



**KÂĞIT TABANLI ELEKTROTLAR KULLANILARAK EMPEDANS
SPEKTROSKOPİK ANALİZ YÖNTEMİ İLE EKSOZOM TAYİNİ**

Sevda AKAY SAZAKLIOĞLU

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına 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 beyan ederim.

Sevda AKAY SAZAKLIOĞLU

29/12/2022

KÂĞIT TABANLI ELEKTROTLAR KULLANILARAK EMPEDANS SPEKTROSKOPİK ANALİZ YÖNTEMİ İLE EKSOZOM TAYİNİ

(Doktora Tezi)

Sevda AKAY SAZAKLIOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2022

ÖZET

Günümüzde tümörün erken bir aşamada saptanması, kanser kaynaklı ölüm oranını düşürmektedir. Eksozomlar, kansere bağlı hastalıkların erken teşhisi ve prognoz tahmininde önemli rol oynayan potansiyel biyobelirteçlerdir. Bu tez çalışmasında, eksozomların vücut sıvılarındaki miktarını tespit etmek amacıyla elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılarak üç farklı biyosensör geliştirilmiştir. Elektrot malzemeleri disk, ekran baskılı ve kâğıt tabanlı olmak üzere üç farklı elektrot malzemesiyle geliştirilmiştir. CD63 ve CD9 eksozom yüzey antijenleri hedeflenen kanser biyobelirteçleridir. Biyosensör hazırlanmasında, ara yüzey olarak merkaptoundekanoik asit (MUA) kullanılmıştır. Anti-CD63 ve anti-CD9 ise geliştirilen sensörlerin biyotanıma elementleridir. Elektrot yüzeyinde yapılan modifikasyonların teşhisinde elektrokimyasal teknikler (Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopi, Dönüşümlü Voltametri) ve morfolojik teknikler (Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, seçiciliği, tekrarlanabilirliği ve raf ömrü izlenmiştir. Ek olarak, biyosensörlerin klinik başarısını izlemek için yapay idrar, hücre kültürleri ve idrar örneklerinde eksozom tayini gerçekleştirilmiştir. ELISA testi ile kıyaslama yapılarak, geliştirilen yöntemin doğruluğu belirlenmiştir. Tezin ilk kısmında, eksozom tayini sonucunda gözlenen sinyaller ile dört farklı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve bu eğrilerin kalibrasyon katsayısı ve LOD değerlerine yönelik kıyaslamalar yapılmıştır. Bu çalışmada kübik polinom modeli ile $3,9 \times 10^{11}$ partikül μL^{-1} olarak elde edilen LOD, sensörün özellikle hücre kültürü gibi numunelerde hassas ve güvenilir olarak kullanılabileceğini göstermiştir. İkinci olarak ekran baskılı altın elektrotlar (G-SPE) ile eksozom tayini için yöntem geliştirilmiş ve LOD değeri $2,0 \times 10^3$ partikül mL^{-1} olarak bulunmuştur. Aynı elektrot ile referans yapay idrar örneğinde eksozom geri kazanımı % 93,67 olarak elde edilmiştir. Tezin üçüncü kısmında ise nitroselüloz membran kullanılarak eksozom standartları için kâğıt tabanlı sensör tasarlanmıştır. Bu sensör ile 5 μL örnek hacmi kullanılarak eksozom tayininde LOD değeri $5,07 \times 10^2$ partikül mL^{-1} olarak bulunmuştur.

Bilim Kodu : 20102

Anahtar Kelimeler : Doğrusal olmayan kalibrasyon eğrisi, eksozom tayini, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, kâğıt tabanlı elektrot

Sayfa Adedi : 122

Danışman : Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN

DETERMINATION OF EXOSOME BY EMPEDANCE SPECTROSCOPIC ANALYSIS
METHOD USING PAPER-BASED ELECTRODES

(Ph. D. Thesis)

Sevda AKAY SAZAKLIOĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2022

ABSTRACT

Today, detecting the tumor at an early stage reduces the cancer-related death rate. Exosomes are potential biomarkers that play an important role in the early diagnosis and prognosis prediction of cancer-related diseases. In this thesis, three different biosensors were developed using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) method to detect the amount of exosomes in body fluids. Electrode materials have been developed with three different electrode materials: disc, screen-printed and paper-based. CD63 and CD9 exosome surface antigens are targeted cancer biomarkers. In the preparation of the biosensor, mercaptodecanoic acid (MUA) was used as the interface. Anti-CD63 and anti-CD9 are the biorecognition elements of the developed sensors. Electrochemical techniques (Electrochemical Impedance Spectroscopy, Cyclic Voltammetry) and morphological techniques (Scanning Electron Microscopy) were used to diagnose the modifications made on the electrode surface. Limit of detection, limit of quantification, selectivity, repeatability and shelf life of the developed method were monitored. In addition, exosome determination was performed in artificial urine, cell cultures and urine samples to monitor the clinical success of the biosensors. The accuracy of the developed method was determined by comparing with the ELISA test. In the first part of the thesis, four different calibration curves were created with the signals observed as a result of the exosome determination and comparisons were made for the calibration coefficient and LOD values of these curves. In this study, the LOD obtained as 3.9×10^{11} particles μL^{-1} with the cubic polynomial model showed that the sensor can be used sensitively and reliably, especially in samples such as cell culture. Secondly, a method was developed for the detection of exosomes with screen-printed gold electrodes (G-SPE) and the LOD value was found to be 2.0×10^3 particles mL^{-1} . With the same electrode, exosome recovery was obtained as 93.67% in the reference artificial urine sample. In the third part of the thesis, paper-based sensor was designed for exosome standards using nitrocellulose membrane. The LOD value was found to be 5.07×10^2 particles mL^{-1} in exosome determination using 5 μL sample volume with this sensor.

Science Code : 20102

Key Words : Nonlinear calibration curve, exosome detection, electrochemical impedance spectroscopy, paper-based electrode

Page Number : 122

Supervisor : Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN

TEŞEKKÜR

Bu yolculuğu başarılı bir şekilde sonuca ulaştırmam için yardımcı olan güzide insanlara bu vesile ile şükranlarımı sunmak isterim.

Öncelikle bilgi birikimi ile yoluma ışık tutan, anlayışı, bilime olan sevgisi ve geniş vizyonu ile her zaman örnek alacağım kıymetli danışmanım Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN’a doktora çalışmalarına verdiği destek için gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Uğur TAMER, Prof. Dr. Orhan ATAKOL ve Prof. Dr. Hafize Seda VATANSEVER’e çalışmalarımın ilk anından son anına kadar sunmuş oldukları bilimsel rehberlik için teşekkür ederim.

Kıymetli Hocalarım Prof. Dr. Lokman UZUN ve Prof. Dr. Özcan YALÇINKAYA’ya tezime yapmış oldukları katkılar için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın en başından itibaren desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üye. Hilal TORUL’a çok teşekkür ederim.

Kanser hücrelerinin kültüre edilmesi ve eksozom sayımı konusunda çalışmama destek olan Dr. Hilal KABADAYI’ya ayrıca teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve bu noktaya gelmemde büyük pay sahibi olan annem, babam ve kardeşime; sevgili eşim ve can oğluma da tarifi mümkün olmayacak bir samimiyet ve içtenlikle benimle birlikte oldukları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER	5
2.1. Biyosensörler.....	5
2.1.1. Biyosensörlerin yapısı ve işlevi	6
2.1.2. Biyosensörlerde dönüştürücü sistemler.....	8
2.1.3. Biyosensörlerde kullanılan elektrot materyalleri	16
2.2. Eksozomlar.....	28
2.2.1. Eksozom biyogenezi	31
2.2.2. Eksozomların görevleri	31
2.2.3. Eksozomların kanserdeki rolü.....	32
2.2.4. Eksozom tayin yöntemleri.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Gereç	37
3.1.1. Kimyasal maddeler ve malzemeler	37
3.1.2. Kullanılan cihazlar	38
3.2. Yöntem.....	38

	Sayfa
3.2.1. Kalın bağırsak kanseri hücre hattından izole edilen Colo 320 eksozomlarının klasik altın elektrot ile tayin metodu	38
3.2.2. Eksozom standartlarının ekran baskılı altın elektrotlar ile tayini	40
3.2.3 Eksozom standartlarının kâğıt-tabanlı elektrotlar kullanılarak tayini	43
4. BULGULAR	45
4.1. Colo 320 Eksozomlarının Altın Elektrot İle Tayini	45
4.1.1. ELISA ile eksozom partikül tayini	45
4.1.2. Biyosensör tasarımı	46
4.1.3. Au/MUA/Anti-CD63/GE biyosensörü ile colo 320 eksozomlarının impedimetrik tespiti	48
4.1.4. Tasarlanan sensöre ait kalibrasyon eğrisi çalışmaları	51
4.2. Ticari Eksozom Örneklerinin Ekran Baskılı Altın Elektrot ile Tayini	58
4.2.1. Cihaz üretimi	58
4.2.2. SPE'lerin floresans mikroskop görüntüleri	59
4.2.3. SPE biyosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu	60
4.2.4. İnkubasyon süresi ve anti-CD63 konsantrasyonunun optimizasyonları ...	64
4.2.5. SPE biyosensörünün analitik performansı	68
4.2.6. Seçicilik çalışmaları	71
4.2.7. GSPE için stabilite çalışması	73
4.2.8. Yöntemin yapay idrar ile doğrulanması	74
4.3 Eksozom Standartlarının Kâğıt-Tabanlı Elektrotlar Kullanılarak Tayini	78
4.3.1. Kâğıt tabanlı elektrotların karakterizasyonu	78
4.3.2. Deneysel koşulların optimizasyonu	83
4.3.3. Kâğıt tabanlı eksozom biyosensörünün analitik performansının incelenmesi	87
4.3.4. Eksozom biyosensörünün seçiciliği	89
4.3.5. Eksozom biyosensörü için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması	91

	Sayfa
4.3.6. Eksozom biyosensörünün kararlılığı.....	92
4.3.7. Kâğıt tabanlı elektrot ile Colo 741 Hücre hattından elde edilen eksozomların tayini	93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	121

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. EIS’de kullanılan ortak elektrik elemanları	13
Çizelge 2.2. Biyosensörlerde kullanılan bazı malzemeler ve özellikleri	18
Çizelge 2.3. Ekran baskılı elektrotlara dayalı biyosensörler üzerine mevcut araştırmalara genel bakış.....	20
Çizelge 2.4. Kâğıt tabanlı elektrot kullanılarak tasarlanan çeşitli biyosensörler	24
Çizelge 2.5. Farklı hidrofobik bariyer oluşturma teknikleri ile geliştirilen biyosensörler	28
Çizelge 2.6. Eksozomların protein bileşenleri	30
Çizelge 2.7. Eksozom karakterizasyon yöntemlerinin amacı, avantajları ve dezavantajları	36
Çizelge 4.1. Altın elektrodun modifikasyonuna ait RCT ve reel impedans verileri.....	48
Çizelge 4.2. Çeşitli derişimlerdeki Colo 320 numunelerinin göreceleri impedimetrik cevapları.....	49
Çizelge 4. 3. Farklı yöntemlerin eğri uydurma etkinliğinin karşılaştırılması	58
Çizelge 4.4. SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin CV tekniği ile ölçülen anodik ve katodik pik akımlarının ortalama değerleri (n=3)	63
Çizelge 4.5. SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin logaritmik reel impedans verileri (n=3).....	64
Çizelge 4.6. Geliştirilen eksozom biyosensörünün analitik cevapları	70
Çizelge 4.7. Literatürdeki mevcut eksozom tayinlerinin analitik performansları ve geliştirilen yöntem ile karşılaştırılması	71
Çizelge 4.8. Eksozom tayini için, üç farklı yapay idrar örneğiyle yapılan doğruluk çalışması.....	77
Çizelge 4.9. Yapay idrarda eksozom tespiti için geri kazanım değerleri.....	77
Çizelge 4.10. PE ve AuNPs@PE'nin CV tekniği ile ölçülen anodik ve katodik pik akımlarının ortalama değerleri (n=3)	78
Çizelge 4.11. AuNP'lerin birikmesinden önce ve sonra kâğıt elektrotlar için yük RCT, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%BSS) değerleri ...	80
Çizelge 4.12. PE eksozom biyosensörüne ait gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	91

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.13. PE eksozom biyosensörüne ait kararlılık çalışması sonuçları	93
Çizelge 4.14. Eksozom biyosensörünün farklı derişimdeki Colo 741 eksozomlarına olan impedimetrik cevapların değerdendirilmesi	95
Çizelge 4.15. Colo 741 Eksozom tayininin % Geri kazanım hesabının yapılması.....	96

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Biyosensörlerin temel bileşenleri [16].....	6
Şekil 2.2. Çeşitli tipte biyoreseptör ve dönüştürücüye sahip biyosensör tasarımları (a) [17], (b) [18] , (c) [19], (d) [20].....	6
Şekil 2.3. Elektrokimyasal biyosensör türlerinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.4. EIS devresi ve geleneksel bir elektrokimyasal hücrede (üç elektrotlu sistem) çalışma elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonunun şematik gösterimi	11
Şekil 2.5. Nyquist (a) ve Bode (b) diyagramlarının şematik gösterimi	12
Şekil 2.6. Randles devresi sisteminin bileşenleri: çözelti direnci (RS), çift katmanlı kapasitans (CDL), yük transfer direnci (RCT) ve warburg impedansı (W) ...	13
Şekil 2.7. Faradaik olmayan (a) ve Faradaik (b) impedimetrik biyosensörlerin şematik gösterimi	15
Şekil 2.8. Biyosensörlerde kullanılan farklı elektrot malzemeleri.....	17
Şekil 2.9. Elektrokimyasal biyosensörlerde kâğıt elektrodun çeşitli kullanım şekilleri .	23
Şekil 2.10. Kâğıt elektrot yüzeyinde bariyer oluşumu için kullanılan teknikler: (a) lazer ile muamele, (b) fotolitografi, (c) bal mumu baskı, (d) elek baskı, (e) plazma ile muamele, (f) flekso baskı	25
Şekil 2.11. Ekstrasellüler veziküllerin biyolojik olarak bilinen dört farklı tipi: a) Apoptozomlar b) Mikroveziküller c) Eksozomlar d) Retrovirüs benzeri veziküller.....	29
Şekil 2.12. NanoSight cihaz konfigürasyonu.....	33
Şekil 2.13. Nanopartikül izleme analizi (NTA), 100 nm'den büyük veziküller için yüksek hassasiyetle mutlak boyut dağılımının belirlenmesi.....	34
Şekil 2.14. Dinamik ışık saçılımı (DLS), göreceli boyut dağılımının belirlenmesi	35
Şekil 2.15. Saçılma akış sitometrisi ile eksozom derişiminin belirlenmesi	35
Şekil 3.1. Floresans mikroskop görüntüleri için sensörlerin hazırlanması	41
Şekil 3.2. Kâğıt elektrotların üretim yönteminin şematik gösterimi.....	43
Şekil 4.1. Eksozom derişimi bilinmeyen örneklerde kullanılmak üzere hazırlanan ExoELISA-ULTRA CD63 standart eğrisi	45
Şekil 4.2. Klasik altın elektrot ile eksozom tayininin şematik gösterimi.....	46

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. Çıplak, MUA, anti-CD63 ve Colo 320 eksozomu ($4,0 \times 10^{12}$ eksozom partikül μL^{-1}) inkübe edilen biyosensörün 1mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / PBS 7,4 içinde ölçülen (●) ve simüle edilen (■) veri noktalarıyla Nyquist grafiği	47
Şekil 4.4. Çıplak, MUA, anti-CD63 ve Colo 320 eksozomu ($4,0 \times 10^{12}$ eksozom partikül μL^{-1}) inkübe edilen biyosensörün Bode grafiği.....	47
Şekil 4.5. Farklı derişimlerde eksozom uygulanmasından önceki (●) ve sonraki (◇) sensörün Bode diyagramı	49
Şekil 4.6. Altın elektrot ile hazırlanan biyosensörün farklı derişimler için ölçülen gerçek impedansın göreceli cevapları	50
Şekil 4.7. Altın elektrot ile hazırlanan biyosensörün Randless Devresine göre hesaplanan yük transfer dirençleri	51
Şekil 4.8. Veri noktalarının doğrusal olarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi.....	52
Şekil 4.9. Veri noktalarının üstel fonksiyon kullanılarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi	53
Şekil 4.10. Veri noktalarının ikinci dereceden polinom fonksiyonu kullanılarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi	55
Şekil 4.11. Veri noktalarının üçüncü dereceden polinom fonksiyonu kullanılarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 4.12. Ekran baskılı altın elektrot ile eksozom tayinine yönelik şematik gösterim.....	59
Şekil 4.13. EIS ölçümlerinin simülasyonunda kullanılan $\text{R}(\text{C}(\text{RW}))$ elektrik devresi ...	61
Şekil 4.14. +0,1 V'luk bir potansiyelde immünosensör için Nyquist diyagramı	61
Şekil 4.15. +0,1 V'luk bir potansiyelde immünosensör için Bode diyagramı	62
Şekil 4.16. SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin döngüsel voltamogramları	62
Şekil 4.17. İnkubasyon süresinin optimizasyonu için Nyquist diyagramı.....	65
Şekil 4.18. İnkubasyon süresinin optimizasyonu için Bode diyagramı	65
Şekil 4.19. İnkubasyon süresi optimizasyonu, (a) Nyquist Plot (b) Bode Diyagramından elde edilen gerçek impedansların logaritma (0) değerleri...	66
Şekil 4.20. Anti-CD63 derişim optimizasyonu için Nyquist diyagramı	67
Şekil 4.21. Anti-CD63 derişimi optimizasyonu için Bode diyagramı	67

Şekil	Sayfa
Şekil 4.22. Anti-CD63 konsantrasyonunun ($3,7 \times 10^5$ eksozom mL^{-1}) optimizasyonu, (a) Nyquist Plot (b) Bode Diyagramından gerçek impedansların logaritma (0) değerleri	68
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarına eksozom uygulanan immünosensörler için EIS ölçümleri	69
Şekil 4.24. Eksozom tayini için kalibrasyon grafiği	69
Şekil 4.25. Biyosensörün seçicilik çalışması için Nyquist diyagramı	72
Şekil 4.26. Biyosensörün seçicilik çalışması için Bode diyagramı	72
Şekil 4.27. R_{CT} (a) ve 1 frekansındaki (log 0) gerçek impedans (b) değerine sahip anti- CD63@SPE biyosensörünün Igg, hCG, hGH ve $3,7 \times 10^7$ partikül mL^{-1} standart eksozomlarına karşı cevaplarının karşılaştırmalı tespiti.....	73
Şekil 4.28. G-SPE eksozom sensörü için stabilite çalışması	74
Şekil 4.29. Yapay idrarda eksozom tespiti için Nyquist diyagramı.....	75
Şekil 4.30. (a) Eksozom biyosensörü için kalibrasyon (siyah) ve doğrulama (kırmızı) grafikleri (b) PBS ve yapay idrar ortamında eksozom bağlanması ile gözlemlenen R_{CT} değerlerinin sütun grafiği.....	76
Şekil 4.31. PE ve AuNPs@PE için (a) CV ve (b) EIS ölçümleri	79
Şekil 4.32. PE ve AuNPS@PE için SEM-EDX analiz sonuçları	83
Şekil 4.33. Anti-CD9 derişim optimizasyonu a) Nyquist diyagramı, b) verilerin değerlendirilmesi.....	85
Şekil 4.34. İnkubasyon sıcaklığı optimizasyonu a) Nyquist diyagramı, b) verilerin değerlendirilmesi.....	86
Şekil 4.35. İnkubasyon süresi optimizasyonu a) Nyquist diyagramı, b) verilerin değerlendirilmesi.....	87
Şekil 4.36. Kâğıt tabanlı eksozom biyosensörüne ait a) kantitatif ölçüm sonuçları ve b) kalibrasyon grafiği	88
Şekil 4.37. PE Eksozom biyosensörüne ait EIS ölçümleri	89
Şekil 4.38. Kâğıt sensörün seçicilik çalışmasına ait a) Nyquist diyagramları ve b) R_{CT} verilerinin değerlendirilmesi	90
Şekil 4.39. CEA, Glukoz ve Sistein inkübasyonu için Göreceli Tepki değerleri	91
Şekil 4.40. PE eksozom sensörlerinin kararlılık çalışması	92

Şekil	Sayfa
Şekil 4.41. Eksozom biyosensörün kararlılık çalışması için Nyquist diyagramı (a) 0. gün (b) 5. gün (c) 14. gün ve (d) 28. gün.....	93
Şekil 4.42. Colo 741 hücre hattından elde edilen eksozomların EIS ölçümleri	94
Şekil 4.43. Colo 741 eksozomların doğrusal impedimetrik cevapları	95
Şekil 4.44. İmpidimetrik cevapların her bir konsantrasyon için sütun grafiği ile belirtilmesi	96

