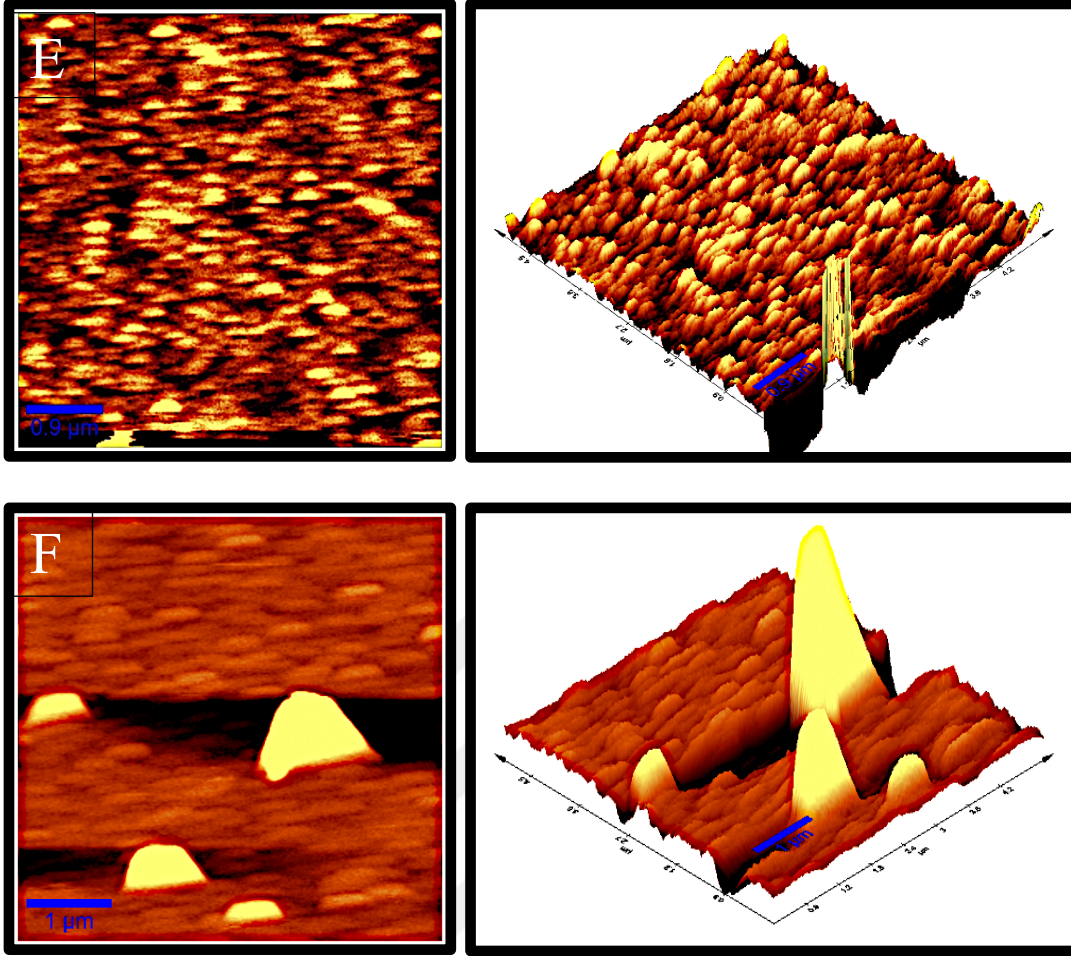
SEM tekniği ile görüntüleme sonucunda alınan empedans ölçümleri ve immobilizasyon çalışmalarının morfolojik olarak doğrulanması amaçlanmıştır. SEM görüntüleri ölçülen empedans değerleri ile uyumlu sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

#### **4.6. CK İmmunosensörünün AFM Görüntüsü**

Üretilen elektrotların her bir aşamasının AFM (atomik kuvvet mikroskobu) görüntüleri alınmıştır. Görüntüler Şekil 15 A-F'de gösterilmektedir.