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. SPE'lerin floresan mikroskop görüntüleri: (a)Ab-FITC@SPE, (b) Ab-FITC_Anti-CD63@SPE ve (c) Ab-FITC_Eksozom_ Anti-CD63@SPE.....	60
Resim 4.2. (a) PE ve (b) AuNPs@PE için SEM görüntüleri	81
Resim 4.3. (a) Anti-CD9/AuNPs@PE ve (b) eksozom inkübe edilmiş Anti-CD9/AuNPs@PE'nin SEM görüntüleri.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

CDL	Çift Katmanlı Kapasitans
GE	Klasik Altın Elektrot (Gold Electrode)
G-SPE	Ekran Baskılı Altın Elektrot (Screen-printed Gold Electrode)
PE	Kâğıt Elektrot (Paper Electrode)
RCT	Yük Transfer Direnci
RS	Çözelti Direnci
W	Warburg Elementi
χ^2	Ki-kare serbestlik derecesi

Kısaltmalar

Açıklamalar

AC	Alternatif Akım
Au	Altın
AuNP	Altın Nanoparçacık
BC	Bakteriyel selüloz
BSA	Sığır Serum Albümini
BSS	Bağıl Standart Sapma
CE	Karşıt Elektrot
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CV	Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltammetry)
DC	Doğru Akım
DLS	Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-Etilkarbodimid Hidroklorür
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi

Kısaltmalar	Açıklamalar
EV	Ekstraselüler Vezikül (Extracellular Vesicle)
FITC	Keçi Anti-Fare IgG Antikoru
ITO	İndiyum Kalay Oksit
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MCC	Mikrokristalin Selüloz
MUA	11-Merkaptoundekanoik asit
N	Azot
NC	Nitroselüloz
NHS	N-Hidroksisülfo- Süksinimid Sodyum Tuzu
NTA	Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Analysis)
PAD	Kâğıt Tabanlı Analitik Cihaz (Paper-based Analytical Devices)
PDMS	Polidimetilsiloksan
PEG	Polietilen Glikol
POC	Bakım Noktası
RE	Referans Elektrot
RR	Göreceli Cevap
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabaka (Self-Assembled Monolayer)
SD	Standart Sapma
SE	Standart Hata
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
SERS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi
SPE	Ekran Baskılı Elektrot
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
WB	Western Blot
WE	Çalışma Elektrodu
µPAD	Mikroakışkan Kâğıt Tabanlı Analitik Cihaz

1. GİRİŞ

Kanser, bir organ veya dokudaki anormal hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla ortaya çıkan bir hastalık grubudur. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilir. Kanser oluşumuna yol açan değişiklikler, bir kişinin genetik faktörleri ile aşağıdakiler de dâhil olmak üzere üç dış etken kategori arasındaki etkileşimin sonucudur:

- Ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kanserojenler
- Asbest, tütün dumanı bileşenleri, alkol, aflatoksin (bir gıda kirleticisi) ve arsenik (bir içme suyu kirleticisi) gibi kimyasal kanserojenler
- Belirli virüslerden, bakterilerden veya parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlar gibi biyolojik kanserojenler

Vakalar erken tespit edilip tedavi edildiğinde kanser mortalitesi azalır. Erken teşhis, kanserin tedaviye yanıt verme olasılığını yükseltir, daha az morbidite ve düşük maliyetli tedavi ile hayatta kalma olasılığını artırır. Kanser erken teşhisi ve bakımda gecikmelerin önüne geçilmesi ile kanser hastalarının hayatlarında önemli iyileştirmeler sağlanabilir.

Tümör hücrelerinden salınan eksozomlar, protein, RNA, DNA, lipid ve karbonhidrat gibi makromoleküler bileşenler içerir. Bu bileşenler, tümör oluşumu ve gelişiminin tüm aşamalarında önemli rol oynar. Ayrıca, kaynak tümör hücrelerinin fizyolojik ve patolojik durumu hakkında bilgi verir. Son zamanlarda, tümör kaynaklı eksozomlar, invaziv olmayan sıvı biyopsi ve çok sayıda kanserin teşhisi için popüler biyobelirteçler haline gelmiştir. Bununla birlikte, tümör kaynaklı eksozomların içsel doğası, karmaşık biyolojik sıvıyı tespit etmek ve değerlendirmek için gelişmiş yöntemler gerektirir [1]. Eksozom biyosensörlerinin tasarımıdaki en büyük zorluk hem küçük boyutları hem de vücut sıvılarındaki düşük konsantrasyonlarıdır. Bu noktada yüksek hassasiyetli ve düşük numune gereksinimi ile çalışan biyosensörler, eksozomların tespiti için ideal bir yöntem sunmaktadır.

Biyosensörler günümüzde biyomedikal tanı, tedavi ve hastalık seyrinin belirlenmesi, çevresel izleme, gıda kontrolü, ilaç keşfi, adli tıp ve biyomedikal araştırma gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyosensörlerin geliştirilmesi için çok çeşitli

teknikler kullanılabilir. Yüksek afiniteli biyomoleküllerle birleştirilmeleri, bir dizi analitin hassas ve seçici olarak tayinine olanak sağlamaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler, enzim substrat reaksiyonu ve antijen-antikor etkileşimi gibi biyokimyasal olayları elektrik sinyallerine (örn. akım, voltaj, empedans, vb.) dönüştürmektedir. Elektrokimyasal biyosensörler yüksek hassasiyet, tekrarlanabilirlik, minyatürize edilebilme ve küçük analit hacimleri ile kullanılabilme gibi avantajlara sahiptir [2].

Elektrokimyasal biyosensörler, biyomoleküllerin tanımlama bilgilerini potansiyel, akım ve impedans gibi sinyallere dönüştürür. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS), etiketsiz bir algılama yöntemidir ve bu durum diğer elektrokimyasal teknikler ile kıyaslandığında önemli bir üstünlük sağlar [3–6]. İmpedans tabanlı biyosensörlerde seçimlik, elektrot yüzeyindeki ince bir film üzerinde bir biyoreseptör (örn. antikor) ve ona karşılık gelen spesifik analit (örn. antijen) arasında bir tanıma kompleksi oluşumuyla sağlanır. Bu oluşum, elektrot/elektrolit arayüzünde hem arayüzey kapasitansını hem de yük transfer direncini değiştirir. Bu nedenle, dönüştürücü yüzeyler ilgili biyomalzemelerle değiştirildiğinde, impedans tabanlı biyosensörler güçlü analitik cihazlar olarak kullanılır.

EIS verilerini değerlendirmek için en popüler formatlar Nyquist ve Bode grafikleridir. Nyquist grafiği, sanal impedans bileşeni (Z'') ile elektriksel arayüz ve elektron transfer reaksiyonu hakkında bilgi veren gerçek impedans bileşenine (Z') karşı çizilir. Bode formatında ise, hem mutlak impedansın logaritması $|Z|$ hem de faz açısı (ϕ), uyarma frekansının logaritmasına karşı çizilir.

İdeal bir biyosensör, gerçek uygulamalarda düşük maliyet ve yüksek kararlılık gereksinimlerini karşılamalıdır. Substrat seçiminde de örneğin esneklik, biyouyumluluk, biyobozunurluk, geçirgenlik ve taşınabilirlik gibi farklı özellikler göz önünde bulundurulmaktadır [7]. Bu amaçla biyosensörlerde cam, polidimetilsiloksan (PDMS), silikon ve kâğıt gibi substratlar kullanılmıştır [8]. Bu malzemeler arasında kâğıdın alt tabaka olarak kullanımı, lifli yapısından dolayı oldukça popülerdir ve modifikasyon işlemini kolaylaştırmaktadır. Son zamanlarda, kâğıt tabanlı analitik cihazlar (PAD), minyatür cihazları düşük maliyetle geliştirmenin etkili bir yolu olarak oldukça dikkat çekmiştir. Ayrıca, biyoalgılama platformları, özellikle hasta başı testler (POCT) cihazlarının geliştirilmesi hususunda birçok avantaj sunmaktadır [9, 10], çünkü birçok

tanıma probu (ligandlar, antikorlar ve aptamerler) (nitro) selüloz matrisinde kolayca hareketsiz hale getirilebilir [11–13]. Ayrıca kâğıdın kılcal bir yapısı vardır ve bu özellik, sıvı numunenin altlık üzerinde kolayca akmasını sağlarken aynı zamanda gaz halindeki numunelerin de selüloz dokularına nüfuz etmesine olanak sağlar [14]. Alt tabaka olarak seçilen kâğıt ile üç boyutlu (3B) tasarımı sensörler üretilirken kırılmayacak veya yırtılmayacak kadar esnek olmalıdır [15].

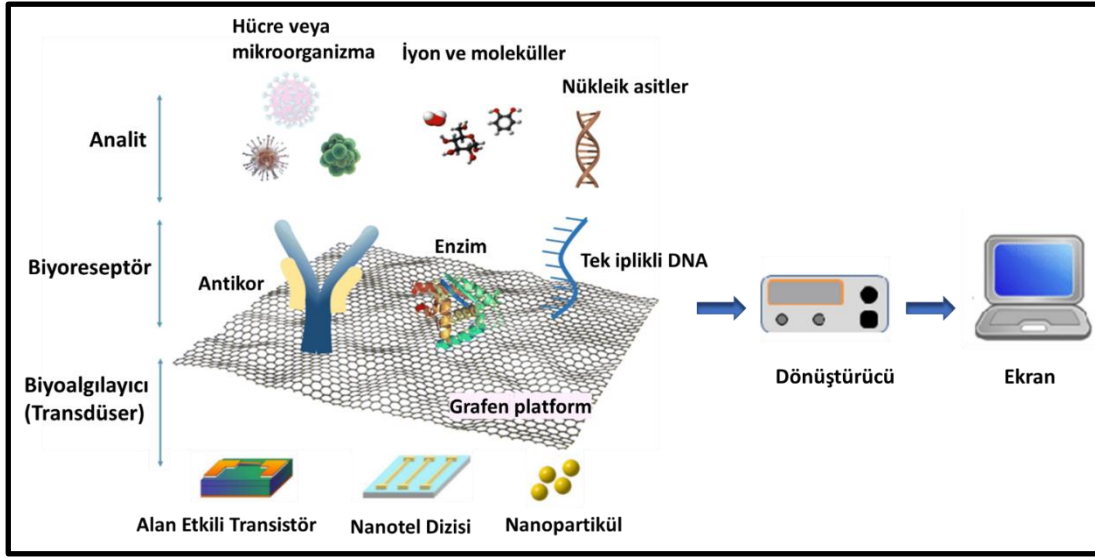
Bu tez kapsamında kanserin erken teşhisinde kullanılması amaçlanan eksozomların çeşitli elektrot malzemeleri ile impedimetrik tayinleri çalışılmıştır. Bunun için klasik altın elektrot (GE), ekran baskılı altın elektrot (G-SPE) ve kâğıt tabanlı elektrotlar (PE) kullanılmıştır. Geliştirilen biyosensörler için öncelikle standart eksozomlar ile kalibrasyon grafiği hazırlanmış ve LOD değerleri literatür ile kıyaslanmıştır. Ayrıca yöntemin doğruluğu, yapay idrar ve Colo 741 hücre kültürü ile belirlenmiştir. Böylelikle eksozomların tayininin hızlı ve düşük maliyet ile uygulanabileceği tüm verileri ile çalışmada sunulmuştur.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

"Sensör" kelimesi, kökenini, temelde herhangi bir şeyi "tanımlamak" anlamına gelen Latince "sentire" kelimesinden alır. 'Biyosensör' ise 'biyolojik sensör'ün kısaltılarak bir arada yazılmış şeklini temsil etmektedir. Biyosensörler, biyokimyasal parametrelerin, derişim bilgilerini, bir moleküler tanıma varlığı aracılığı ile ölçülebilir ve işlenebilir sinyallere dönüştüren analitik cihazlardır. Biyosensörlerin üretimi kimya, biyoloji ve mühendislikte çok disiplinli araştırmalar gerektirmektedir. Tipik bir biyosensör (a) analit, (b) biyoreseptör, (c) dönüştürücü, (d) elektronik aksam ve (e) ekrandan oluşur. Bir biyosensör sisteminin çalışmasına ait temel konsept Şekil 2.1'de belirtilmiştir.

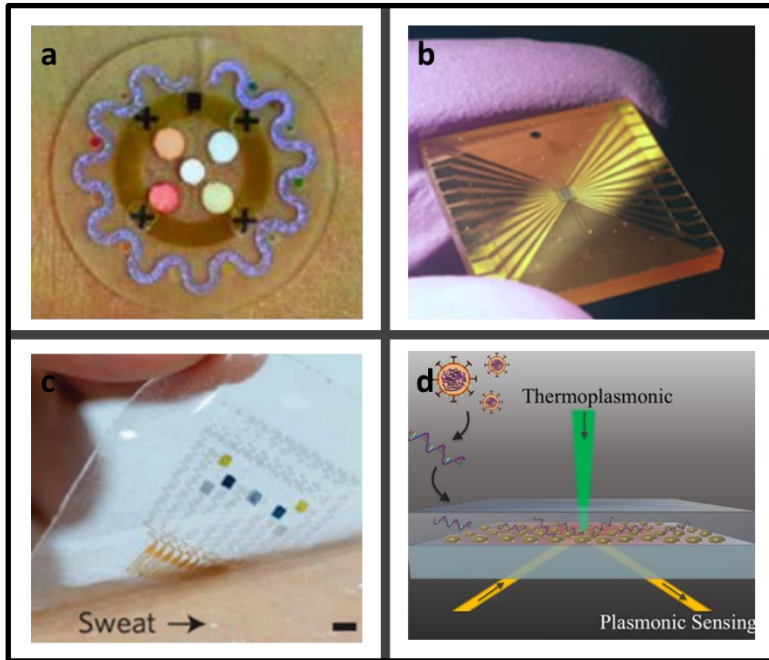
- Analit: Bileşenleri nitel ve nicel olarak tespit edilen ilgili madde analit olarak nitelendirilmektedir (örn. glikoz, amonyak, alkol ve laktoz).
- Biyoreseptör: Bir biyomolekül (molekül) veya hedef substratı (yani bir analit) tanıyabilen biyolojik tür, biyoreseptör (örn. enzimler, hücreler, aptamerler, deoksiribonükleik asit (DNA veya RNA) ve antikorlar) olarak bilinir. Biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşim sırasında sinyal üretim süreci (ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişimi) biyo-tanıma olarak adlandırılır.
- Dönüştürücü: Enerjiyi bir biçimden diğerine dönüştüren biyosensör bileşenidir. Biyolojik tanıma olayını, miktarla, kimyasal veya biyolojik bir hedefin varlığında, ölçülebilir bir sinyale (elektriksel) dönüştürür. Bu enerji dönüşüm süreci sinyalizasyon olarak bilinir. Dönüştürücüler, analit-biyoreseptör etkileşimlerinin miktarı ile orantılı olarak elektrokimyasal, optik, termal, elektronik ve gravimetrik sinyaller üretmektedir.
- Elektronik: Dönüştürülen sinyal işlenir ve görüntü için hazırlanır. Dönüştürücünden elde edilen elektrik sinyalleri büyütülür ve dijital forma dönüştürülür. İşlenen sinyaller, görüntüleme birimi tarafından nicelendirilir.
- Görüntüleme: Görüntüleme birimi, karşılık gelen yanıtın kullanıcı tarafından okunabilir ve anlaşılabilir olabilmesi için çıktı üreten bir bilgisayar veya yazıcı gibi bir kullanıcı yorumlama sisteminden oluşur. Kullanıcı ön koşuluna bağlı olarak çıktı, sayısal, grafik veya tablo şeklinde olabilir.



Şekil 2.1. Biyosensörlerin temel bileşenleri [16]

2.1.1. Biyosensörlerin yapısı ve işlevi

Genel olarak biyosensörler, enzimler, antikorlar, nükleik asitler veya hücreler gibi kullanılan biyolojik bileşene (biyoreseptör) veya elektrokimyasal, optik, kütle bazlı veya piezoelektrik dönüştürücü gibi dönüştürücü tipine göre sınıflandırılmaktadır. Literatürde yer alan farklı türlerdeki biosensörlerden birkaçı Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Çeşitli tipte biyoreseptör ve dönüştürücüye sahip biyosensör tasarımları (a) [17], (b) [18], (c) [19], (d) [20]

Enzim biyosensörlerinde enzimler tanıma elemanı olarak kullanılmaktadır. Bu biyosensör türleri, enzimlerin dönüştürücüye Van der Waals kuvvetleri, iyonik bağ veya kovalent bağ ile adsorpsiyonu üzerine tasarlanmıştır [16]. Enzim bazlı biyosensörlerde, hareketli enzimin göreceli kararsızlığı ve enzimin aktif geri kazanımındaki zorluklar nedeniyle enzim immobilizasyon teknikleri oldukça önem taşımaktadır [17]. Enzim-substrat etkileşimlerinin yüksek özgüllüğü ve saniyede katalizlenen substrat sayılarının yüksek olması gibi avantajlar, enzim bazlı biyosensörleri en kapsamlı çalışılan alanlardan biri haline getirmiştir.

İmmünosensörler, sensör yüzeyinde immobilize edilen bir antikor ile konsantrasyonu bilinmeyen bir antijen (veya analit) arasındaki spesifik etkileşime dayanan biyosensör türleridir. Antikor ile antijen arasında güçlü immün kompleksi oluşur; böylece sinyale dönüştürülen bir fizikokimyasal tepki üretilmektedir. Biyosensörün analite yüksek özgüllük göstermesinin, antikorların bağlanma bölgesinin uygun oryantasyonuna izin veren optimal immobilizasyon prosedürü, antikorların optimal yüzey yoğunluğu ve antikor immobilizasyonu için optimal matris seçimi gibi temel gereksinimleri bulunmaktadır [18].

Nükleik asit ile oluşturulan biyosensörler, genellikle tamamlayıcı sarmal ile hibridize olabilen, son derece yüksek verimliliğe ve iyi özgüllüğe sahip tek sarmallı DNA'dan oluşmaktadır; böylece tamamlayıcı sarmal DNA veya RNA'nın tespitini kolayca gerçekleştirilebilmektedir [19].

Hücre tabanlı biyosensörler ise uygun bir fizikokimyasal dönüştürücü ile fizyolojik değişiklikleri tespit etmek için tanıma elemanı olarak canlı hücrelerin kullanıldığı analitik cihazlardır. Hücre tabanlı biyosensörler analite karşılık fizyolojik bir yanıt sağlamak ve sensör sisteminin işlevselliğini arttırmak için yüksek kararlılık ve biyokatalitik aktivite özelliklerine sahiptirler [20].

Etkili bir biyosensör sistemi geliştirmek için belirli statik ve dinamik gereksinimler gereklidir. Bu özelliklere dayanarak, biyosensörlerin performansı ticari kullanımlar için optimize edilebilir [21, 22]. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler aşağıda belirtilmektedir:

Seçicilik: Biyoreseptör seçiminde dikkate alınması gereken önemli bir özelliktir. Bir biyoreseptör, karışım halindeki girişim yapıcı madde türlerini içeren bir numunede, belirli bir hedef analit molekülünü tespit edebilir.

Duyarlılık: Bir ölçüm aracının veya yöntemin duyarlılığı analizi yapılan bileşenin (analit) derişim farklarını ayırt etme yeteneğinin ölçüsüdür. Duyarlılık cihaz tarafından belirlenebilen en küçük derişim ile ifade edilir.

Doğrusallık: Yöntemin, numunedeki analit konsantrasyonuyla doğru orantılı test sonuçlarını elde etme yeteneğidir. Doğrusallık (düz çizgi) ne kadar yüksek olursa, hassasiyet o kadar yüksek olmaktadır.

Tepki süresi: Sonuçların %95'inin elde edilmesi için geçen süre tepki süresi olarak ifade edilmektedir.

Tekrar üretilebilirlik: Tekrar üretilebilirlik, kesinlik (örnek bir kereden fazla ölçüldüğünde benzer ölçüm sonuçlarının elde edilebilirliği) ve doğruluk (numune her seferinde ölçüldüğünde bir sensörün gerçek değere daha yakın bir ortalama değer üretme yeteneği) ile karakterize edilir. Aynı numune birden fazla ölçüldüğünde biyosensörün aynı sonuçları üretme yeteneğidir.

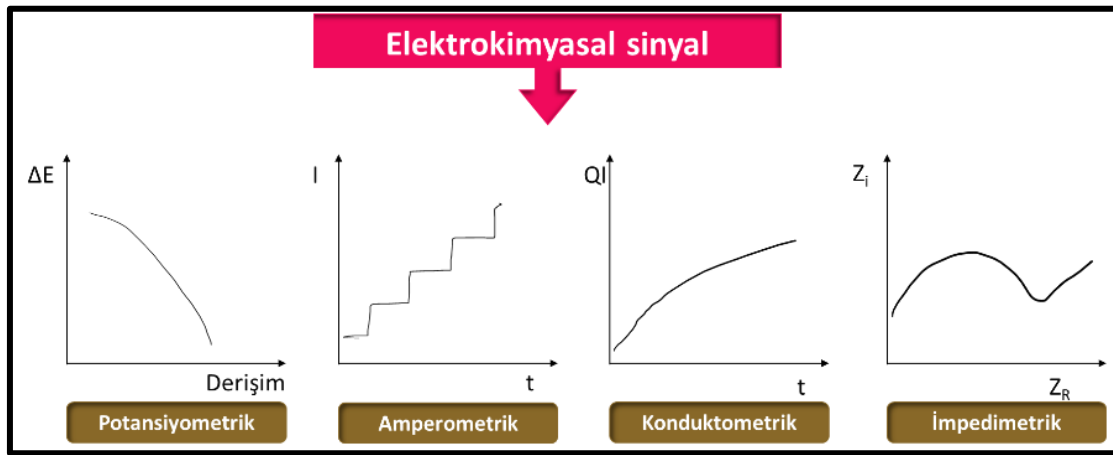
Kararlılık: Sürekli izlemenin gerekli olduğu biyosensör uygulamalarında temel özelliklerden biridir. Kararlılık, biyolojik cihazının içindeki ve dışındaki çevresel rahatsızlıklara karşı savunmasızlığın derecesidir. Kararlılığı etkileyen faktörler, biyoreseptörün afinitesi (analitin biyoreseptöre bağlanma derecesi) ve biyoreseptörün zamanla bozulmasıdır.

2.1.2. Biyosensörlerde dönüştürücü sistemler

Biyosensörün önemli bir parçası olan dönüştürücüler çalışma prensiplerine göre elektrokimyasal, optik, termal, elektronik ve gravimetrik olarak sınıflandırılmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, analit ve dönüştürücünün elektrokimyasal özelliklerine dayanan ve oldukça yaygın olarak kullanılan biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler yüksek hassasiyet, seçicilik ve algılama yeteneği göstermektedirler. Bu

biyosensör türünde, biyoreseptör ve analit arasındaki dönüştürücü yüzeyde voltaj, akım, impedans ve kapasitans açısından saptanabilir elektrokimyasal sinyaller üreten elektrokimyasal bir süreç meydana gelmektedir [23].

Bir elektrokimyasal biyosensörün aktarım elemanı, ana bileşenin genellikle bir çalışma elektrodu olduğu elektrokimyasal hücredir [24]. Elektrokimyasal biyosensörler aktarım ilkesine göre, (a) potansiyometrik, (b) amperometrik, (c) impedimetrik, ve (d) kondüktometrik olarak sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Elektrokimyasal biyosensör türlerinin şematik gösterimi

Potansiyometrik biyosensörler, sıfır akım altında, çalışma elektrodunda analit ve biyoreseptör etkileşimi nedeniyle biriken yükü, referans elektroda göre ölçer. Bir biyokimyasal reaksiyonu potansiyel bir sinyale dönüştürmek için iyon seçici elektrotlar ve iyona duyarlı alan etkili transistörler kullanılmaktadır [25] .

Amperometrik biyosensörler, iki veya üç elektrotlu sistemler ile çalışmaktadır. Bu sensörler, çalışma elektroduna sabit bir potansiyel uygulandığında (referans elektroduna göre), çalışma elektrodundaki elektrokimyasal reaksiyon sonucu aktarılan elektron akısını ölçer. Çalışma elektrodunun yüzeyinde üretilen akım, çözeltide bulunan analitin konsantrasyonu ile orantılıdır [26] .

Kondüktometrik biyosensörler, bir elektrokimyasal reaksiyon (analitin iletkenlik özelliklerindeki değişiklik) nedeniyle elektrot çifti arasındaki iletkenlik değişikliğini ölçer.

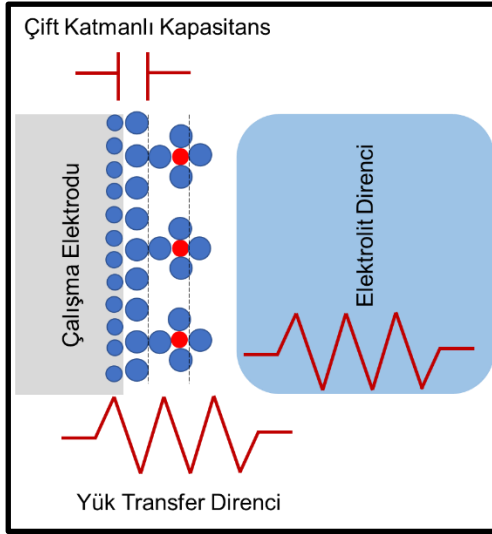
Kondüktometrik ve impedimetrik biyosensörler genellikle canlı biyolojik sistemlerdeki metabolik süreçleri izlemek için kullanılmaktadır [27].

EIS yöntemi, etiketsiz yöntemlere kapı araladığından biyosensör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. EIS ölçümlerinde, bir dizi frekans üzerine 5-10 mV arasında kontrollü bir AC elektriksel uyaran uygulanmaktadır. Sonuçta geçen akım ve verilen cevabın bir göstegesi olan faz açısı kaydedilerek, biyosensörden yüzeyinden cevabın taşınmasını sağlamaktadır [28, 29].

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

EIS tekniği, elektrokimyasal reaksiyonların mekanizmalarını araştırmak, malzemelerin dielektrik ve yük taşıma özelliklerini ölçmek, gözenekli elektrotların özelliklerini keşfetmek veya elektrokimyasal bakımdan pasif yüzeyleri araştırmak için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. EIS'in temelleri, Oliver Heaviside'in olağanüstü çalışmasıyla 1880'den 1900'e kadar olan zaman diliminde atılmıştır [30].

EIS, kullanılan elektrot sistemlerinin hem toplu hem de arayüzey elektriksel özelliklerinin araştırılması için oldukça uygun bir tekniktir. Geleneksel bir elektrokimyasal hücre, madde-(redoks türleri)-elektrot etkileşimlerini, elektrolitin direncine ek olarak elektroaktif türlerin konsantrasyonunu, yük transferini ve yığın çözeltiden elektrot yüzeyine kütle transferini içerir. Bu özelliklerin her biri, eşdeğer bir devre oluşturmak için paralel veya seri olarak bağlanan dirençler, kapasitörler veya sabit fazlı elemanları gibi farklı türlerdeki bir dizi elektrik devresi ile karakterize edilir (Şekil 2.4).



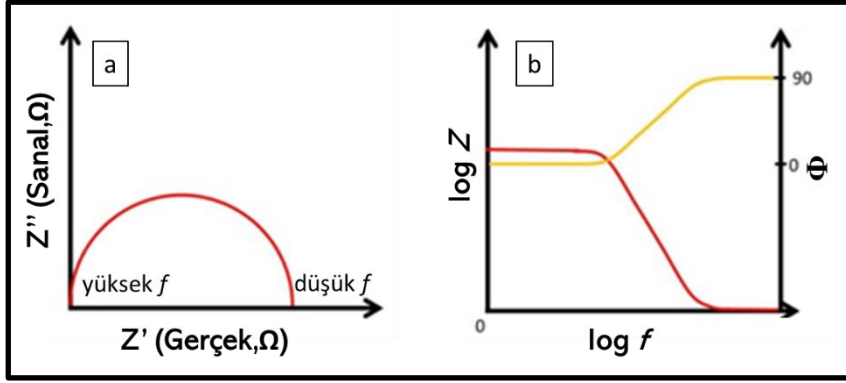
Şekil 2.4. EIS devresi ve geleneksel bir elektrokimyasal hücrede (üç elektrotlu sistem) çalışma elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonunun şematik gösterimi

İmpedimetrik biyosensörler, küçük bir sinüzoidal uyarı sinyali uygulandığında elektrot/elektrolit arayüzünde üretilen elektriksel impedans değerini ölçmektedir. Alternatif akım devrelerinde direncin eşdeğeri olarak ‘impedans’ kavramı kullanılmaktadır. İmpedans, Z , genel olarak, bir gerçek bileşen ve bir hayali bileşenden oluşan karmaşık bir niceliktir. Gerçek bileşeni temsil etmek için genellikle R sembolünü kullanır ve buna direnç denir. Sanal bileşeni temsil etmek için ise X sembolünü kullanılır ve buna reaktans denir. Bu değerler aşağıdaki formül (Eş. 2.1) ile belirlenir:

$$Z = R + jX \quad (2.1)$$

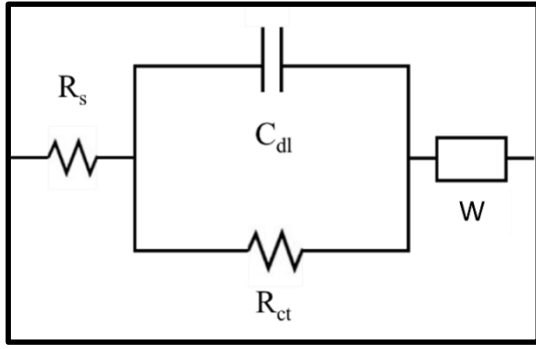
Bu denklikte; impedans ‘ Z ’, impedansın gerçek bileşeni ‘ R ’, impedansın sanal bileşeni ise ‘ X ’ sembolü ile gösterilmiştir. ‘ j ’ ise impedansın gerçek ve sanal bileşenlerini saf dirençten ayırmak için kullanılan sanal bir sayıdır.

Elektrokimyasal impedans verilerini değerlendirmek için kullanılan en popüler formatlar Nyquist ve Bode grafikleridir. Nyquist formatında, sanal impedans bileşeni (Z''), elektriksel arayüz ve elektron transfer reaksiyonu hakkında bilgi veren gerçek impedans bileşenine (Z') karşı çizilir. Bode Diyagramında ise hem mutlak impedansın logaritması, $|Z|$ hem de faz kaydırma, ϕ , uyarı frekansının logaritmasına karşı çizilir. Her iki grafiğe ait spektrumlar Şekil 2.5’te belirtilmiştir.



Şekil 2.5. Nyquist (a) ve Bode (b) diyagramlarının şematik gösterimi

Nyquist grafikleri genellikle eksen üzerinde uzanan yarım daire bir bölgeyi ve ardından düz bir çizgiyi içerir. Yarım daire kısmı (daha yüksek frekanslarda) elektron transferi ile sınırlı prosese karşılık gelir ve düz çizgi (düşük frekans aralığında) difüzyonla sınırlı prosesi temsil eder. Yüksek frekans aralığında impedansın ana bileşeni, çözeltiden kaynaklanan direnç (R_s) olurken, düşük frekanslarda impedans, elektron akışının meydana getirdiği dirençten veya elektrot yüzeyine yakın yüklerin direncinden (R_{CT}) oluşmaktadır. R_s , direnci ve reaksiyon hücresinin geometrisi, yani elektrotlar arasındaki mesafe ve elektrotları birbirine bağlayan çözelti kesit alanı tarafından belirlenir. Çift katmanlı kapasitans (C_{DL}), elektrot ve elektrolit arasındaki elektrostatik etkileşimi gösterir ve elektrot alanına, elektrolit ortamına, elektrolitin iyonik gücüne ve geçirgenliğe bağlıdır. Difüzyon, potansiyel pertürbasyonun frekansına bağlı olan Warburg impedansı olarak bilinen bir impedans oluşturmaktadır. Warburg impedansı, Nyquist grafiğinde apsise 45° açıyla düz bir çizgi olarak görülebilir. R_{CT} ve Warburg birlikte faradaik impedansı oluşturur. R_{CT} , yük transfer kinetiğini yansıtır ve kütle transferi sınırlamasının yokluğunda aşırı potansiyelin akıma oranını belirtmektedir. Her devre bileşeni, elektrokimyasal hücredeki fiziksel bir işlem sonucu oluşur ve karakteristik bir impedans davranışına sahiptir [31]. İmpidimetrik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan $R(C(RW))$ devresinin şematik gösterimi Şekil 2.6.'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Randles devresi sisteminin bileşenleri: çözelti direnci (R_s), çift katmanlı kapasitans (C_{dl}), yük transfer direnci (R_{ct}) ve warburg impedansı (W)

EIS verileri genellikle eşdeğer bir elektrik devresi modeline uydurularak analiz edilir. Modeldeki devre elemanlarının çoğu, dirençler, kapasitörler ve indüktörler gibi yaygın elektrik elemanlarıdır. Örneğin çoğu model, hücrenin çözelti direncini modelleyen bir direnç içerir. Çizelge 2.1. ortak devre elemanlarını, bunların akım-gerilim ilişkisinin denklemini ve devreye ait impedansları listelemektedir.

Çizelge 2.1. EIS’de kullanılan ortak elektrik elemanları

Bileşen	Akım Vs. Voltaj	İmpedans
Direnç	$E = IR$	$Z = R$
İndüktör	$E = L \, di/dt$	$Z = j\omega L$
Kapasitör	$I = C \, dE/dt$	$Z = 1/j\omega C$

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, hızlı, hassas, tahribatsız ve etiketsiz algılama konusunda umut verici bir bakış açısı sağlamaktadır. İmpedans tabanlı biyosensörler, elektrot yüzeyindeki ince bir film üzerinde bir biyoreseptör (antikor gibi) ve bu reseptöre karşılık gelen spesifik analit (antijen gibi) arasında bir tanıma kompleksi oluşumunu kullanır. Bu oluşum, elektrot/elektrolit arayüzündeki arayüzey kapasitansını ve yük transfer direncini değiştirir. Bu nedenle, dönüştürücü yüzeyleri, ilgili biyomalzemelerle değiştirildiğinde, impedans tabanlı biyosensörler güçlü analitik cihazlar olarak kullanılır [32, 33].

Bir analitin impedimetrik yöntem ile tespiti iki yolla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.7). $Ru(NH_3)_6^{3+/2+}$ veya $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ gibi redoks mediyatörlerinin varlığında gerçekleştiğinde ‘Faradaik’ olarak adlandırılır. Faradaik yöntemde, elektroaktif türler arasında indirgeme

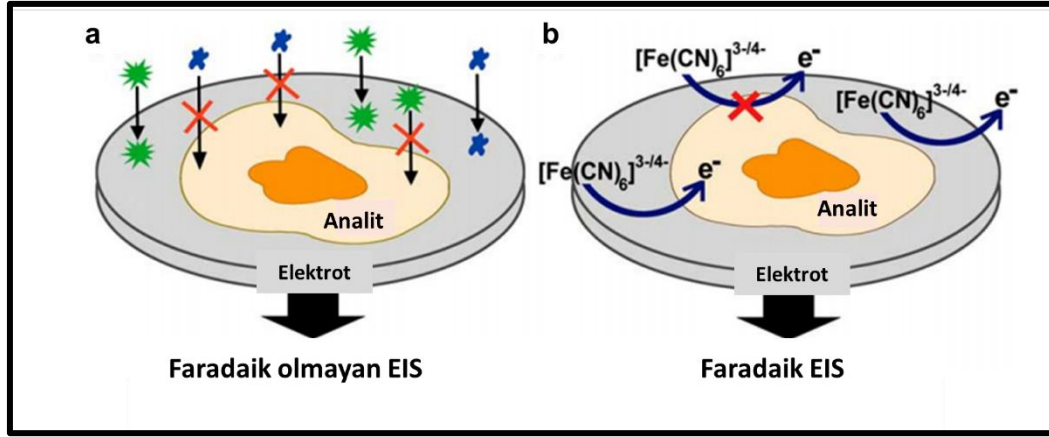
ve/veya oksidasyon reaksiyonları, bir elektrik akımının oluşmasına yol açan elektrotta gerçekleşir [34]. Bu nedenle, faradaik sensörler, elektrokimyasal reaksiyonların gelişimini desteklemek için redoks problemlerinin varlığını ve DC koşullarının uygulanmasını gerektirir. Bu tip EIS, üretilen akımın Ohm Yasasına uyması nedeniyle bu adı almaktadır. Faradaik akımın redoks reaksiyonlarında, aktarılan elektronların sayısı (n), Faraday sabitiyle (F), elektrodun yüzey alanı (A) ve arayüz sınırındaki elektroaktif moleküllerin akışı (j) ile ilgili olduğu anlamına gelmektedir (Eş. 2.2) [35].

$$I = nFAj \quad (2.2)$$

Faradaik biyosensörler, biyomoleküler etkileşimin neden olduğu sterik engelleme veya hedef moleküllerin serbest yükleri arasındaki elektrostatik itme nedeniyle faradaik akımdaki (arayüz elektron transfer direnci) değişikliği ölçmektedirler. Böylelikle modifiye elektrotta meydana gelen biyotanıma olayları tespit edilmektedir.

Faradaik yöntemin aksine, faradaik olmayan yöntem redoks çiftlerinin kullanımını gerektirmez ve sonuç olarak DC potansiyeli gerekmediğinden çoğu zaman referans elektroda ihtiyaç duyulmaz [36]. Bu özellikler, bu tür sensörleri minyatürleştirmeye ve çevrimiçi/gerçek zamanlı uygulamalarda kullanmaya uygun hale getirir. Bu tür bir teknikte, çift katmanlı kapasitansın şarj ve deşarj olmasıyla elektrot üzerindeki dielektrik değişiklikleri değerlendirmek mümkündür. Böylece, faradaik olmayan bir sensörün impedansı, iletken alt tabakaya hedef analit bağının yalıtkan özelliklerinin neden olduğu etkiden kaynaklanır. Tipik olarak, bu durumda, en önemli impedans parametresi çift katmanlı kapasitansdır (C_{DL}) ve yalnızca yük taşıyıcıları ve dönüştürücü substratının sınır katmanındaki konsantrasyonları ile sınırlıdır [34]. Bununla birlikte, $|Z|$ ve ϕ bileşenleri yeterli dönüştürücü parametreleridir. Bu durumda eşdeğer devre, direnç ve kapasitör kombinasyonundan oluşur. Çift katmanlı kapasitans (C), Helmholtz modeli yardımıyla boş alan geçirgenliğinin (ϵ_0), bağlı çözelti geçirgenliğinin (ϵ_r), Helmholtz katmanı mesafesinin (d) ve elektrot yüzey alanının (A) bir fonksiyonu olarak tanımlanır (Eş. 2.3) [37].

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d} A \quad (2.3)$$



Şekil 2.7. Faradaik olmayan (a) ve Faradaik (b) impedimetrik biyosensörlerin şematik gösterimi

Hem faradayik hem de faradayik olmayan EIS, çeşitli uygulamalar için elektrokimyasal sensörlerde dönüştürücü teknikler olarak birtakım avantajlar sunmaktadır. Faradayik modda, yük transfer direnci, ilgilenilen bir analitin konsantrasyonu ile ilişkili impedans bileşenidir ve elektroaktif türler arasındaki indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarından üretilen akımın bir sonucudur. Kapasitans ise faradayik olmayan EIS'de belirli bir analitin tanınmasını yorumlamak için genellikle en önemli dönüştürücü terimidir. Daha az duyarlı olmasına rağmen, Faradayik olmayan sensör, redoks çiftlerinin varlığını gerektirmediğinden gerçek zamanlı uygulamalar için umut verici bir adaydır. Öte yandan, redoks reaksiyonlarından üretilen akım sayesinde faradayik sensörlerde, faradayik olmayan cihazlara kıyasla daha yüksek hassasiyet elde edilebilmektedir [36].

Litertürde impedans tabanlı tayinlere değinilecek olursa, Xi ve arkadaşları 2011 yılında lektin-bakteri etkileşimine dayalı, etiketsiz bir elektrokimyasal impedimetrik biyosensör geliştirmiştir. *S. Cerevisiae*'nın hücre yüzeyi üzerindeki glikozil kompleksleri yakalanmıştır ve elektrot yüzeyinde reaksiyon çözeltisi varlığında (mannoz çözeltisi), artan derişimler iöüçin R_{CT} artmıştır [38].

Elshafey ve ekibi, beyin plazmasındaki kanser belirteçlerinden biri olan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) tayini için elektrokimyasal impedans immünosensör geliştirmiştir. Anti-EGFR antikorları, antijenik olmayan Fc bölgeleri aracılığıyla protein G ile modifiye edilmiş elektroda bağlanmıştır [39].

Li ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu çalışmada elektrokimyasal impedans spektroskopisi, harici (tetraspanin) ve dahili (syntenin) eksozom spesifik belirteçlerinin miktarını belirlemek için uygulanmıştır. Faradayik olarak gerçekleşen bu çalışmada reseptör ara yüzeyinde sırası ile altın elektrot, polietilenglikol (PEG) ve Anti-CD63 kullanılmıştır. Bu çalışma için tayin sınırı (LOD) $1,9 \times 10^5$ partikül mL^{-1} olarak elde edilmiştir [40].