Şekil 14. CK immunosensörü AFM görüntüleri. (A: ITO-PET elektrotunun immobilizasyon işlemleri yapılmadan önceki yüzeyinin AFM görüntüsüdür. B: OH immobilizasyonu aşamasından sonra alınan ITO-PET elektrot AFM görüntüsüdür. C: 3-GOPS bağlayıcı ajanı gece boyu uygulandıktan sonraki alınan elektrot AFM görüntüsüdür. D: ITO-PET yüzeyine Anti-CK ile inkübe ettikten sonra alınan AFM görüntüsüdür. E: BSA uygulamasından sonra alınan elektrot AFM görüntüsüdür. F: CK antijeni inkübasyonu sonrası çekilen AFM görüntüsüdür.)

ITO-PET elektrotunun AFM görüntüleri Şekil 15'te verilmiştir. Şekil 15 A, ITO-PET elektrotunun temizleme işlemi sonrası immobilizasyon yapılmamış yüzeyinin görüntüsüdür. Elektrotta immobilizasyon yapılmadığı için yüzeyde düşük oranda değişiklik kaydedilmiştir. Bu düşük orandaki değişiklik ITO-PET elektrotunun morfolojik yapısında polimer olmasının yanısıra kalay bileşiği bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu özellik ITO/PET elektrotuna yarı iletkenlik özelliği kazandırmaktadır. Şekil 15 B'de uygulanan

amonyum hidroksit/hidrojen peroksit/ultra saf su (1:1:5) immobilizasyonu sonucunda hidroksil grupları ile zenginleştirilmiş ITO-PET yüzeyi gösterilmektedir. Morfolojik olarak yüzeyin Şekil 15 A'dan farklı olarak daha sık ve kalabalık görüntüsü OH immobilizasyonunu destekler niteliktedir. Şekil 15 C, ITO-PET elektrotu yüzeyine 3-GOPS immobilizasyonu sonrası çekilen AFM görüntüsüdür. Şekil 15 B'deki sık ve kalabalık görüntüden farklı olarak daha geniş ve büyük yükselteler görülmektedir. ITO-PET elektrotunun morfolojik yapısındaki bu değişiklik yoğun bir kimyasal yapıda olan 3-GOPS bileşiğinin yüzeyde avantajlı bir SAM tabakası oluşturduğunu destekler niteliktedir. Şekil 15 D'de ITO-PET yüzeyine Anti-CK modifikasyonu gösterilmektedir. Görüldüğü gibi 3-GOPS immobilizasyon aşamasından farklı bir morfoloji göstermiştir. Şekil 15 E'de ITO-PET elektrotunun BSA ile immobilizasyonu gösterilmektedir. Şekil 15 F'de ITO-PET elektrotunun CK ile muamele edildikten sonraki görüntüsü verilmiştir. Şekil 15 E'den farklı olarak yüzeyde daha yüksek morfolojik değişimler olması Anti-CK – CK spesifik etkileşimini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda vaat edilen indiyum-kalay-oksit politetroflat tek kullanımlık elektrotun; stabil, kararlı, tekrar üretilebilir, iyi depo kapasitesine sahip, seçiciliği yüksek tek kullanımlık bir elektrot olarak avantajlı sonuçlar ortaya çıkardığı gözlenmiştir.

#### **4.7. CK İmmunosensörünün Serum Örnekleriyle Çalışma Aşaması**

Ticari insan serumu üzerinde yapılan çalışmalar dahilinde belirlenen 5 ayrı örnek ile 3 ekleme yöntemi kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiş olup, yapılan ölçümler sonucunda alınan veriler karakterizasyon çalışmalarını doğrular nitelikte anlamlı çıktılar vermiştir. Böylece tez çalışmasının klinik uygulamalar için gösterdiği nitelik değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 7'de gösterilmektedir.