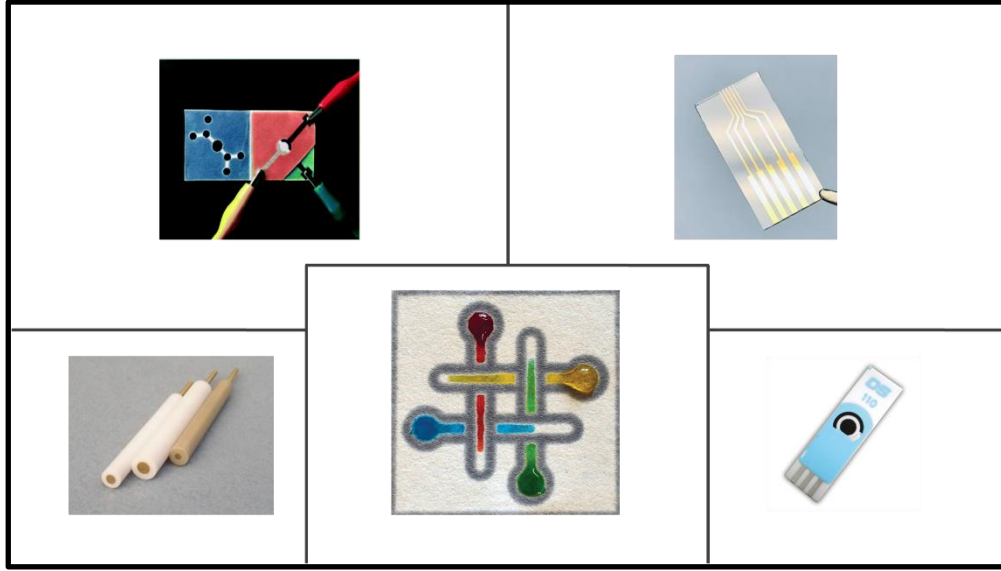
Kılıç ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada ise, ticari olarak satın alınan tek kullanımlık ekran baskılı elektrotlar ile etiketsiz, düşük maliyetli biyosensör, CoCl_2 kaynaklı hipoksiyle tetiklenen gelişmiş EV salgısının saptanması için kullanılmıştır. LOD değeri, 77 Evs mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. Ayrıca geliştirilen impedimetrik esaslı biyosensör, Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) ve nanopartikül izleme analizi (NTA) ile karşılaştırılmıştır ve diğer iki tekniğe kıyasla daha yüksek hassasiyet ve daha düşük tayin sınırına sahip olduğu görülmüştür [41].

Köklü ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, analitin immobilize reseptörlerin algılama bölgesine doğru taşınmasını hızlandırmak için AC impedans spektroskopisi ile elektrotermal akış tabanlı bir biyosensör tasarlanmıştır. Hedef molekül seviyesi, analitin reseptörlere spesifik bağlanması nedeniyle impedans değişikliği izlenerek eşzamanlı olarak ölçülmüştür [42].

2.1.3. Biyosensörlerde kullanılan elektrot materyalleri

Elektrot, elektron aktarımı yapan bir arayüz görevi yanında biyosensörlerde biyomoleküllerin immobilizasyonu için katı bir destek olarak kullanılan önemli bir bileşendir. Elektrotlar, birden fazla malzeme ve çeşitli üretim süreçleri kullanılarak üretilir. Elektrot, elektronların ve boşlukların (hole) hareketiyle yükün taşındığı elektronik bir iletken [24]. Biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan elektrotlar, altın (Au) gibi metaller ve karbon gibi ametaller dahil olmak üzere iletken ve yarı iletken malzemelerden üretilmektedir (Şekil 2.8). Elektrotların türü, üretim yaklaşımı ve tasarımı, duyarlılık, seçicilik, algılama limiti (LOD) ve dinamik aralık dahil olmak üzere biyosensörün performansını belirleyen özellikleri etkiler. Ayrıca biyosensörün maliyetini, üretilebilirliğini, atılabilirliğini ve ölçüm yeteneklerinin üzerinde de etkisi bulunmaktadır. Elektrot türü aynı zamanda, elektron transfer hızı, elektroaktif kütledeki kütle transfer hızı

ve elektrodun algılama katmanında meydana gelen reaksiyon hızını ve reaksiyonun sinyale dönüştürülme kalitesini etkilemektedir. Elektrot türlerinin üstünlükleri ve dezavantajları Çizelge 2.2.'de belirtilmiştir.



Şekil 2.8. Biyosensörlerde kullanılan farklı elektrot malzemeleri

Metal elektrotlar

Au ve Pt gibi metal elektrotlar, genellikle kesme işlemleri yoluyla üretilmektedir. İnce film metal elektrotlar ise, genellikle, fiziksel buhar biriktirme [43] ve serigrafi [44] dahil olmak üzere geleneksel mikrofabrikasyon yaklaşımları yoluyla yalıtkan substratlar üzerinde metallerin biriktirilmesiyle üretilir. Altın, bir elektrot olarak oldukça kullanışlı ve uygun bir metaldir. Biyolojik materyalin bir çoğu (DNA, antikor, antijen vs.) biyolojik aktiviteleri korunarak altın yüzeyde hareketsiz hale getirilebilmektedir. İlaveten altın, redoks merkezi ve yüzeydeki modifiye gruplar arasındaki elektron transferini kolaylaştırmaktadır. Altının parçacık boyutuna bağlı olarak biçimsel özellikleri arasındaki farkları anlamak oldukça önemlidir ve altının tercih edilen özellikleri genellikle nanoparçacık formuna geçmesiyle ortaya çıkmaktadır [45].

Altın yüzeylere, verimi yüksek bir reaksiyon ile uzun zincirli organik bileşiklerin bağlanması, modifiye elektrotlar oluşturma seçeneklerinden biridir. Bu tür modifiye elektrotlar iki genel yöntem ile elde edilmektedir. İlk yöntem, altın bir yüzey üzerinde tiyol (-SH) gruplarının immobilizasyonu ve ardından tiyollerin tek tabakası üzerinde spesifik

reseptörün (DNA ve RNA) tutulmasıdır. İkinci yöntem ise, fonksiyonel tiyol gruplarının reseptör olarak hareket ettiği altın bir yüzey üzerinde doğrudan bağlanmasıdır [46].

Çizelge 2.2. Biyosensörlerde kullanılan bazı malzemeler ve özellikleri

Malzeme Türü	Avantaj	Sınırlamalar	Referans
Grafen	• Yüksek yüzey/hacim (S/V) oranı • Hızlı elektron transferi • Yüksek ısı iletkenliği • Mekanik esneklik • Biyouyumluluk	• Düşük suda çözünürlük	[47, 48]
Metalik nanopartiküller	• Kolay elektron transferi • S/V'de artış • Üstün iletkenlik • Biyouyumluluk • Kolay işlevselleştirme	• Yüksek tuz konsantrasyonunda elektriksel kararsızlık • Sinyal amplifikasyonunda tutarsızlık	[49, 50]
ITO (İndiyum Kalay Oksit)	• Düşük maliyet / Yüksek geçirgenlik • İyi elektriksel iletkenlik • Yüzey modifikasyon kolaylığı	• Yüzeyin antikorlarla kaplanması üzerine elektron transferinin yavaş kinetiği	[51, 52]
Organik Polimer	• Yüksek verim • Düşük maliyet • İyi esneklik, işlevsellik, çözünürlük ve özgüllük	• İnce film morfolojisinin tekrarlanabilirliği ihtiyacı • Yüksek çalışma voltajları • Malzeme stabilitesindeki belirsizlikler	[53, 54]

Polimer elektrotlar

Polimerlerin ayarlanabilir elektriksel iletkenlik, biyouyumluluk ve çevresel kararlılık gibi çeşitli avantajları vardır. Polimer elektrotlar ayrıca bir dizi biyolojik tanıma elemanının immobilizasyon tekniği ile de uyumludur [55]. Polimerler ayrıca, implante edilebilir ve giyilebilir biyosensörlerin tasarımında önemli bir husus olan elektrot-doku mekanik eşleşmesini sağlayan mekanik özellikler sergiler. Polimer elektrotlar genel olarak konjuge polimer ve polimer kompozit olarak sınıflandırılabilir.

Karbon Temelli Elektrotlar

Karbon, elektrokimyasal özellikleri nedeni ile biyosensör uygulamalarında yer alan bir malzemedir. Karbon pasta, camı karbon, karbon fiber olmak üzere farklı türlerde kullanımı mevcuttur. Bu türevler, düşük maliyetli olmaları nedeniyle, pahalı metal elektrotlara alternatif olmuşlardır. Karbon pasta, genellikle grafit tozu ve camı bir görünüm sağlayan organik bir bağlayıcının karışımından oluşur. Karbon pasta ile hazırlanan elektrotlar, katı grafit veya metal elektrotlara kıyasla geniş çalışma potansiyeli, uygun modifikasyon, yenilenebilirlik, minyatürleştirme, pasta hazırlama sırasında farklı maddeleri katma gibi avantajlar sağlamaktadır [56].

Serigrafi baskılı elektrotlar

Elektrokimyasal sensörlerin analitik performansı temel olarak elektron taşınması, yüzey-hacim oranı, potansiyel aralıkları, arka plan akımı ve kararlılık (kimyasal ve elektrokimyasal) ile ilgilidir. Ekran baskılı elektrotlar (SPE), endüstriyel yazıcılar kullanılarak düz bir alt tabaka üzerine katmanların bir kombinasyonunun döşenmesiyle üretilir ve geleneksel elektrotlara kıyasla düşük maliyetleri, atılabilirlikleri ve tasarım esnekliği nedeniyle ilgi çekerler [40, 57]. Elektrokimyasal sensörler minyatürize edildiklerinde ortaya çıkan en temel avantaj gereken numune hacminin birkaç mikrolitreye kadar düşürülmesidir; bu da cihazın entegre edileceği teşhis sisteminin genel boyutunun küçültülmesine yardımcı olmaktadır. SPE'lerin çalışma elektrotunda kullanılan nanomalzemeler (karbon nanotüpler [58], grafen [59], altın nanoparçacıklar [60], vb.), çok daha yüksek spesifik yüzey alanları ve üstün özellikleri nedeniyle yüzey aktivitesini önemli ölçüde iyileştirebilmektedir.

SPE'lerin bir diğer önemli üstün özelliği ise yüzeylerinin, farklı analitlerle birçok amaca uyacak şekilde kolayca değiştirilebilmesidir. Bu çok yönlülük ile minyatür boyutu ve taşınabilir enstrümantasyona bağlama olasılığı, hedef analitlerin yerinde son derece spesifik belirlenmesini mümkün kılar. İlaveten, SPE'ler, bellek etkileri ve temizleme prosedürleri gibi klasik katı elektrotların yaygın sorunlarından bazılarını bertaraf eder.

Boriachek ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu çalışmada, altın yüklü ferrik oksit nanoküplerle izole edilen eksozomlar, antikor modifiyeli ekran baskılı elektrot ile

belirlenip, saptama sınırı 10^3 eksozom mL^{-1} olarak tayin edilebilmiştir [61]. Bir başka çalışmada ise eksozomal mikroRNA'nın (miR-338-3p) elektrokimyasal tespiti için enzimatik amplifikasyon içermeyen bir yaklaşım rapor edilmiştir. Elektrokatalitik sinyal, AuNP-Fe₂O₃NC ile modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrotta kronokoulometri kullanılarak izlenmiş ve algılama sınırı 100 aM kadar düşük miR-338-3p olarak belirtilmiştir [62]. Ekran baskılı elektrotların bazı biyosensör uygulamaları Çizelge 2.3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Ekran baskılı elektrotlara dayalı biyosensörler üzerine mevcut araştırmalara genel bakış

SPE türü	Analit	Metod	Referans
Elektrosprey biriktirilmiş lakazlı serigrafi elektrotlar	Katekol	Amperometrik	[63]
Altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrotlar	Tau proteini	CV	[64]
Kobalt oksit nanopartiküller ile kaplanmış ekran baskılı elektrotlar	Kokain	CV ve DPV	[65]
Antikor modifiye ekran baskılı elektrotlar	<i>Listeria Monocytogenes</i> p60 protein	CV	[66]
Grafen oksit ekran baskılı elektrotlar	120 baz çifti bulunan DNA fragmanı	İmpidimetrik	[67]

Kâğıt tabanlı elektrotlar

20. yüzyılın başlarında kâğıt kromatografisinin keşfinin ardından, kâğıt tabanlı teşhis cihazları ortaya çıkmaya başlamıştır [68]. 1956'da ilk kez idrardaki glukozun kalitatif tespiti için kâğıt tabanlı cihaz geliştirilmiş ve bu cihaz, hamilelik test kitinin iyi bilinen bir örneği haline getirilmiştir [69]. Son on yılda ise kâğıt, esnek, taşınabilir, tek kullanımlık, kolay entegre edilebilen, kolay erişilebilirlik, uyumluluk ve düşük maliyet gibi özellikleri nedeniyle analitik ve klinik biyokimyada biyosensörlerin üretimi için potansiyel bir malzeme olarak kullanılmıştır. 2007 yılında, kâğıt tabanlı sensörün ilk nicel uygulaması,

Whitesides ve arkadaşları tarafından tanıtılmıştır. Whitesides ve arkadaşları, multipleks analit tespiti için mikroakışkan kâğıt tabanlı analitik cihazlar (μ PAD'ler) adı verilen kâğıt üzerinde mikroakışkan kanalları üretme fikrini ortaya atmışlardır [70]. Bu yöntem, farklı yöntemlerin geliştirilmesine de yol açmıştır. Kâğıt tabanlı elektrokimyasal sensörler (PES) ise ilk olarak 2009 yılında Dungchai ve çalışma arkadaşları tarafından sunulmuştur [71].

Kâğıt, kâğıt hamuru işlenmesine bağlı olarak ince, hafif ve esnek olarak üretilen ve en bol bulunan malzemelerden biridir. Ayrıca baskı, yazı, çizim ve paketleme için oldukça uygun bir malzemedir. Kimyasal olarak selüloz lifi, kâğıdın ana bileşenidir ve sıvının aktif bir pompaya veya harici kaynağa ihtiyaç duymadan hidrofilik lif matrisine nüfuz etmesine izin verir [72]. Kâğıt substratın oldukça arzu edilen hidrofilik karakteristik yapısını tam olarak kullanmak ve kâğıt tabanlı sistemlerin analizlerdeki genel uygulanabilirliğini geliştirmek için kâğıt malzeme seçimi önemlidir.

Kâğıt hamuru

Kâğıt hamuru, selüloz liflerini ağaçtan, lif mahsullerinden veya atık kağıttan kimyasal veya mekanik olarak ayırarak hazırlanan lignoselülozik lifli bir malzemedir. Nitroselüloz (NC) hazırlamak için nitrik asitle muamele yoluyla nitroselüloz üretmek için kullanılacak bir tür hammaddedir. Kâğıt hamuru, %80 ~ %87 arısında α -selüloz içerir [73]. Bununla birlikte, ahşap selülozuna kıyasla NC'nin üretim verimi ve viskozitesi düşüktür.

Pamuk linter

Odun selülozuna benzer şekilde, bir başka yenilenebilir yeşil kaynak olan pamuk, her türlü giysi, mobilya kumaşı ve endüstriyel kumaş için hazırlanabilir. %94,5 α -selüloz içerir. Odun selülozundan elde edilen NC'nin özellikleri ile karşılaştırıldığında, %10,7 ~ %12,2 N içeriğine sahiptir ve pamuk selülozdan elde edilen NC'nin üretim verimi ve viskozitesi daha yüksektir [74].

Mikrokristal selüloz

Geleneksel olarak mikrokristal selüloz (MCC) esas olarak ürünler için odun hamurundan ve pamuk linterlerinden hazırlanmaktadır; ancak ticari maliyeti yüksektir. NC hazırlamaya

gelince, yenilenebilirliği, biyolojik olarak bozunabilirliği ve yüksek özel yüzey alanı nedeniyle asit hidroliz yöntemi kullanılarak MCC hazırlamak için Alfa otu (ahşap olmayan lifler) kullanılmıştır. MCC, %93 α -selüloz ve %7 selüloz olmayan bileşen içerir. Mikrokristal NC, %12,5 N içeriğine, düşük viskoziteye, iyi termal kararlılığa, kompakt yapıya ve pürüzlü bir yüzeye sahiptir [75].

Miscanthus selüloz

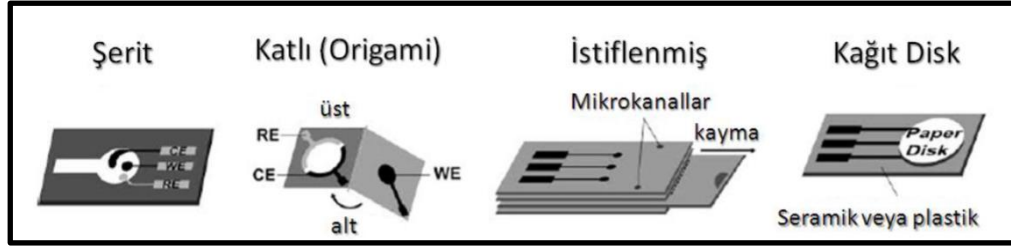
Selüloz hazırlamak için ahşap ve pamuğun yanı sıra, yenilenebilir ham maddelerden elde edilen çevre dostu veya “yeşil” polimerler sıklıkla kullanılır. Miscanthus, çok yıllık, odun dışı rizomatöz bir çim türü olarak, Miscanthus selülozunu nitrik asit prosesi ile hazırlamak için kullanılabilir; zira bu tür kolay büyür ve yüksek biyokütle verimi sunar [76]. Miscanthus selüloz %95,4 α -selüloz içerir. Ticari Miscanthus selüloz nitratlama yöntemiyle NC hazırlamak için kullanılır ve daha sonra farklı uygulamalar için alkol esterinde çözülür. Miscanthus NC, %11,85 N içeriğine (düşük nitrojen NC) ve alkol ester karışımında yüksek çözünürlüğe sahiptir.

Bakteriyel selüloz

Bakteriyel selüloz (BC), Gram negatif bakteri *Acetobacter xylinum* gibi bazı mikroorganizmalardan fermantasyon yöntemi kullanılarak elde edilir [77]. Yüksek stabilite, düşük toksisite özelliklerine sahiptir ve %99,4 α -selüloz içerir; bu da malzemeyi NC hazırlamak için uygun yapar. Bakteriyel selülozun nitratlanması için BC tozu, farklı sülfürik asit oranlarına sahip nitratlama çözeltileri ile karıştırılır. Bakteriyel selülozun (NBC) nitrasyonundan sonra, %10,86 ~ %12,1 N içeriği ve yüksek stabilite özelliği gösterir [78].

Kâğıt tabanlı sistemler kullanılarak yapılan analizlerin çoğunda Whatman No 1 filtre kâğıdı kullanıldığı anlaşılmaktadır [79, 80]. Whatman kâğıdındaki lifler yüksek alfa selüloz içerdiğinden yüksek tekrarlanabilirlik özelliğine sahiptir. İlâveten, bu tip kâğıtların yüksek su emiciliği ve biyo-uyumlu olması biyosensörlerin tasarımı için oldukça uygundur.

Kâğıt tabanlı elektrotlar esnek olmalarından ötürü çeşitli konfügrasyonlarda tasarlanabilmektedir (Şekil 2.9) [81]. Bu nedenle istenilen özel bir uygulamaya göre tasarlanmaları mümkündür. Kâğıt malzeme elektrokimyasal hücreyi (çalışma, referans ve karşıt) oluşturan tüm elektrotlar için bir destek alt-tabakası olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.9. Elektrokimyasal biyosensörlerde kâğıt elektrodun çeşitli kullanım şekilleri (RE-Referans Elektrot, WE-Çalışma Elektrodu, CE-Karşıt Elektrot) [86]

Kimyasal maddelerin (redoks mediatörleri, nanoyapılı tanecikler) veya biyolojik moleküllerin (Proteinler, DNA) elektrot yüzeyindeki immobilizasyonu biyosensör tasarım sürecinin en önemli aşamalarından biridir. Kâğıt yüzeyindeki immobilizasyon, genellikle istenen bileşikleri içeren bir çözeltinin damlatılmasıyla ve ardından çözücüsünün buharlaştırılması ile gerçekleştirilmektedir.