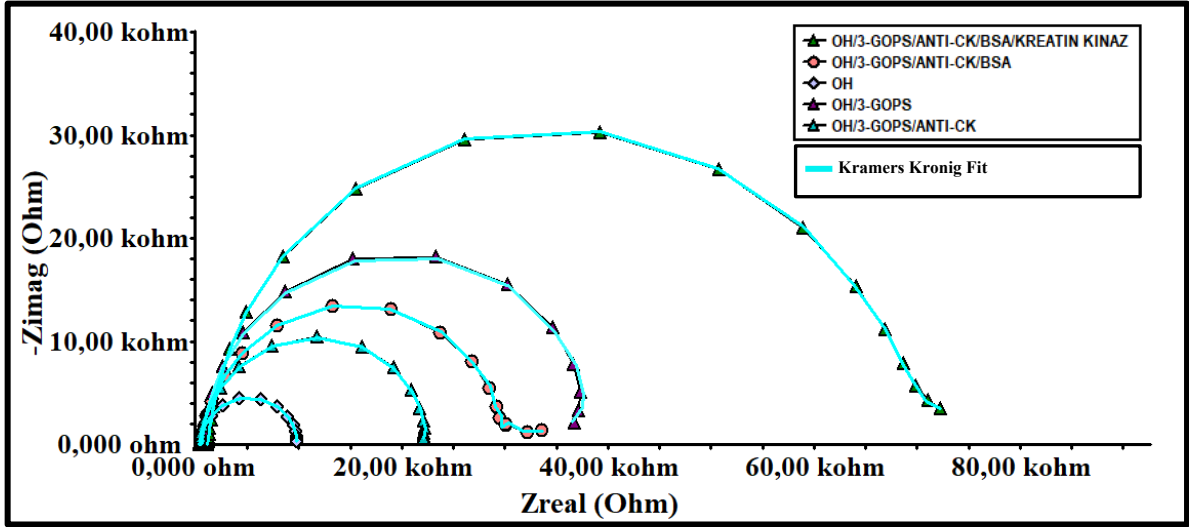
Tablo 7

## CK İmmunosensörü Serum Örnekleri Çalışması Analizleri

Serum	MCV Konsantrasyon (pg/ml)	Standart Eklenen Konsantrasyon (pg/ml)	Ölçülen Konsantrasyon (pg/ml)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	4,8	5	10,18/9,7/9,83	2	102
		25	29,7/29,4/31,6	1,72	101,72
2	3,1	5	8,94/8,66/8,3	10,6	110,6
		25	28,1/30,2/27,9	2,52	102,52
3	4,2	5	9,16/9,18/9,73	3	103
		25	29,2/29,4/29,47	0,6	100,6
4	2,9	5	7,87/8,29/7,87	2,2	102,2
		25	28,3/27,9/27,93	0,57	100,57
5	3	5	8,42/8,39/8,24	7	107
		25	28,1/27,9/28,1	0,13	100,13

## 4.8. CK İmmunosensörü Kramers Kronig Analizi

Elektrokimyasal empedans sistemlerinde ölçümlerin kararlılığının belirlenmesi, yapılan deneylerin doğruluğunun ispat edilmesi için büyük öneme sahiptir (Luo ve diğ.,2021). Kramers- Kronig dönüşümü üretilen immunosensörün ölçüm dışı herhangi bir etken tarafından ölçüm üzerinde oluşabilecek sapmalara maruz kalma durumundan etkilenip etkilenmediğini belirler. Şekil 16'da Kramers-Kronig hesaplaması ile ölçülen EIS değerlerinin çakıştırılma grafiği gösterilmektedir.



Şekil 15. CK immunosensörü Kramers-Kronig / gerçek zamanlı EIS ölçümleri grafiği.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Kardiyovasküler hastalıklar günümüzde ikinci en yaygın ölüm sebebi olarak listelenmektedir (DSÖ, 2022). Dünya genelinde yılda ortalama 17 milyon ülkemizde (Türk Kardiyoloji Derneği,2022) ise ortalama 200 bin kişi kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle hayatını kaybetmektedir (DSÖ,2022). Özellikle akut sendromlu kardiyovasküler hastalıklarda erken teşhisi artan ölümlerin önüne geçmek için oldukça öneme sahiptir (Yemilhan vd., 2011). CK enzimi kardiyovasküler hastalıklarda en yaygın kullanılan biyobelirteçlerden biridir. Yapılan bu tez çalışması geniş referans aralığı ile kreatin kinaz tespiti için elektrokimyasal immunosensör fabrikasyon ve karakterizasyon çalışmalarını içermektedir.