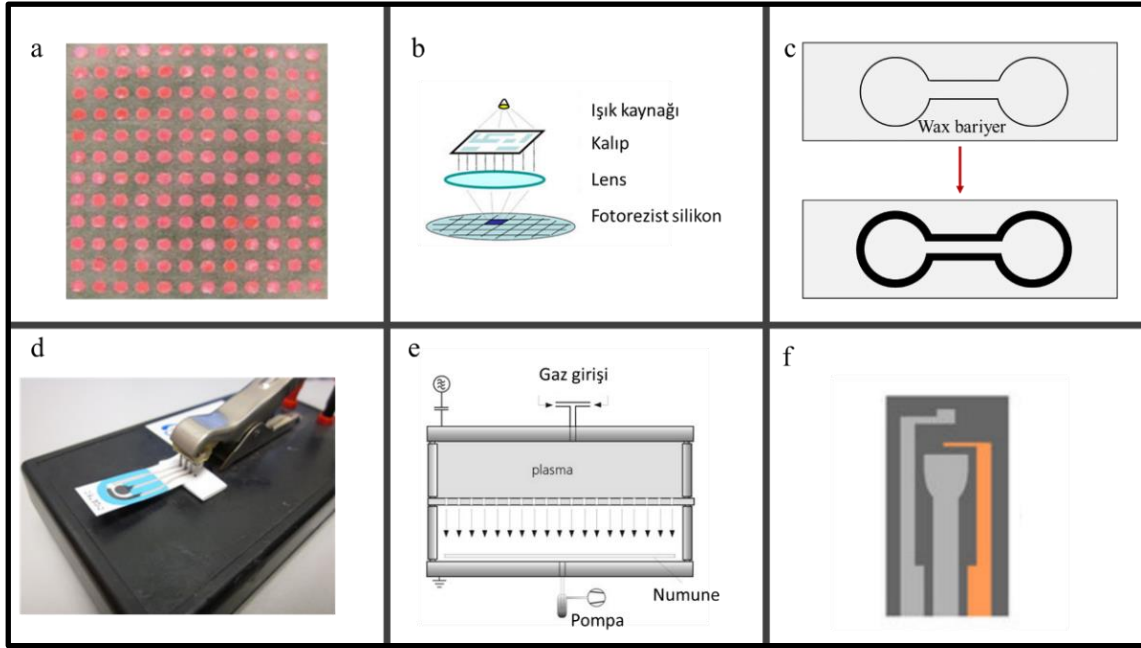
Kâğıt malzeme ve elektrokimyasal algılamayı birleştiren kâğıt tabanlı analitik cihazlar, farklı türlerdeki biyolojik materyallerin tespiti için kullanılmaktadır [82–86]. Kâğıt tabanlı elektrot kullanılarak tasarlanan çeşitli biyosensör sistemleri Çizelge 2.4’te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. Kâğıt tabanlı elektrot kullanılarak tasarlanan çeşitli biyosensörler

Analit	Yöntem	LOD	Referans
Ketamine	CV	0,01 nM/mL	[87]
AChE	CV	0,1 U/mL	[88]
AFP,CA CEA	125, Kemilüminesans	AFP: 25 ng mL ⁻¹ CA 125: 35 ng/mL ⁻¹ CEA: 5 ng/mL ⁻¹	[89]
EpCAM ve GCP3 pozitif hücreler	Elektrokimyasal ve Floresans	10 hücre mL ⁻¹	[90]
Cu (II)	Kolorimetri	7,5 nM	[91]
Tartrazin	SERS	0,1138 µg mL ⁻¹	[92]
Serotonin	Elektrokimyasal, DPV	0,38 µM	[93]
CA199	Elektrokemilümine -sans	0,0055 U/mL	[94]
CEA	Elektrokemilümine -sans	0,12 pg/mL	[95]
PSA	İmpidimetrik	1,18 ng/mL	[96]

Kâğıt, üzerinde bulunan selüloz grupları nedeniyle hidrofiliktir. Hidrofobik bariyerlere sahip PAD'ler, genellikle, hedef analitlerin elektrokimyasal tespiti için numune hacmine ve elektrot boyutuna bağlı olarak karar verilen ve istenen bir yerde sıvı akışını sınırlamak için oluşturulur. PAD'lerin ve elektrotların hidroforbik bariyerlerinin üretimi için bir dizi teknik geliştirilmiş ve rapor edilmiştir (Şekil 2.10). Bu yöntemler aşağıda belirtilmiştir:

- Lazer ile muamele (laser treating)
- Fotolitografi,
- Bal mumu baskı (wax-printing)
- Elek Baskı (screen-printing)
- Plazma ile muamele (plasma treating)
- Flekso Baskı (flexography)



Şekil 2.10. Kâğıt elektrot yüzeyinde bariyer oluşumu için kullanılan teknikler: (a) lazer ile muamele, (b) fotolitografi, (c) bal mumu baskı, (d) elek baskı, (e) plazma ile muamele, (f) flekso baskı

Lazer ile muamele

Lazer ile muamele yöntemi, 2011 yılında Chitnis ve ark. tarafından kullanıldı [97]. Parşömen kâğıdının yüzeyini işlemek ve yüzeyin ıslanabilirliğini değiştirmek için bir CO₂ lazer kesim/oyma makinesi kullanıldı. Huang ve arkadaşları kâğıt alt tabakalar üzerinde yüksek kaliteli çok katmanlı devreler oluşturmak için değiştirilmiş bir lazer baskı işlemi önerdi [98]. Bu çalışmada, solvent içermeyen bir transfer yöntemiyle desenli gümüş nanotel mürekkebi kullanıldı. Önce, bir poliimid film oluşturmak için kâğıda ısı silindiri uygulandı. Daha sonra, desenli devreler, toneri, karbon siyahı veya renklendirici bileşiklerle karıştırılmış tozları içeren bir lazer baskı makinesi kullanılarak kâğıda basıldı. İşlemin yüksek verim ile gerçekleşmesi ve solventsiz olma özelliği, bu modifiye lazer baskı tekniğinin avantajlarıdır. Mürekkep püskürtmeli baskının aksine kâğıdın ıslatılmasına gerek duyulmamaktadır; bu durum elektronik devrelerin çözünürlüğünü ve performansını artırmaktadır. Gümüş bazlı mürekkepler iyi iletkenlik ve basılabilirlik performansına sahip olsalar da maliyetleri yüksektir ve sınırlı raf ömrüne sahiptirler. Ayrıca, bu yöntemdeki üretim süreci oldukça karmaşıktır.

Fotolitografi

Fotolitografi, μ PAD'lerin üretimi için kullanılan ilk modelleme yöntemidir [99] ve kâğıt üzerinde belirgin hidrofilik ve hidrofobik alanların oluşmasını sağlayan yüksek hassasiyetli bir yöntemdir. Fotolitografi, geometrik bir yapının, fotomaskeden kâğıda emprenye edilmiş ışığa duyarlı bir fotorezistöre aktarılmasına dayanır. Asano ve Shiraishi, bir fotomaske kullanmadan kâğıt üzerinde hidrofilik ve hidrofobik bölgelerin modellenmesi için bir 3D yazıcı kullanarak hızlı ve ucuz bir üretim yaklaşımı ortaya koymuştur [100]. Bu yöntemde kromatografi kâğıdı istenilen boyutlarda kesilerek oktadesiltri-klorosilan n-heksan çözeltisine 5 dakika daldırılmış, daha sonra, modifiye edilmiş kâğıt, hidrofilik bölgeler fotomaske ile UV ışığına maruz bırakılmıştır. Fotolitografi yöntemi, atılabilirlik, maliyet etkinliği, basitlik ve pahalı üretim araçlarının olmaması gibi özellikleri nedeniyle birçok avantaj sunmaktadır.

Bal mumu baskı

Bal mumu bazlı üretim teknikleri (wax-printing), toksik olmayan reaktifler kullanılarak seçici hidrofobikliğe dayanan düşük maliyetli yöntemlerdir. Günümüzde kullanılan bal mumu baskı yöntemi ilk olarak Lu ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [101]. Literatürde şu anda kullanılan en yaygın baskı yöntemidir [86, 102, 103]. Bu yöntem baskı ve ısıtmayı içeren iki aşama içermesine rağmen seri üretim için uygundur. Bu yöntemde uzun süreli kullanımlarda mumun erimesi ve oluşturulan bariyerlerin genişlemesi gibi dikkat edilmesi gereken bazı durumlar mevcuttur.

Elek baskı (Screen-printing)

Serigrafi, şablonlu bir tasarımın bir örgü elek, mürekkep ve bir silecek kullanarak düz bir yüzeye aktarılması işlemidir. Kumaş ve kâğıt en çok ekran baskılı yüzeylerdir ancak özel mürekkeplerle ahşap, metal, plastik ve hatta cam üzerine baskı yapmak da mümkündür. Temel yöntem, ince bir örgü ekranda bir şablon oluşturmayı ve ardından alttaki yüzeyde tasarımın bir izini oluşturmak için mürekkebi (veya resim ve posterlerde boya) itmeyi içerir. Bu sürece bazen serigrafi veya serigrafik baskı denir ve gerçek baskı işlemine oldukça benzer olsa da şablonun oluşturulma şekli, kullanılan malzemelere bağlı olarak değişebilir.

Serigrafi teknolojisi ile milimetre aralığında bir çapa sahip elektrotlar üretilebilmektedir. Bu yazdırma yöntemi hızlı, basit, ucuz ve son derece özelleştirilebilir bir niteliğe sahiptir. Elektrot katmanı, standart bir serigrafi tekniği kullanılarak yazdırılır ve çalışma, karşıt ve bir Ag/AgCl referans elektrotundan oluşur.

Plazma ile muamele

Plazma uygulaması, kâğıt yüzeyindeki kanalların modellenmesi için alternatif bir yöntemdir. Hidrofilik kanallar, filtre kâğıdının alkil keten dimer ile hidrofobik hale getirilmesi ve hidrofobik bariyerler oluşturmak için kürlenmesiyle oluşturulur. Kâğıt numuneler, desenli metal maskeler arasına yerleştirilip, ardından plazma ile işlenir. Plazma işlemi fotolitografi yöntemi ile kıyaslandığında daha az adıma sahiptir. Bu yöntemde bariyer oluşturmak için pahalı plazma oksitleyicilerin ve bir maskenin gerekli olması bir dezavantajdır. Ayrıca seri üretime uygun değildir ve organik çözücülerle birlikte kullanılamaz.

Flekso baskı (flexography)

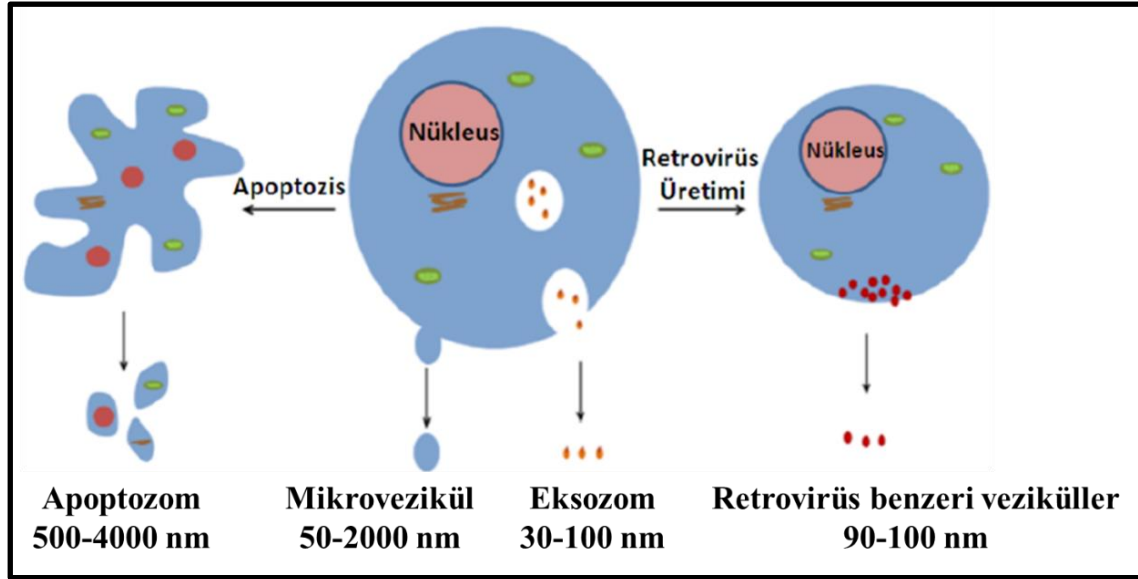
Olkkonen ve arkadaşları 2010 yılında fleksografik olarak baskılanmış μ PAD'lerin ilk örneğini yayınladı. Baskı mürekkebi olarak kullanılan toluen veya ksilen içindeki polistiren, hidrofobik bariyerler oluşturmak için bir aniloks rulosuna uygulandı [104]. Flekso baskıda kullanılan mürekkeplerin viskozitesi, serigrafi mürekkebinin viskozitesinden daha düşüktür. Plaka ve baskı silindiri, mürekkebin kâğıda nüfuz etmesi ve hidrofobik ve hidrofilik kanalların modellenmesi için döndürülmüştür. Fleksografik baskının avantajları, polistirenin ısı işlem gerektirmemesi ve biyouyumlu olmasıdır. Diğer avantajı, reaktiflerin tek bir rulodan kâğıda aktarılabilmesidir. Ancak fleksografi tekniği ile fotolitografi tekniğine kıyasla daha düşük çözünürlüklü hidrofilik kanallar elde edilir. Bu tekniğe ilişkin geliştirmeler halen devam etmektedir ve daha fazla optimizasyon çalışmasına ihtiyaç vardır. Çizelge 2.5.'te son zamanlarda yaygın olarak kullanılan PAD türleri ve elektrot üretim teknikleri belirtilmiştir.

Çizelge 2.5. Farklı hidrofobik bariyer oluşturma teknikleri ile geliştirilen biyosensörler

Üretim Tekniği	Analit Türü	Kâğıt Alt Tabakası	Metod	Referans
Fotolitografi	Glukoz, laktat ve ürik asit	Filtre Kağıdı	CV, Kronoamperometri	[71]
Mum Baskılama	CEA ve CA125	Whatman Kromatografi Kağıdı no 1	DPV	[105]
Mum Baskılama	Staphylococcus aureus bakterisi	Whatman Kromatografi Kağıdı	DPV	[106]
Mum Baskılama	Pb ve Cd	Whatman Kromatografi Kağıdı no 1	SWV	[107]
Lazer Kesim	Akyuvar	PVDF filtre membran	CV ve DPV	[108]
Lazer Kesim	Dopamin	Whatman Kromatografi Kağıdı no 1	CV ve DPV	[109]

2.2. Eksozomlar

Ekstraselüler veziküllerin (EV) sınıflandırılması sürekli gelişmekle birlikte, genellikle apoptozomlar, mikroveziküller, eksozomlar ve retrovirüs benzeri veziküller olmak üzere dört ana kategoriye ayrılırlar (Şekil 2.11) [110]. Eksozomlar endozomal kökenlidir ve 40 ila 160 nm çapında (ortalama ~100 nm) bir boyut aralığındadır [111].



Şekil 2.11. Ekstrasellüler veziküllerin biyolojik olarak bilinen dört farklı tipi:
a) Apoptozomlar b) Mikroveziküller c) Eksozomlar d) Retrovirüs benzeri veziküller [112]

İlk araştırmalar, eksozomların sadece hücreden atık uzaklaştırmada görev aldıkları yönündeydi. Fakat sonrasında yapılan çalışmalarda, eksozomların, kargo içeriklerinin sadece atık moleküllerden oluşmadığı, aksine hücreler arası haberleşme, sinyal iletimleri gibi önemli rollerde kullanılmak üzere, nükleik asitler, proteinler, miRNA, mRNA, nükleoproteinler ve çeşitli enzimler taşıdıkları ortaya çıkarıldı [113].

Eksozomlar, endozomal membranların içe doğru tomurcuklanmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar ve plazma zarı ile hücre dışı ortama salınır [114]. Eksozomal membranlar, GM1 gangliosidleri, transferrin reseptörleri, kolesterol, seramid ve sfingomyelin gibi lipid türevleri açısından zengindir [115, 116]. Ayrıca Tsg101, Alix ve tetraspaninler (CD9, CD63 ve CD81) gibi endozoma özgü birçok protein içerirler ve bunlar genellikle onları diğer EV popülasyonlarından ayırt etmek için kullanılır. Eksozomların protein içerikleri Çizelge 2.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.6. Eksozomların protein bileşenleri [121]

Protein Kategorisi	Bileşenler
Tetraspanins	CD9, CD63, CD81, CD82, CD37, CD53
Isı şok proteinleri (HSP)	HSP90, HSP70, HSP27, HSP60
Hücre adezyonu	Integrins, Lactadherin, Intercellular Adhesion Molecule 1
Antijen sunumu	İnsan lökosit antijeni sınıf I ve II/peptit kompleksleri
Multiveziküler vücut Biyogenezi	Tsg101, Alix, Vps, Rab proteinleri
Zar taşınımı	Lizozomla ilişkili zar proteini 1/2, CD13, PG düzenleyici benzeri protein
Sinyal proteinleri	GTPase HRas, Ras ile ilgili protein, furloss, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz, Src homoloji 2 alan fosfataz, GDP ayrışma inhibitörü, Syntenin-1, 14-3-3 Proteinler, Dönüştürücü protein RhoA
Hücre iskeleti bileşenleri	Actins, Cofilin-1, Moesin, Myosin, Tubulins, Erzin, Radixin, Vimentin
Transkripsiyon ve protein sentezi	Histon 1, 2, 3, Ribozomal proteinler, Ubiquitin, majör kasa proteini, Kompleman faktör 3
Metabolik Enzimler	Yağ asidi sentazı Gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz Fosfoglisarat kinaz 1 Fosfoglisarat mutaz 1 Piruvat kinaz izozimleri M1/M2 ATP sitrat liyaz ATPaz
Anti Apoptoz	Alix, Tioredoksin, Peroksidaz
Büyüme faktörleri ve sitokin	Tümör Nekroz Faktörü (TNF)- α , TNF Reseptörleri, Dönüştürücü büyüme faktörü- β
Ölüm reseptörleri	FasL, TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
Demir taşıma	Transferrin reseptörü

2.2.1. Eksozom biyogenezi

Eksozom biyogenezinde, ilk olarak, ana hücre zarı içe doğru katlanır ve ortaya çıkan girinti ile erken bir endozom oluşur [117]. Oluşan erken endozom içe doğru tomurcuklanır ve girintiler yapar. Daha sonra geç endozoma dönüşerek birçok intraluminal vezikül oluşturur. Bu aşamada oluşan yapılara ‘multiveziküler cisimler’ denir. Ortaya çıkan bu cisimler iki farklı yol izleyebilir: (i) lizozomla birleşmenin sonucu olarak parçalanırlar veya (ii) plazma zarı ile kaynaşırlar ve hücreden eksozomlar halinde salınırlar [118, 119].

2.2.2. Eksozomların görevleri

Başlangıçta, eksozomların, gereksiz hücre moleküllerinin uzaklaştırılmasından sorumlu veziküller olduğu düşünülmekteydi [120]. Ancak çalışmalar, eksozomların bu fonksiyonlarına ek olarak, hücreler arası iletişim ve homeostazın sağlanmasında önemli görevlere sahip olduğunu göstermektedir [121]. Hücre dışı veziküller biyolojik süreçlerdeki temel rolleri nedeniyle hastalık patogeneğinde önemli rol oynamaktadır [122]. Ek olarak, eksozomlar bağışıklık sistemi içindeki iletişimde yer alır ve hem bağışıklık uyarıcı hem de engelleyici etkilerle modülasyona aracılık etmektedir [123].

Eksozomlar, nükleik asitlerin (DNA, mRNA, miRNA) [124], proteinlerin ve lipidlerin kargo konteyneri çekirdekleri [125] aracılığıyla taşıma işlemlerini gerçekleştirerek hücreden hücreye iletişimde kritik bir rol oynarlar. Ayrıca, eksozomların alım yolları veya eksozom özgüllüğü, iletişimin farklı şekilde ilerlemesine neden olur. Örneğin, mutant KRAS ekspresyonu tarafından indüklenen onkogenik sinyaller, makropinositoz yöntemi ile insan pankreas kanseri hücrelerinde eksozom alımına yol açar [126]. Hücreler arası iletişim ise üreme, gebelik ve embriyonik gelişim süreçlerinde daha hassas ilerler. Eksozomlar ayrıca hem enfeksiyonun önlenmesinde [127] hem de bağışıklık tepkinin düzenlenmesinde [128] görev alır. Örneğin anne sütündeki miRNA içeren bağışıklık fonksiyonları ile eksozomların sağlıklı doğum sonrası büyümeyi desteklemesi arasında bir ilişki bulunmaktadır [129]. Normal ve patolojik hücrelerde hücreler arası iletişim sürecini incelemeye yönelik çalışmalar eksozomlara olan ilgiyi büyük ölçüde arttırmıştır. Bunun en önemli nedeni, kanser hücrelerinin oluşturduğu faktörlerin eksozomlar tarafından salınmasıdır [130] çünkü eksozomlar neoplazi, tümör büyümesi ve metastazi, paraneoplastik sendromlar ve tedaviye direnç üzerinde etkilidir. Ayrıca kanser hastalarının

(prostat, akciğer, mide gibi) kan örneklerinde sağlıklı bireylere göre eksozom düzeyi oldukça yüksektir [131, 132].