Bu tez çalışması kapsamında önerilen hipotezi desteklemek amacıyla geniş kapsamlı optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum değerler doğrultusunda çalışmanın lineer grafiği oluşturulmuştur. Tez çalışması için seçilen ITO-PET elektrotu yüzeyine SAM tabakası iyi bir şekilde immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon aşaması sonrasında elektrotun kararlılığını ve stabilitesini değerlendirilmek amacıyla karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda ITO-PET elektrotunun ve elektrot yüzeyine immobilize edilen SAM tabakasının depo kapasitesi, tekrarlanabilirliği, tekrar üretilebilirliği ve rejenerasyon kapasitesi test edilmiştir. Bu tez çalışması tek kullanımlık immunosensör önerdiği için, yapılan rejenerasyon aşaması sonuçlarının verilen hipotezi deneysel olarak desteklediği görülmüştür. Rejenerasyon aşamasında immunosensörün HCL ile yıkandıktan sonra Anti-CK – CK protein bağının ayrılması göz önünde bulundurularak ikinci kez inkübe edilen aynı elektrotla gerçekleşen EIS ölçümlerinin düşük bir kayıpla tekrar anlamlı sonuçlar ortaya çıkarması immobilize edilen SAM tabakasının kararlı yapısını ortaya çıkarmaktadır. Çıkan kantitatif sonuçlar dahilinde bu tez çalışması hızlı, hesaplı, kararlı bir şekilde tekrar üretilebilen, tekrarlanabilirliği yüksek ve uzun bir depo ömrüne sahip tek kullanımlık bir CK biyobelirtecini literatüre başarıyla sunmuştur. Yapılan immobilizasyon ve karakterizasyon çalışmalarını morfolojik olarak gözlemlemek amacıyla ITO-PET kullanılarak üretilen immunosensörünün SEM ve AFM görüntüleri çekilmiştir. Sonuç olarak immobilizasyon

aşamalarında yapılan uygulamalar elektrot yüzeyinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler dahilinde oluşturulan deneysel çıktılar doğrudan niteliktedir. Karakterizasyon çalışmalarını başarı ile sonuçlandıran immunosensörün klinik örneklerdeki uygulanabilirliğini test etmek amacıyla insan serumu kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda karakterizasyon aşamasındaki sonuçlarla paralel başarıda sonuçlar elde edilmiştir. Böylece geliştirilen immunosensörün gelecekte klinik çalışmalarda kullanılabilen hızlı, kolay üretilen ve hesaplı bir yöntem olarak kullanılması vaat edilmektedir. Üretilen immunosensör geniş tayin aralığı (0,1 pg/mL – 250 pg/mL), düşük LOD (0,013 pg/mL) ve LOQ (0,044 pg/mL) değerlerine sahiptir. Günümüzde son yapılan çalışmalar sonucunda insan serumunda CK seviyesi kadınlarda 20-190 U/L, erkeklerde ise 40- 300 U/L şeklindedir (Maan ve diğ.,2022) (Türk Kardiyoloji Derneği, 2022). Tez çalışması kapsamında CK konsantrasyonları (0,1 pg/mL – 250 pg/mL) için geniş kapsamlı bir literatür araştırması yapılmış ve klinik sonuçlarla optimize geniş bir tayin aralığı belirlenmiştir. Sonuç olarak ITO-PET kullanılarak üretilen CK immunosensörü çalışması ile literatüre düşük maliyetli, kolay ulaşılabilen, kantitatif ve kararlı sonuçlar elde edilebilen bir biyolojik sistem sunulmuştur. Çalışmayı daha ileri evrelere taşımak amacıyla ölçüm aralığı genişletilebilir. Üretilen biyosensör için bütünleşmiş, optimize ve hızlı bir dönüştürücü ile elektrokimyasal yöntemler ile üretilen CK immunosensörünün rutin testler arasına girebileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Ahammad, A., Choi, Y.-H., Koh, K., Kim, J.-H., Lee, J.-J. ve Lee, M. (2011). "Electrochemical Detection of Cardiac Biomarker Troponin I at Gold Nanoparticle Modified ITO Electrode by Using Open Circuit Potential". *International Journal of Electrochemical Science*, s. 1906-1916.
- Amsterdam, E. E., Wenger, N. K., Brindis, R. G., Casey Jr, D. E., Ganiats, T. G., Holmes Jr, D. R., Pet. (2014). "AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: Executive Summary". *Circulation*, 2354-2394.
- Brewster, L., Haan, Y., Zwinderman, A., Born, B., & Montfrans, G. (2020). "CK (Creatine Kinase) Is Associated With Cardiovascular Hemodynamics: The HELIUS Study". *Hypertension*, s. 373-380.
- Chaulin, A., & Duplyakov, D. (2020). "Biomarkers of acute myocardial infarction: diagnostic and prognostic value". Part 1. *Journal of Clinical Practice*, s. 75-84.
- Christenson, R., Newby, L., & Ohman, E. (1997). "Cardiac markers in the assessment of acute coronary syndromes". *Maryland Medical Journal*, s. 18-24.
- Civek, S., & Akman, M. (2022). "Dünyada ve Türkiye’de kardiyovasküler hastalıkların sıklığı ve riskin değerlendirilmesi". *The Journal of Turkish Family Physician*, 21-28.
- Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. (2019). "A novel electrochemical immunosensor based on disposable ITO-PET electrodes for sensitive detection of PAK 2 antigen". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 848.
- Demirbakan, B. ve Sezgintürk, M. K. (2022). "An electrochemical immunosensor based on graphite paper electrodes for the sensitive detection of creatine kinase in actual samples". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 921.
- Dissanayake, M., Wu, D. ve Wu, H. F. (2022). "Synthesis of Fluorescent Titanium Nanoclusters at ambient temperature for highly sensitive and selective detection of Creatine Kinase MM in myocardial infarction". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 217.