2.2.3. Eksozomların kanserdeki rolü

Eksozomların içeriği, köken aldıkları hücrelerin durumuna (sağlıklı veya kanserli) bağlı olarak, bu nano veziküllerin hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmasına izin verir. Tümör hücrelerinden türetilen eksozomlar, ana hücrelerden alınan proteinler ve nükleik asitler açısından zengindir ve bu nedenle, anti-tümör immün tepkisini indüklemek için bir tümör antijenleri kaynağı olarak görülebilir [133]. Örneğin, eksozomlar kanserli hücrelerden kaynaklanıyorsa, CD9, CD63 tetraspaninler ve CD80, CD86 yüzey antijenleri gibi tümör belirteçleri taşırlar [134, 135]. Ayrıca eksozomları hastalık tanısında özel kılan bir özellik daha vardır: Eksozomlar tüm vücut sıvılarından (serum, idrar, anne sütü vb.) salınabilmektedirler [136, 137]. Bu özellikleri hem düzgün biyodağılımlarının olduğunu hem de vücut sıvılarında kararlı bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir.

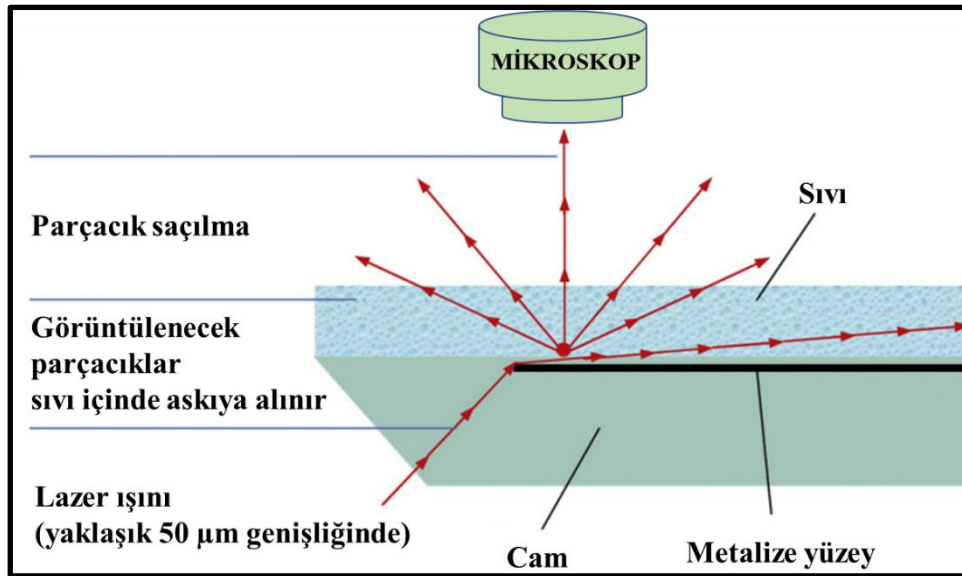
Kalın bağırsak kanseri (kolorektal kanser), en yaygın ve tehlikeli kanser türlerinden biridir. Genetik değişiklikler ve çevresel faktörler birlikte hareket ettiğinde ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanser oluşumu, bağırsağın iç duvarındaki normal kolon epitelinin adenokarsinom ve tümörlere dönüşmesiyle başlar [138]. Patolojik durumları teşhis etmek için sistematik yöntemler, kolon kanserinin erken evrelerinde hastaların yüksek tespit oranına katkıda bulunarak, ölüm oranlarında azalmaya yol açabilir. Karbonhidrat antijeni 19-9 (CA19-9) ve karsinoembriyonik antijen (CEA), kolon, karaciğer, pankreas ve mide dâhil olmak üzere birçok kanser türünün saptanmasında tümör belirteçleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Tarama yöntemleri olarak dışkıda gizli kan testi ve esnek sigmoidoskopi uygulanması, kolorektal kanser mortalitesini azaltmıştır [139]. Ancak, bu tekniklerin bazı kısıtlamaları vardır. Gaitada gizli kan testinin tespit duyarlılığı oldukça düşüktür ve esnek sigmoidoskopi invazivdir. Geliştirilen erken teşhis yöntemleri, kolon kanseri için beş yıllık sağkalım oranını %90'a kadar artırabilir [140]. Bu nedenle vücut sıvılarında kolon kanseri hücre hatlarından salgılanan eksozomların saptanması ve belirlenmesi prognostik, tanısal ve terapötik değerlerinin belirlenmesinde hayati önem taşımaktadır.

Biyosensörler, eksozomlar ve eksozomal biyobelirteçlerin (miRNA gibi) tespiti yoluyla hastalıkların erken teşhisine ve prognostik olarak izlenmesine olanak tanır. Tasarlanan sinyal dönüştürücülere göre, ağırlıklı olarak kolorimetrik [141], floresan [142], elektrokimyasal (EC) ve elektriksel yaklaşımlar [40, 41], yüzey geliştirilmiş Raman saçılması (SERS) [143], yüzey plazmon rezonansı (SPR) [144] ve eksozomların tespiti için farklı biyoalgılama stratejileri geliştirilmiştir.

2.2.4. Eksozom tayin yöntemleri

Nanopartikül izleme analizi

NanoSight LM10 (NanoSight Ltd., Amesbury, Birleşik Krallık) sistemi, bir cam prizmadan numuneye (seyreltik bir partikül süspansiyonu içeren bir sıvı) verilen ince odaklı bir lazer ışını kullanır (Şekil 2.12). Işın numuneye girerken düşük bir açıyla kırılır, bu da numunenin içinden parçacıkları aydınlatan ince bir lazer ışını ile sonuçlanır. Işın içinde bulunan parçacıklar, görüş alanındaki tüm parçacıklardan saçılan ışını toplayan, ışın eksenine normal olarak hizalanmış ve video kamera ile donatılmış geleneksel bir optik mikroskop kullanılarak görselleştirilir. Her bir parçacığın Brown hareketi izlenerek, eksozomların ve mikroveziküllerin boyutlandırılması ve sayılması sağlanır.



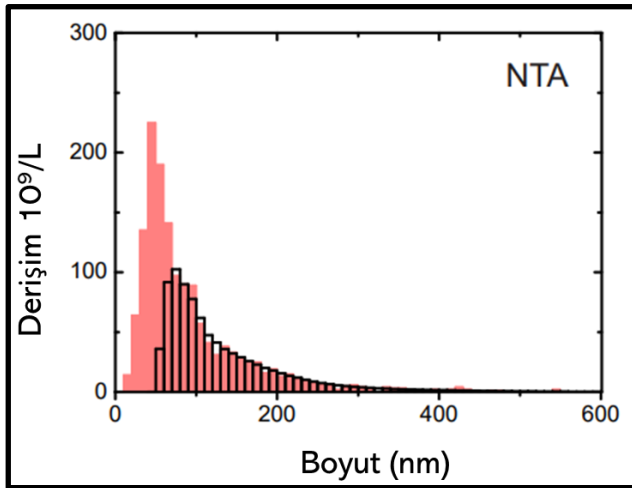
Şekil 2.12. NanoSight cihaz konfigürasyonu [150]

Parçacık hareketinin hızı, iki boyutlu Stokes-Einstein denkleminin (Eş. 2.4) uygulanmasıyla parçacık boyutunu hesaplamak için kullanılır:

$$\langle x, y \rangle^2 = \frac{K_B T_s}{3\pi\eta d_h} \quad (2.4)$$

$\langle x, y \rangle^2$ ortalama kare yer değiştirme, K_B Boltzmann sabiti, T Kelvin cinsinden çözücü sıcaklığı, t_s örnekleme süresi, η viskozite, d_h hidrodinamik çaptır.

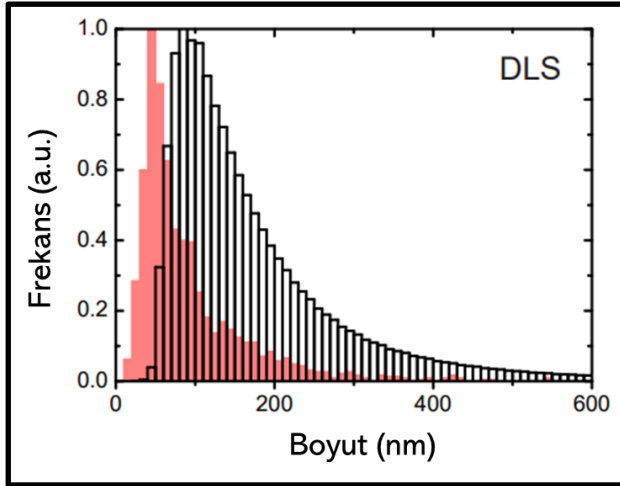
NTA, parçacık boyutuna göre konsantrasyon hakkında bilgi vermektedir (Şekil 2.13). Ayrıca numunenin monodisperse veya kümeleşme olup olmadığı hakkında da bilgi verebilmektedir. Ancak, veziküllerin fenotipini (hücresel kökenini) belirleyememesi bu yöntemin dezavantajıdır (Çizelge 2.7).



Şekil 2.13. Nanopartikül izleme analizi (NTA), 100 nm'den büyük veziküller için yüksek hassasiyetle mutlak boyut dağılımının belirlenmesi [145]

Dinamik ışık saçılımı (DLS)

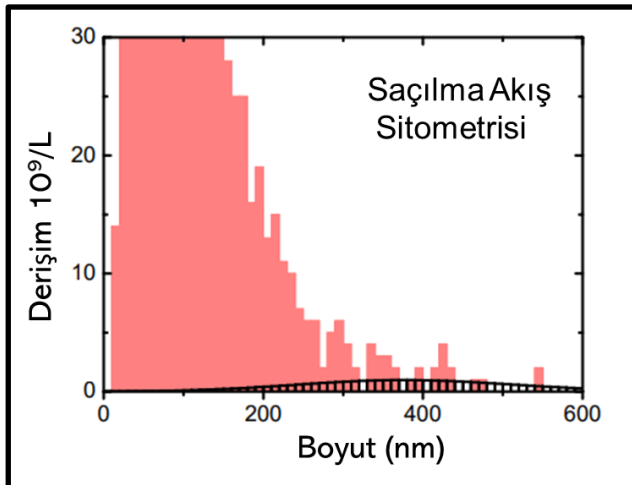
Bu yöntemde öncelikle, mikroveziküllerin ve eksozomların çapı lazer dağılımı ve süspansiyon dalgalanmalarındaki dinamik değişikliklerin ölçülmesi ile tespit edilir (Şekil 2.14). Böylelikle yine Brown hareketi kullanılarak, parçacıkların difüzyon hızı ve boyutu hesaplanabilmektedir. Bu yöntemde, trombositler gibi büyük parçacıkların varlığı DLS'nin doğruluğunu etkilemektedir.



Şekil 2.14. Dinamik ışık saçılımı (DLS), görelî boyut dağılımının belirlenmesi [145]

Akış sitometrisi (Flow Cytometry)

Her vezikül veya eksozomun, ayrı bir lazer spotu boyunca geçmesi ve yayılan floresan ışığının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Eksozom boyutları diğer hücrelerden yaklaşık 100 kat küçük olduklarından, zayıf sinyallerin geri kazanılmasında zorluk çekilebilmektedir. Bu sebeple 300 nm den daha büyük hücreler için kullanımı uygundur. Yeni cihazlar, (örneğin A50-Micro-PLUS, Apogee), 100 nm ve daha büyük boyutta eksozomları tespit edilebilmektedir (Şekil 2.15.).



Şekil 2.15. Saçılma akış sitometrisi ile eksozom derişiminin belirlenmesi [145]

Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)

TEM yönteminde, hızlandırılmış elektronlar kullanılarak eksozomların analizi gerçekleştirilmektedir. Bu özellik ile boyut, konsantrasyon ve yüzey belirteçlerinin analizi yapılabilmektedir. Bununla birlikte, dehidrasyon, fiksasyon ve metalizasyon da dahil olmak üzere geniş ön hazırlık işlemi gereklidir.

Çizelge 2.7. Eksozom karakterizasyon yöntemlerinin amacı, avantajları ve dezavantajları [152]

Metod	Amaç	Avantaj	Dezavantaj
SEM veya TEM	Eksozomal morfolojinin tespiti	Eksozomların morfolojik yapısı doğrudan gözlemlenebilir.	Çok sayıda numunenin hızlı ölçümü için uygun değildir.
DLS teknolojisi	Eksozomların boyutunu algılama	Alt ölçüm limiti, monodispers sistemlerin belirlenmesi için uygun olan 10 nm'dir.	Geniş boyut aralığına sahip karmaşık eksozom örneklerinin ölçülmesi için uygun değildir
NTA	Eksozomların boyutunu ve konsantrasyonunu tespit etme	Algılama hızlıdır ve eksozomlar gerçek zamanlı olarak gözlemlenebilir.	İşlem karmaşıktır ve kontamine proteinleri eksozomlardan ayırt etmek zordur.
WB	Eksozomal işaretleyici proteinlerin ekspresyonunun tespiti	Hücre kültürü ortamından eksozomları analiz etmek daha kolaydır.	İşlem karmaşık ve zaman alıcıdır
ELISA	Eksozomal işaretleyici proteinlerin ekspresyonunun tespiti	Güçlü özgüllüğe ve hızlı algılamaya sahiptir, işaretleyici proteinleri niteliksel ve niceliksel olarak analiz edebilir.	İşlem karmaşık ve zaman alıcıdır
Akış Sitometrisi	Eksozomların biyolojik belirteçlerinin tespiti	Yöntem, yüksek verimli, çok kanallı analiz yapabilir ve analiz hızlıdır ve gerekli numune konsantrasyonu düşüktür.	Bu teknik zaman alıcı ve zahmetlidir. Eksozomların parçacık boyutu ölçülemez.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu tez çalışması kapsamında, kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar, geliştirilen yöntem ve kullanım amaçları aşağıda listelenmiş ve açıklanmıştır.

3.1.1. Kimyasal maddeler ve malzemeler

Hidrojen tetrakloro aurat (HAuCl_4), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür (EDC), N-hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu (NHS), 11-merkaptoundekanoik asit (MUA), etanol, potasyum ferrisiyanür, potasyum ferrosiyanür Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya)'den alınmıştır. Potasyum dihidrojen fosfat, sodyum hidrojen fosfat, sodyum klorür, potasyum klorür ve sodyum hidroksit Merck'ten satın alınmıştır. Tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup ilave saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır. Bütün çözeltiler, Millipore ve Minipure deiyonize su sistemi ile üretilen saflıktaki su ile (18.2 M Ω .cm) hazırlanmış olup içinde bulunan organik bileşikler yine aynı sistemler yoluyla uzaklaştırılmıştır.

Liyofilize eksozom standardı (insan serumu) Biovision'dan (Milpitas, ABD) satın alınmıştır. Anti-CD63 ve anti-CD9 Santa Cruz Biotechnology, Inc.'den alınmıştır. hCG kiti, (Perkin Elmer, Turku, Finlandiya) içinde bulunan (hCG) proteini kullanılmıştır. Keçi Anti-Fare IgG Antikoru, (H+L) FITC konjugatı Merck'den alınmıştır. Sığır serum albumini Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den alınmıştır. Hücre kültürü numunelerindeki eksozom sayısı, System Biosciences'dan satın alınan ExoELISA-ULTRA Complete Kit ile belirlenmiştir.

Disk tipi çalışma elektrotu olarak altın elektrot (2,0 mm çap, Bioanalytical Systems, Inc.) kullanıldı. Karşıt ve referans elektrotları olarak sırasıyla Pt teli ve Ag/AgCl (3M NaCl) elektrotları (Bioanalytical Systems, Inc.) kullanıldı. Ekran baskılı altın elektrot olarak DRP-220AT, Metrohm DropSens kullanıldı. DRP-220AT, dairesel altın çalışma elektrotlu (WE, 4 mm çap), altın karşıt elektrotlu (CE) ve gümüş metali referans elektrotlu (RE) düz bir seramik karttan oluşmaktadır. İletken karbon mürekkep Daejoo Electronic

Materials'dan (Shanghai, Güney Kore) satın alındı. Ag/AgCl pasta Gwent Group'tan (Torfaen, İngiltere) satın alındı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler, IVIUM Stat ve CompactStat (Ivium Technologies, Hollanda) elektrokimyasal analizörleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen impedans değerleri ZsimpWin yazılımı kullanılarak analiz edildi. Eksozom konsantrasyonu, NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE) kullanılarak 450 nm'de belirlendi. Isıtıcı (Hot Plate Stirrer) olarak Velp Scientifica (Usmate Velate, Italya) kullanıldı. Floresans görüntüleri ise Olympus IX53 inverted mikroskop ile alınmıştır. Kâğıt bazlı elektrotları tasarlamak için XEROX ColorQube™ 8570 marka mumlu yazıcı (Norwalk, ABD) kullanıldı.

3.2. Yöntem

Bu tez kapsamında EIS tekniği kullanılarak üç farklı çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların ilk kısmında kalın bağırsak kanseri hücre hattından izole edilen Colo 320 eksozomlarının tayini klasik altın elektrot ile gerçekleştirilerek gözlemlenen veri noktaları için en uygun kalibrasyon grafiği geliştirilmiştir. Tezin ikinci kısmında ticari olarak satın alınan eksozom standartlarının tayini ekran baskılı altın elektrotlar ile gerçekleştirilmiştir. Tezin son kısmında ise ticari olarak satın alınan eksozom standartlarının tayini kâğıt-tabanlı elektrotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Kalın bağırsak kanseri hücre hattından izole edilen Colo 320 eksozomlarının klasik altın elektrot ile tayin metodu

ELISA ile eksozom partikül tayini

Numunedeki eksozom partikül seviyeleri, üretici firmanın talimatlarına göre (ExoELISA-ULTRA Complete Kit (CD63 Detection), System Biosciences, CA, ABD) ticari bir tahlil kiti kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ticari olarak satın alınan standart proteinler buz üzerinde çözüldükten sonra çeşitli konsantrasyonlarda standart proteinler ve eksozom numuneleri mikrotitre plakasına ilave edildi. Daha sonra mikrotitre plakası

parafilm ile kaplandı ve hafifçe karıştırılarak 37°C'ta 1 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa CD63 primer antikoru uygulandı ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloke edici tampon içindeki her bir oyuğa ikincil antikor ilave edildi ve 1 saat inkübe edildi. Her bir inkübasyon adımı için kuyucuklar tampon solüsyonu ile yıkandı. Örnekler süper hassas TMB ELISA substratı ile çalkalayıcıda 5-15 dakika inkübe edildikten sonra durdurma tamponu uygulandı ve ELISA okuyucusunda 450 nm'de okuma yapıldı.

Altın elektrodun antikor modifikasyonu

İlk olarak, altın yüzeyi MUA ile muamele edildikten sonra altın elektrot yüzeyinde Au-S etkileşimi ile bir karboksilik asit modifikasyonu elde edildi. Bu amaçla, elektrotlar 1 mM MUA çözeltisine daldırıldı ve ardından gece boyunca oda sıcaklığında karanlıkta karışmaya bırakıldı. Bağlı olmayan MUA'yı uzaklaştırmak için etanol ile yıkama yapıldı ve elektrotlar, yüzeylerinde bulunan karboksilik asit gruplarını aktive etmek için 1 saat boyunca 0,4 M EDC.HCl ve 0,1 M NHS ile muamele edildi. İşlem tamamlandıktan sonra her elektrot 0,5 nM anti-CD63 ile 4°C'ta 2 saat inkübe edildi. Daha sonra altın elektrotlar 1 mL PBS 7,4 ile yıkandı. Dönüştürücü yüzeyi modifiye edilmemiş karboksilik asit grupları üzerinde spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için %0,1 BSA (w/w) solüsyonu ile inkübasyon yapıldı. Modifikasyon adımlarından sonra, Colo 320 eksozomlarının çeşitli konsantrasyonlarına ile anti-CD63 ile modifiye edilmiş elektrotların inkübasyonu sonrasında CV ve EIS ölçümleri kaydedildi.

EIS ile eksozom tespiti

Ölçümlerde Faradaik yöntem tercih edildiğinden PBS tampon çözeltisinde redoks probu olarak 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ kullanıldı. Antikor modifiye elektrotlar üzerinde elektrokimyasal ölçümler yapıldıktan sonra redoks probu içermeyen pH 7,4 PBS tampon solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra altın elektrotlar, oda sıcaklığında $4,0 \times 10^{12}$, $1,2 \times 10^{13}$, $2,0 \times 10^{13}$, $2,8 \times 10^{13}$, $3,6 \times 10^{13}$ eksozom partikül μL^{-1} konsantrasyonlarında 250 μL eksozom numunesi ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Elektrokimyasal impedans spektroskopi sonuçları, biyosensör sistemini değerlendirmek için artan analit miktarıyla ilişkili bağlı yanıt (RR_n) [40] biçiminde değerlendirildi ve RR_n aşağıdaki şekilde tanımlandı (Eş. 3.1).

$$RR_n^f = [RR_{Ex}^f - RR_{Ab}^f] / RR_{Ab}^f \quad (3.1)$$

RR_{Ab} , dönüştürücü yüzeyine yalnızca antikor bağlandığında yani yüzeyde analit yokken verilen yanıttır. RR_{Ex} , aynı frekansa, f , farklı eksozom konsantrasyonları ile inkübasyondan sonra alınan yanıttır. Elektrot yüzeyindeki gerçek impedans analizinin değerlendirilmesinde 'göreceli yanıt' yöntemi seçilerek elektrot yüzeyinde oluşabilecek olası farklılıkların önüne geçilmiştir.