- Dülek, H., Tuzcular Vural, Z. ve Gönenç, I. (2019). “Kardiyovasküler Hastalıklara Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi ve Kardiyovasküler Risk Skorlamalarının Karşılaştırılması”. *Dicle Tıp Dergisi*. 449-459.
- Ebrahimi, R., Hasanzadeh, M. Rashidi, M. R., ve Jouyban, A. (2023). “Low fouling aptasensing of rivaroxaban in real samples using poly (toluidine blue) decorated by silver nanoparticle: A new platform for the cardiovascular disease analysis”. *Microchemical Journal*. Volume 189.
- Feigin, V. L., Brainin , M., Lindsay , P., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Pandian, J. (2022). Global Stroke Fact Sheet 2022. World Stroke Organization (WSO).
- Ferreira, A. L., de Lima, L. F., Moraes, A. S., Rubira, R. J., Constantino, C. J., Leite, F. L., Delgado-Silva, A. O., & Ferreira, M. (2021, July). Development of a novel biosensor for Creatine Kinase (CK-MB) using Surface Plasmon Resonance (SPR). *Applied Surface Science*, 554, 149565.
- Friess, U. ve Stark, M. (2009, 01 16). “Cardiac markers: a clear cause for point-of-care testing”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 1453–1462.
- Gaziano, T., Reddy, K., Paccaud, F., Horton, S., & Chaturvedi, V. (2006). “Cardiovascular Disease. T. Gaziano, K. S. Reddy, F. Paccaud, S. Horton, & V. Chaturvedi içinde, Disease Control Priorities in Developing Countries, 2nd Edition (s. Chapter 33). New York: Oxford University Press.
- Geng, T., Song, Z., Zhang, J. ve Xu, Z. (2017). “Creatine Kinase Determination Based on an Electrochemical”. *International Journal of Electrochemical Science*. 8552-8563.
- Güven, F., & Kantarcı, M. (2018). “Miyokard Perfüzyonu ve İskemik Kalp Hastalıkları”. *Türk Kardiyoloji Seminerleri*, s. 152-169.
- İnce, B. ve Sezgintürk, M. K. (2021). “A high sensitive and cost-effective disposable biosensor for adiponectin determination in real human serum samples”. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 328, 129051.
- Lai, X.H., Liang, R.L., Liu, T.C., Dong, Z.N., Wu, Y.S. ve Li. L.H. (2016). “A Fluorescence Immunochemical Assay Using Europium (III) Chelate Microparticles for

Rapid, Quantitative and Sensitive Detection of Creatine Kinase MB”. *Journal of Fluorescence*. 987–996.

Luo, J., Liang, X., Zhang, Y., Liang, C., Yassine, H., Leroy, G. ve Mascot, M. (2021). “Application of the Kramers–Kronig relationships in the electrochemical impedance models fit”. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2225–2233.