Eğri oluşturma

Eksozom numunelerinin konsantrasyon değerleri oldukça büyük olduğundan, ikinci ve üçüncü dereceden polinom fonksiyonlarında doğru katsayıları elde etmek için MATLAB yazılımında değerler ölçeklendirilerek *polyfit* komutu kullanılmıştır ve detaylı komutlar aşağıda belirtilmiştir.

```
>>x=[4*10^12 1.2*10^13 2*10^13 2.8*10^13 3.6*10^13];
>>y=[0.0847 0.0429 0.0183 0.0112 0.0084]';
>> T = table(x,y);
>> [p,~,mu] = polyfit(T.x, T.y, a)
```

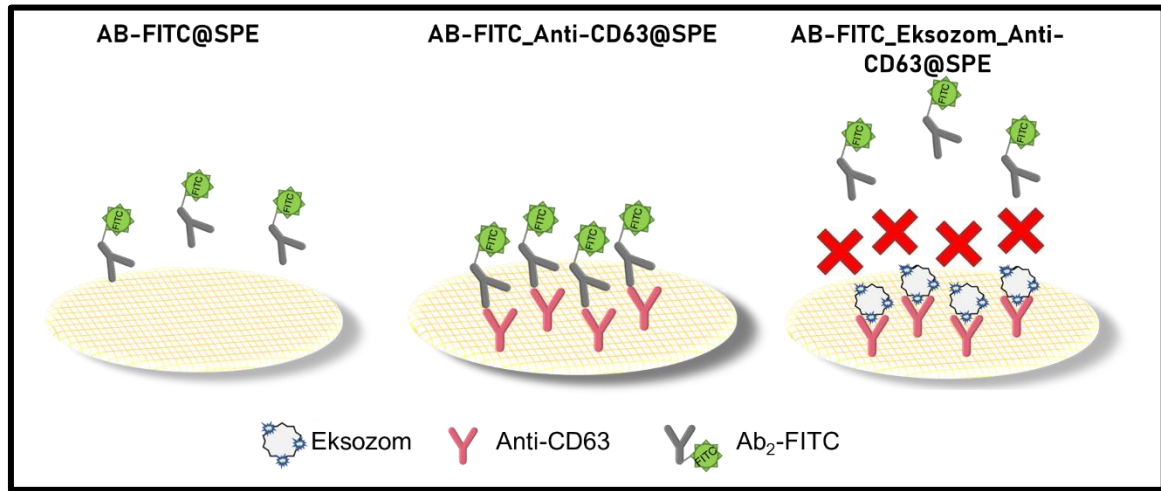
Yukarıdaki komutlarda ikinci dereceden ve kübik polinomlar için sırasıyla $a=2$ ve $a=3$ alınmıştır.

3.2.2. Eksozom standartlarının ekran baskılı altın elektrotlar ile tayin metodu

Floresan görüntüleme

Öncelikle çalışmada yer alan antijen-antikor etkileşiminin görselleştirilmesi için floresan mikroskobu kullanıldı. FITC (Fluorescein izotiyosiyanat)-konjuge keçi anti-fare poliklonal antikor (Ab-FITC, AP308F) bir floresan etiket olarak Millipore'dan satın alındı. Ekran baskılı elektrotlar (SPE) ile hazırlanan eksozom biyosensörleri, çeşitli modifikasyon aşamalarında Ab-FITC ile inkübe edilerek spesifik olmayan bağlanmalar ve antijen-antikor etkileşimi incelendi (Şekil 3.1). İlk olarak, yalın SPE'ye spesifik olmayan bağlanmayı

gözlemlemek için, $10,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ konsantrasyonunda $5,0 \text{ } \mu\text{L}$ Ab-FITC, doğrudan SPE'nin çalışma elektrotu yüzeyine damlatıldı ve 60 dakika süreyle inkübe edildi. Diğer iki SPE, gece boyunca $20,0 \text{ mM}$ MUA ile modifiye edildi ve daha sonra MUA'nın karboksil grupları, 60 dakika boyunca MES tamponu ($\text{pH } 6,5$) içinde $0,4 \text{ M}$ EDC ve $0,1 \text{ M}$ NHS karışımı kullanılarak aktive edildi. Aktivasyon adımından sonra her iki SPE'ye $5,0 \text{ } \mu\text{L}$ $2,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ Anti-CD63 damlatıldı ve 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Anti-CD63 konjuge SPE'lerden biri $5,0 \text{ } \mu\text{L}$ $10,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ Ab-FITC ile etiketlendi. Diğer Anti-CD63 konjuge SPE ise, $3,7 \times 10^8$ eksozom partikülü ile etkileşime girdi ve Ab-FITC_Eksozom_Anti-CD63@SPE sandviç yapısını oluşturmak için $10,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ konsantrasyonunda $5,0 \text{ } \mu\text{L}$ Ab-FITC ile etiketlendi. Hazırlanan üç SPE'nin mikroskop görüntüleri kaydedildi ve antijen-antikor etkileşimini değerlendirmek için sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldı.



Şekil 3.1. Floresans mikroskop görüntüleri için sensörlerin hazırlanması

SPE'ler üzerine antikor bağlanması

SPE'ler, her deneyden önce $50,0 \text{ } \mu\text{L}$ $0,6 \text{ M}$ H_2SO_4 çözeltisi ile ön işleme tabi tutuldu ve döngüsel voltamogramlar, 100 mV s^{-1} 'lik bir tarama hızı kullanılarak 10 döngü ile 0 ila $+1,25 \text{ V}$ arasında kaydedildi [146]. Daha sonra elektrotlar PBS 7,4 ile yıkandı. SPE biyosensörlerini hazırlamak için, SPE'ler EtOH çözeltisi içinde $20,0 \text{ mM}$ MUA çözeltisine alındı ve bir gece boyunca karışmaları sağlandı. Daha sonra etanol ile üç kez yıkandı. Yıkama adımından sonra, MUA'nın karboksil grupları, MES tamponu ($\text{pH } 6,5$) içinde $0,4 \text{ M}$ EDC ve $0,1 \text{ M}$ NHS karışımı kullanılarak 60 dakika süreyle aktive edildi. MUA ile

modifiye edilmiş SPE yüzeylerine, 5,0 µL 2,0 ng µL⁻¹ Anti-CD63 uygulandı ve 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS 7,4 kullanılarak yıkama aşaması uygulandı ve ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için 5,0 µL %0,1'lik BSA uygulandı.

EIS ile eksozom tespiti

EIS ölçümleri, SPE yüzeyindeki üç elektrotlu sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda 5,0 µL standart eksozom numuneleri anti-CD63 ile modifiye edilmiş SPE'lere (Anti-CD63@SPE) uygulandı ve 50 dakika inkübe edildi. R_{CT}, redoks potansiyelinde yük transfer reaksiyonu sırasında ölçülebildiğinden EIS ölçümlerinde kullanılacak potansiyeli bulmak için Fe(CN)₆^{3-/4-} çiftini içeren elektrolitte CV ölçümü gerçekleştirildi. EIS ölçümlerinde, elektronların veya iyonların elektrottan çözeltiye veya tam tersi şekilde fiziksel transferini içeren Faradaik yaklaşım tercih edildi [147]. Faradayik impedimetrik yanıt için uygulanan potansiyel, elde edilen Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin döngüsel voltamogramından 0,1 V olarak kararlaştırıldı ve hazırlanan immünosensörlerin impedans yanıtları 5,0 mM [Fe(CN)₆^{3-/4-} (0,1 M KCl, pH 7,4) içeren elektrolit ile ölçüldü.

Tüm numuneler için elektrokimyasal impedans analizöründen elde edilen impedans verilerinin kalitesi ve tutarlılığı, EIS spektrum analizör yazılımında Kramer-Kronig uygunluk testi (KK testi) ile doğrulanmıştır [148]. Ölçüm sonuçları 10⁻³'lük bir χ² hata istatistik değeriyle mükemmel bir korelasyon göstermiştir. ZsimpWin yazılımı, χ² hata istatistiklerini hesaplamak için Down-hill Simplex Metodu'nu kullanmıştır [149, 150]. Modele uyumun ölçüsü χ² parametresidir ve aşağıda belirtildiği şekilde tanımlanmaktadır (Eş. 3.2):

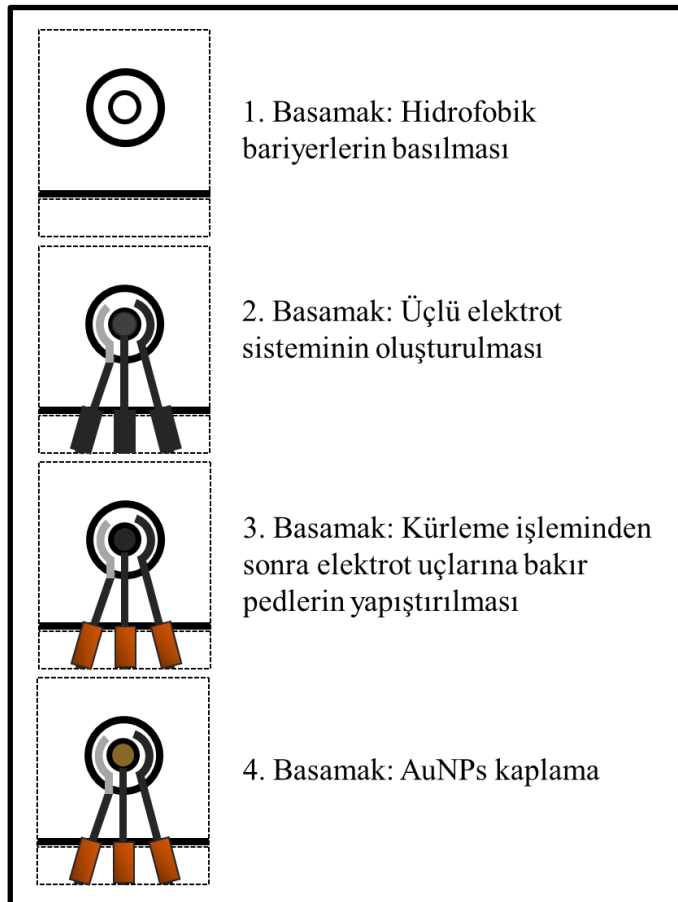
$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(Z'_i(\omega_i, \vec{p}) - a_i)^2}{a_i^2 + b_i^2} + \frac{(Z''_i(\omega_i, \vec{p}) - b_i)^2}{a_i^2 + b_i^2} \right] \quad (3.2)$$

Denklemde ω_i , a_i , b_i deneysel veri noktalarını, $\vec{p}$ model ile ilişkili bir parametreyi, Z'_i , Z''_i hesaplanan verileri temsil etmektedir.

3.2.3. Eksozom standartlarının kâğıt-tabanlı elektrotlar kullanılarak tayini

Kâğıt bazlı elektrotların tasarımı

Kâğıt malzeme olarak Whatman FF80HP Membranlar kullanıldı ve kâğıt üzerinde çalışmayı kolaylaştıracak bir tasarım yapıldı. Membran yüzeyinde hem çalışma elektrodunu hem de toplam çalışma alanını kapsayan iki yuvarlak bariyer (10 mm ve 3 mm çapında) mum baskı yöntemi ile oluşturuldu. Çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu sistemi membran üzerine kurmak için 1 mm kalınlığında çelik maske kullanıldı. Bu maske, kâğıt tabaka üzerine yerleştirildi ve karbon mürekkep uygulandı. Referans elektrodu oluşturmak için ek olarak Ag/AgCl mürekkebi uygulandı. Ardından, karbon mürekkebin membran yüzeyine sabitlenmesi, mumu eritmesi ve membrana nüfuz etmesi için 90 °C'ta 5 dakika kürlendi. Ayrıca elektrik bağlantısını kolaylaştırmak için elektrotların bağlantı kısmına bakır bantlar yapıştırıldı. Kâğıt elektrotların üretim süreci Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Kâğıt elektrotların üretim yönteminin şematik gösterimi

Altın nanoparçacıkların (AuNPs) çalışma elektrotunda biriktirilmesi

Kâğıt elektrot yüzeyine 5 mM kloroaurik asit içeren 75,0 μL 0,1 M KCl solüsyonu eklenmiş ve kronoamperometri yöntemi ile 600 s -0,3 V sabit potansiyel uygulanarak altın nanoparçacık kaplama yapılmıştır.

AuNP kaplı kâğıt elektrotların (AuNPs@PE) anti-CD9 immobilizasyonu

500 μL 20 mM EtOH/H₂O (8:1) çözeltisi içinde MUA, AuNPs@PE'ye uygulandı ve 24 saat karışması sağlandı. Elektrotlar 2 mL EtOH ile yıkandı. Daha sonra her yüzeye 150 μL 0,4 M EDC/ 0,1M NHS çözeltisi uygulandı ve 1 saat karıştırıldı. Elektrotlar 1 mL distile su ile yıkandı. 5 μL 4 ng μL^{-1} anti-CD9, her yüzeyin çalışma elektrodu kısmına uygulandı. PBS 7,4 ile yıkama aşaması uygulandı ve ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için 5 μL %0,1 BSA uygulandı.

EIS ile eksozom tespiti

EIS ölçümlerini gerçekleştirmek için üç elektrotlu bir sistem (çalışma elektrodu, karşı elektrot ve referans elektrot) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda 5,0 μL standart eksozomlar, Anti-CD9@PE'lere ayrı ayrı uygulandı ve 40 dakika süreyle inkübe edildi. Faradayik impedimetrik yanıt için uygulanan potansiyel, elde edilen döngüsel voltamogramlardan 0,1 V olarak kararlaştırıldı ve hazırlanan immünosensörlerin impedans yanıtları 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (0,1 M KCl içeren, pH 7,4) kullanılarak alındı.

PE'lerin SEM görüntülerinin alınması

Taramalı elektron mikroskobu deneyleri, QUANTA 400F Alan Emisyon SEM ile gerçekleştirilmiştir. Karbon, AuNPs ve anti-CD9 ile modifiye edilmiş PE'lerin SEM görüntüleri için ek işleme uygulanmadı. 5 μL $1,0 \times 10^8$ eksozom mL^{-1} inkübe edilmiş PE'nin SEM görüntüsü için, önce elektrotta 5 μL %2,5 glutaraldehit çözeltisi uygulandı, daha sonra dehidrasyon için etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı [151].

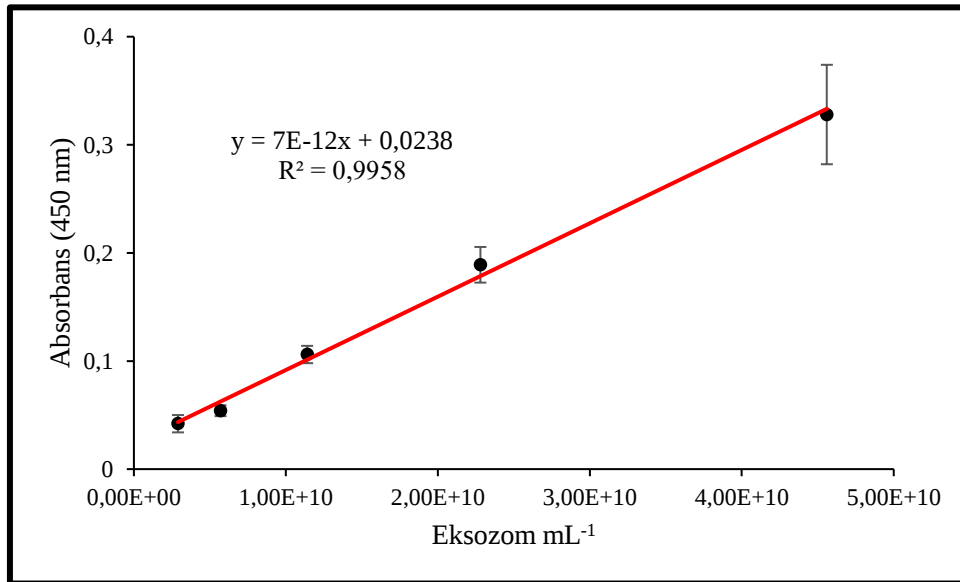
4. BULGULAR

4.1. Colo 320 Eksozomlarının Altın Elektrot İle Tayini

Yüksek derişimli eksozom numunleri kullanarak tasarlanan sensör sisteminde doğrusal olmayan kalibrasyon grafikleri kullanılarak LOD hesabına ilişkin yöntem geliştirilmiştir.

4.1.1. ELISA ile eksozom partikül tayini

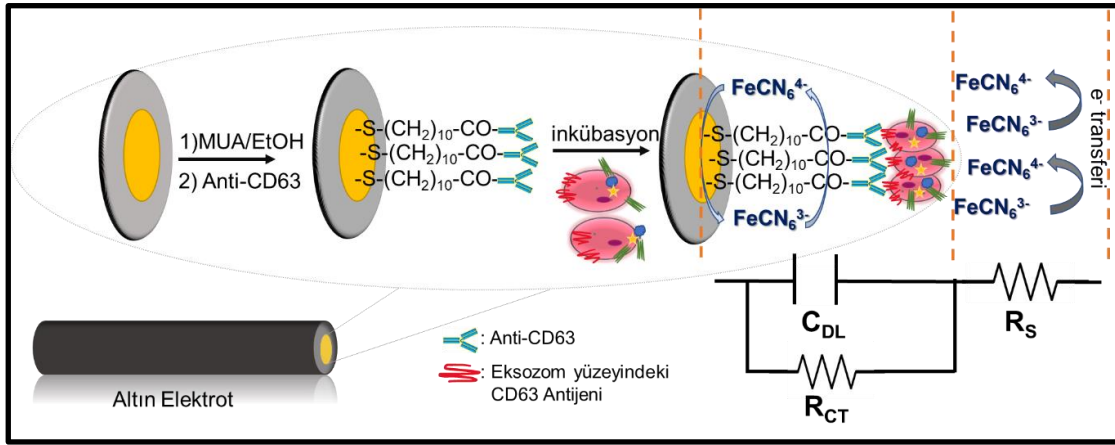
ELISA, hücre kültürleri ve örneklerde ilgilenilen hedeflerin tespiti ve miktarının belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Geleneksel sandviç ELISA kitleri, rekabetçi ELISA kitleri ve birçok hedef için hücre bazlı ELISA kitleri dahil olmak üzere ticari olarak satılan birçok çeşidi bulunmaktadır. ELISA yöntemini, geliştirilen başka bir tayin yöntemine uyarlama kolaylığı, araştırmacıların tek bir çalışmada büyük örnek sayılarını test etmelerini sağlamaktadır. Bu çalışmada ELISA kiti kullanılarak eksozom kültürü ve eksozom standartlarının eksozom sayısı yönünden derişimleri belirlenmiştir. Elde edilen standart eğri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Eksozom derişimi bilinmeyen örneklerde kullanılmak üzere hazırlanan ExoELISA-ULTRA CD63 standart eğrisi

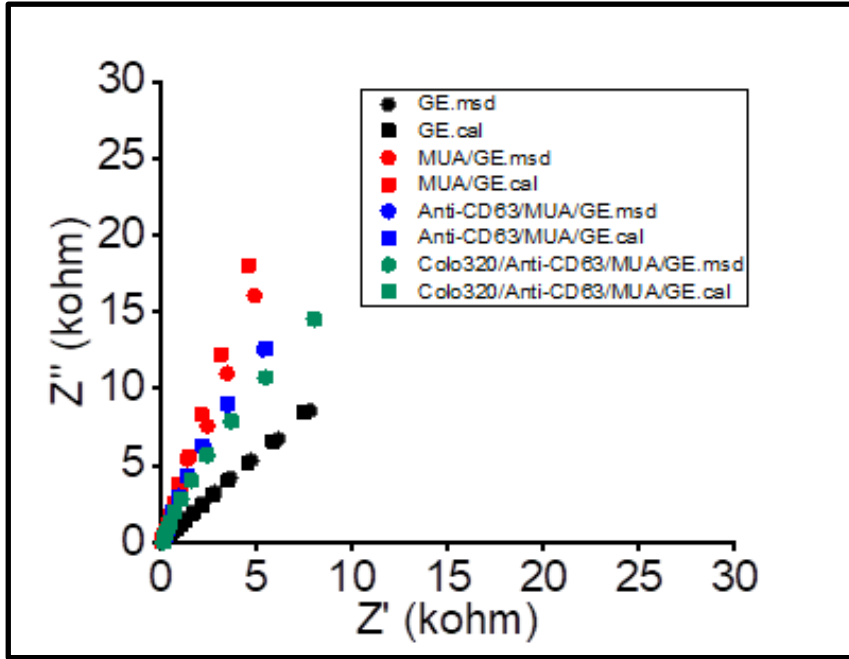
4.1.2. Biyosensör tasarımı

Altın elektrotların hazırlanma sürecinde iki temel unsur rol almaktadır: ilki MUA tek tabakası ve diğeri ise eksozom biyoreseptörü olarak kullanılan anti-CD63'tür. MUA tek tabakası, Au-S bağı ile altın elektroda bağlanmıştır. Anti-CD63'ün -COOH fonksiyonel dönüştürücüye kovalent immobilizasyonu, EDC/NHS birleştirme ajanları ile gerçekleştirilmiştir. Biyosensör tasarımında en önemli faktörlerden biri olan duyarlılık, eksozomların yakalanmasında ve tayininde görev alan anti-CD63 ile sağlanmıştır. Elektrot yüzeyindeki R_{CT} , EIS ile belirlenerek, meydana gelen değişiklikler ile immobilizasyon işlemi optimize edilmiştir. Hazırlanan sensöre ait şematik diyagram Şekil 4.2'de belirtilmiştir.