Magar, H., Rabeay, Y., ve Mulchandani, A. (2021). “Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications”. *Sensors*, Volume 21/ issue 19/ 6578.

Marrani, A. G., Coico, A. C., Giacco, D., Zanoni, R., Motta, A., Schrebler, R. ve Dalchiele, E. A. (2019). “Flexible Interfaces between Reduced Graphene Oxide and Indium Tin Oxide/Polyethylene Terephthalate for Advanced Optoelectronic Devices”. *ACS Publications*, 5963-5972.

Mecozzi, A., Antonelli, C. ve Shtaif, M. (2019). “Kramers–Kronig receivers”. *Advances in Optics and Photonics*. 480-517.

Maan, A., Alhumrani, A., ve Farid, H. (2022). “Do Troponin Titter and CK-MB Predict Severity and In-Hospital Mortality in Patients with Ischemic Stroke? Merit Research *Journal of Medicine and Medical Science*. 186-192.

Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S. ve Ozkan, S. (2019). “The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis”. *Biosensors*. 9 (3)- 86.

Moreira, F. T., Dutra, R. A., Noronha, J. P. ve Sales, F. (2014). “Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection”. *Biosensors and Bioelectronics*. 217-222.

Navaneeth, M., Supraja, P., Babu, A., Kumar, K., Prakash, K. ve Kumar, R. (2023). “A triboelectric nanogenerator based on commercial ITO-PET sheets for mechanical energy harvesting and self-powered indicator display applications”. *Materials Letters*. Volume 336.

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*. Volume 51.

- Özyurt, C., Evran, S. ve Telefoncu, A. (2014). Development of genetically encoded fluorescent protein constructs of hyperthermophilic maltose-binding protein. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 132-145.
- Shah, H., & Haridas, N. (2007). “A serial follow up study of cardiac marker enzymes during the week after acute myocardial infarction”. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 33-36.
- Supraja, P., Sudarshan, V., Tripathy, S., Agrawal, A. ve Singh, S. G. (2019). “Label free electrochemical detection of cardiac biomarker troponin T using ZnSnO<sub>3</sub> perovskite nanomaterials”. *Analytical Methods*, 744-751.
- Thupakula, S., Nimmala, S., Ravula, H., Chekuri, S. ve Padiya, R. (2022). “Emerging biomarkers for the detection of cardiovascular diseases”. *The Egyptian Heart Journal*, Makale numarası 77.
- Onat, A., Büyüköztürk, K., Sansoy, V., Şurdum Avcı, G., Çam, N., Akgün, G., . . . Ergene, O. (2022). “Koroner Kalp Hastalığı Riski ve Değerlendirilmesi”. Türk Kardiyoloji Derneği: <https://tkd.org.tr/kilavuz/k11/4e423.htm?wbnum=1604> adresinden alındı.
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B. ve Prakash, H. (2016). “Recent advances in biosensor technology for potential applications—an overview”. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. Volume 4.
- Wang, Y., Sun, B., Wei, H., Li, Y., Hu, F., Du, X. ve Chen, J. (2022). “Investigating immunosensor for determination of depression marker-Apo-A4 based on patterning AuNPs and N-Gr nanomaterials onto ITO-PET flexible electrodes with amplifying signal”. *Analytica Chimica Acta*, Volume 1224.
- World Health Organization. (2022). World Health Statistic 2022. Geneva: World Health Organization.
- Yemlihan Ceylan, Yüksel Kaya. (2011). “Akut Koroner Sendrom Kliniği ile Başvuran Hastalarda Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri”. *Van Tıp Dergisi*, 147-154.

Yeşil, P. ve Altıok, M. (2012). “Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde fiziksel aktivitenin önemi”. *Türk Kardiyol Derneği Kardiyovasküler Hemşirelik Dergisi*, 39-48.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

İsim SOYİSİM :

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi :

Bildiği Yabancı Diller :

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar

1) SCI

2) Diğer

#### b) Bildiriler

1) Uluslararası

2) Ulusal

#### c) Katıldığı Projeler

### İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

### İLETİŞİM

E-posta Adresi :

ORCID :