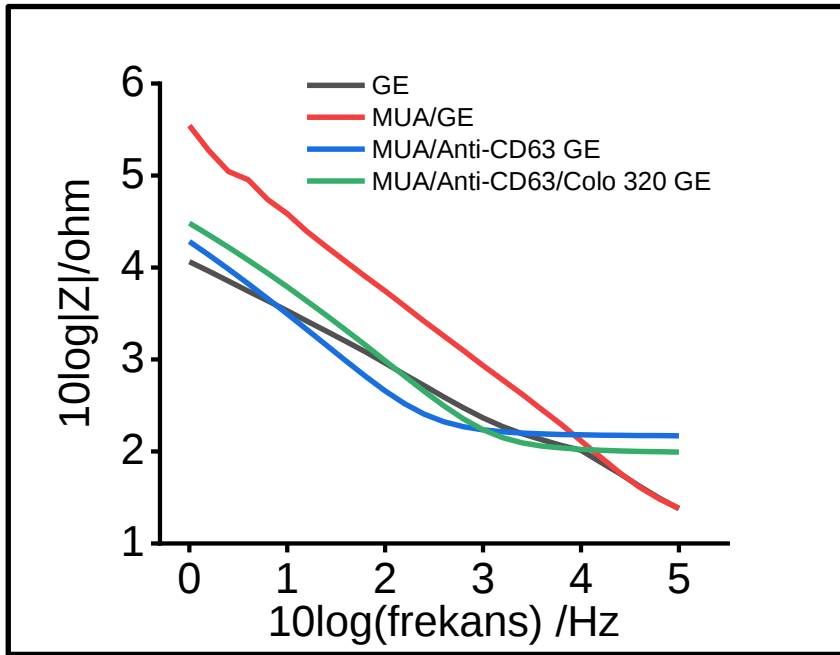


Şekil 4.2. Klasik altın elektrot ile eksozom tayininin şematik gösterimi

Çıplak altın elektrot yüzeyinde karbodiimid/süksinimit kimyası yoluyla analite spesifik antikör bağlanması, R_{CT} 'de $10,9 \pm 0,4 \text{ k}\Omega$ 'dan (BSS %, %3,95, n=3) $30,1 \pm 3,3 \text{ k}\Omega$ 'a (BSS %, %11, n=3) beklenen bir artış meydana getirmiştir. Hazırlanan biyosensörün $4,0 \times 10^{12}$ eksozom partikül μL^{-1} ile inkübasyonundan sonra R_{CT} $39,5 \pm 0,3 \text{ k}\Omega$ (BSS %, %0,67, n=3) olarak elde edilmiştir. Eksozom tespiti için tasarlanmış biyosensör sisteminin Nyquist grafiği Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Bu grafikte, her bir modifikasyon adımıyla elde edilen veriler, $R(C(RW))$ eşdeğer devre modeline göre simüle edilenlerle karşılaştırılmıştır. Ayrıca, çıplak altın elektrot, MUA, anti-CD63 ve Colo 320 eksozom modifiye altın elektrot matrislerinin Bode diyagramları ve eşdeğer devrenin belirli bölümlerindeki frekans bölgeleri Şekil 4.4.'de sunulmuştur. Modifikasyona ait hem R_{CT} hem de reel impedansın $\log 0$ 'daki verileri Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.



Şekil 4.3. Çıplak, MUA, anti-CD63 ve Colo 320 eksozomu ($4,0 \times 10^{12}$ eksozom partikül μL^{-1}) inkübe edilen biyosensörün 1mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{PBS } 7,4$ içinde ölçülen (●) ve simüle edilen (■) veri noktalarıyla Nyquist grafiği



Şekil 4.4. Çıplak, MUA, anti-CD63 ve Colo 320 eksozomu ($4,0 \times 10^{12}$ eksozom partikül μL^{-1}) inkübe edilen biyosensörün Bode grafiği

Çizelge 4.1. Altın elektrodun modifikasyonuna ait RCT ve reel impedans verileri

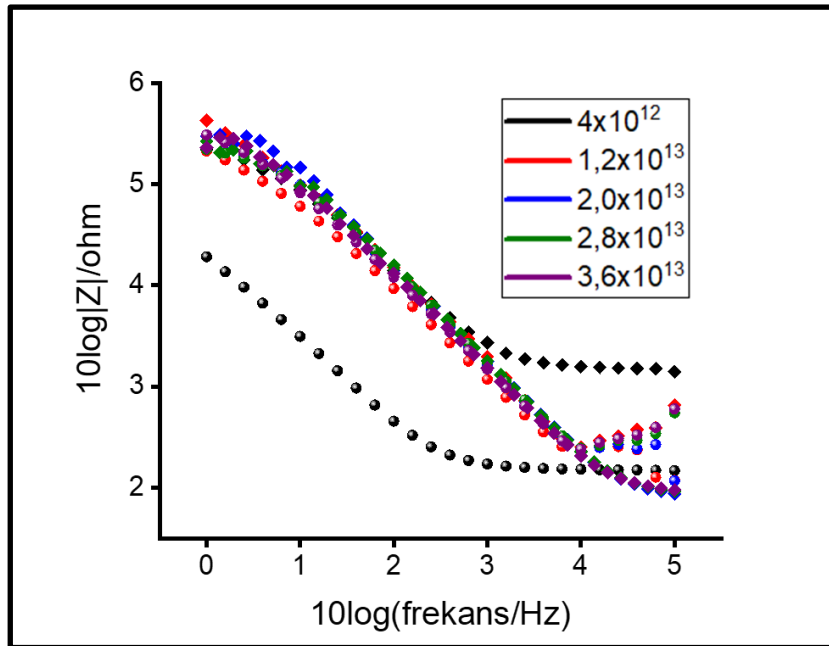
Yüzey Modifikasyonu	RCT (k Ω)	Reel İmpedans (10log Z /ohm)
GE	10,9 $\pm$ 0,4 k Ω (BSS %, %3,95, n = 3)	4,072 $\pm$ 0,007 (BSS %, %0,17, n = 3)
MUA/GE	40,5 $\pm$ 1,6 k Ω (BSS %, %4, n=3)	5,422 $\pm$ 0,124 (BSS %, %2,28, n = 3)
AntiCD63/MUA/GE	30,1 $\pm$ 3,3 k Ω (BSS %, 11%, n = 3)	3,497 $\pm$ 0,001 (BSS %, %0,04, n = 3)
Colo320/AntiCD63/MUA/GE	39,5 $\pm$ 0,3 k Ω (BSS %, %0,67, n=3)	3,793 $\pm$ 0,002 (BSS %, %0,05, n = 3)

4.1.3. Au/MUA/Anti-CD63/GE biyosensörü ile colo 320 eksozomlarının impedimetrik tespiti

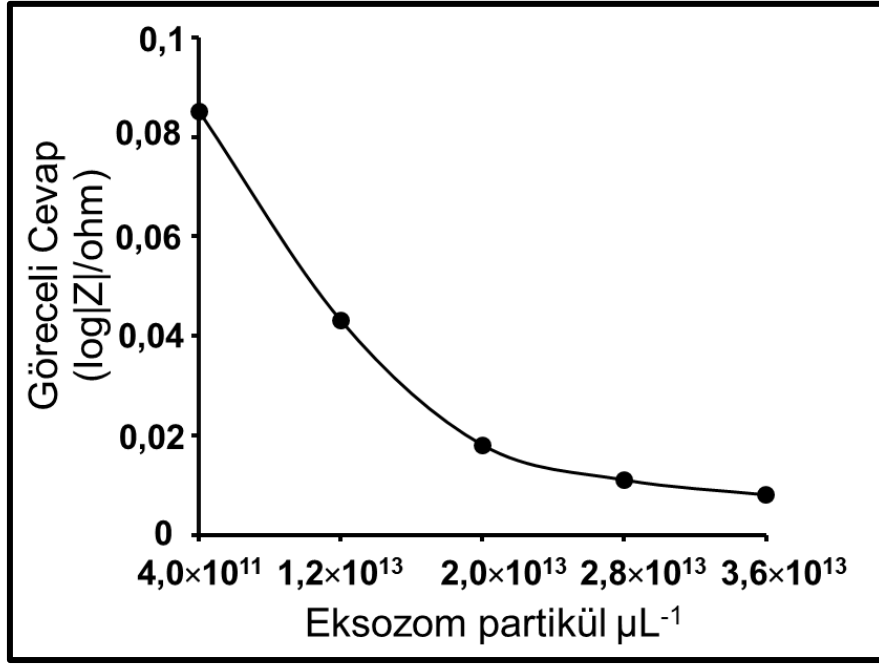
Bode diyagramı, uygulanan potansiyelin frekansı aracılığıyla impedans çıkışının bir fonksiyonu olarak elde edilmiştir. Tüm impedans ölçümlerinde Bode Diyagramı çıktısı olan gerçek impedansın logaritmik değeri (log |Z|/ohm) esas alınmıştır ve Çizelge 4.2'de belirtilmiştir. Her elektrodun verileri, farklı eksozom inkübasyonu derişimlerinden önce ve sonra elde edilmiştir ve Şekil 4.5'de gösterilmektedir. Kalibrasyon eğrisinde kullanılmak üzere bu grafikten elde edilen veriler ile *RR* değerleri hesaplanmış ve Şekil 4.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Çeşitli derişimlerdeki Colo 320 numunelerinin göreceleri impedimetrik cevapları ($f = 100$ Hz) (CD63 kodu antikor modifiye elektrotları, derişim ifadesi ise inkube edilen eksozom sayısını göstermektedir.)

Göreceli Cevap Parametreleri					
	A	B	C	Ortalama	RR
CD63-2	3,495	3,497	3,498	3,497	0,085
$4,0 \times 10^{12}$	3,79	3,794	3,794	3,793	
CD63-3	4,780	4,795	4,789	4,788	0,043
$1,2 \times 10^{13}$	4,991	5,005	5,016	4,993	
CD63-4	4,991	5,016	5,005	5,004	0,018
$2,0 \times 10^{13}$	5,084	5,039	5,162	5,095	
CD63-5	4,939	4,966	4,954	4,953	0,011
$2,8 \times 10^{13}$	4,966	4,981	5,077	5,008	
CD63-6	4,900	4,915	4,908	4,908	0,008
$3,6 \times 10^{13}$	4,967	4,934	4,945	4,949	

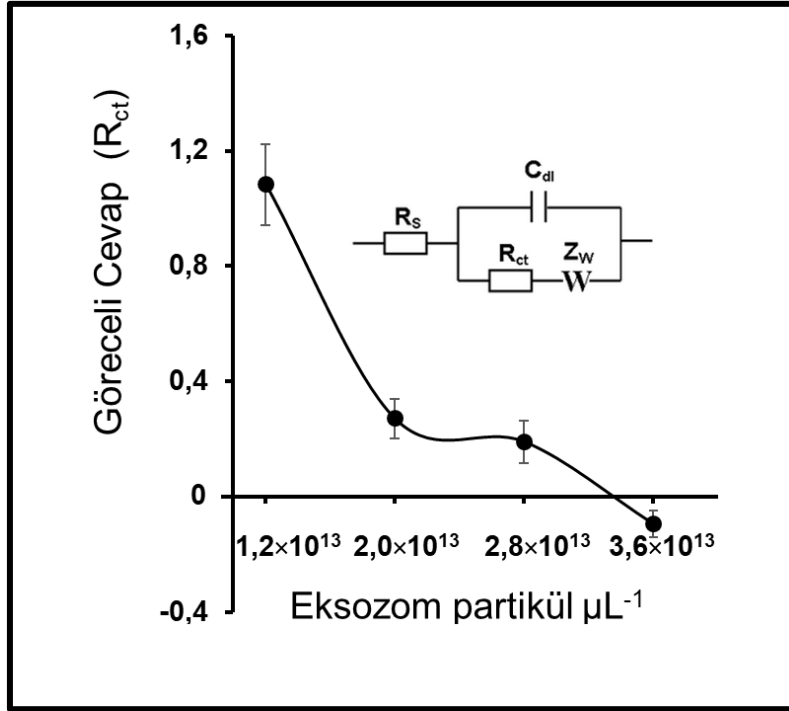


Şekil 4.5. Farklı derişimlerde eksozom uygulanmasından önceki (●) ve sonraki (◇) sensörün Bode diyagramı



Şekil 4.6. Altın elektrot ile hazırlanan biyosensörün farklı derişimler için ölçülen gerçek impedansın göreceli cevapları (100 Hz)

Biyosensörün elektriksel özelliklerine üç durum katkıda bulunur: (i) elektrot yüzeyindeki yüklü parçacıklardan kaynaklanan çift katmanlı etki, (ii) biyomoleküller ve elektrot arasında yük transferi, (iii) elektroaktif türlerin elektrot yüzeyine difüzyon bileşeni. Eksozom yüklü bir parçacık olarak elektrot üzerine bağlandıktan sonra, impedimetrik bir ölçümde uygulanan potansiyel tarafından çift katmanlı bir etki ortaya çıkmaktadır. Analit konsantrasyonunun artmasıyla nispi tepkinin azalması, ferrosiyanür/ferrisiyanür redoks çifti için daha iyi bir elektron transferini göstermiştir [152, 153]. Farklı derişimler için yük transfer dirençleri Şekil 4.7’de belirtilmiştir. Elektrot yüzeyinde eksozom yakalamadan sorumlu olan antikörler, hedef biyomolekül ile etkileşime girdiğinde, bu davranış bir yük pertürbasyonu yaratır [154, 155]. Bu nedenle impedansın göreceli cevabındaki azalma, biyomolekül konsantrasyonundaki artışın bir sonucu olarak yorumlanabilir [156, 157].

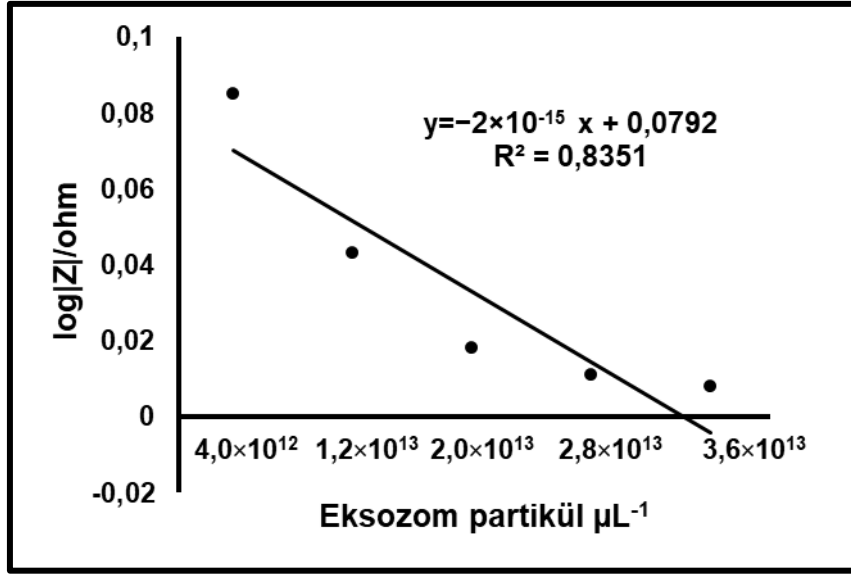


Şekil 4.7. Altın elektrot ile hazırlanan biyosensörün Randless Devresine göre hesaplanan yük transfer dirençleri

4.1.4. Tasarlanan sensöre ait kalibrasyon eğrisi çalışmaları

Bağımlı değişkenin bir veya daha fazla bağımsız değişkenle ilişki derecesinin analizi, diğer bir deyişle 'regresyon', veri setinin oluşturduğu eğriye en uygun modelin belirlenmesi işlemidir. Regresyonda en iyi eğrinin veri noktalarına mümkün olduğunca yakın olması beklenmektedir. Kalibrasyon katsayısı (R^2) 0,9900'den büyük olan bir kalibrasyon eğrisi ile daha doğru sonuçlar elde edilmektedir [158].

Veri noktaları ile en güvenilir sonuçları sağlamak için eğri modelinin seçilmesi uygun bir yöntemdir. Değişkenler arasında doğrusal bir ilişki varsa, yani belirli bir aralıkta bir değişkenin değerleri diğer değişkenin değerleriyle doğru orantılıysa, o zaman doğrusal regresyon en iyi sonucu verir. Sinyale karşı konsantrasyona dayalı bir kalibrasyon eğrisi genellikle $y=mx+b$ doğrusal modeli ile oluşturulur. Burada konsantrasyon, sinyal ve eğim sırasıyla x,y ve m olarak sembolize edilir. Yukarıda bahsedildiği gibi, deneylerimiz sonucunda elde edilen verilere doğrusal fonksiyona uygulandığında Şekil 4.8'deki kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Veri noktalarının doğrusal olarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi

$$y = -2 \times 10^{-15}x + 0,0792 \quad (4.1)$$

Deneysel sinyal sonuçları, Eş. 4.1'deki lineer fonksiyon tarafından elde edilen sinyal sonuçları ile karşılaştırıldı. Standart sapma, her konsantrasyon noktası için aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı (Eş. 4.2) ve $s=0,01517$ olarak elde edildi.

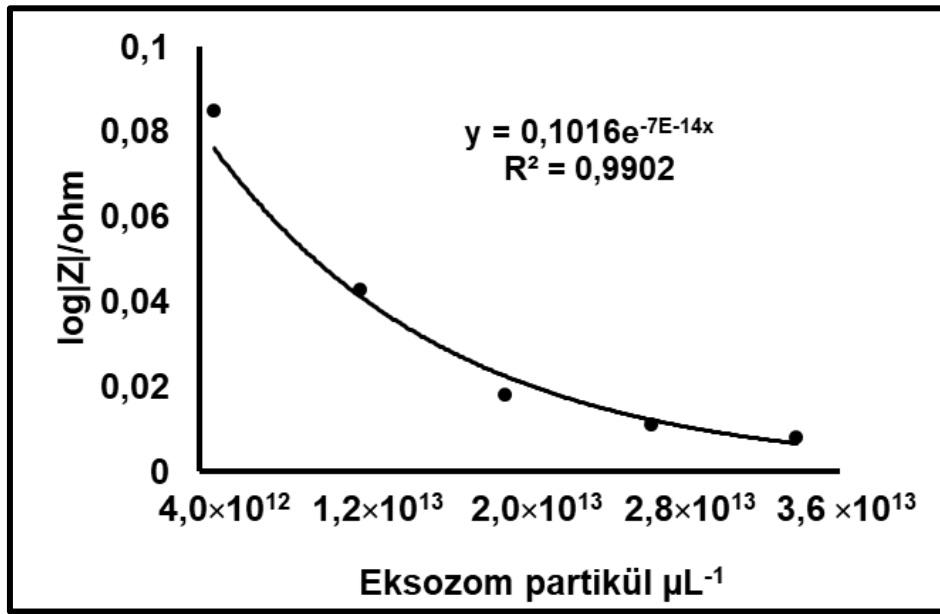
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (4.2)$$

Ayrıca aşağıdaki formülü kullanarak (Eş. 4.3) LOD değerini $2,50 \times 10^{13}$ eksozom partikül μL^{-1} olarak hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3,3 \times (\text{Kalibrasyon Eğrisinin Kesişmelerinin Standart Sapması})}{(\text{Kalibrasyon Eğrisinin Eğimi})} \quad (4.3)$$

Öte yandan, biyolojik ölçümlerin karmaşık yapısı nedeniyle doğrusal yanıtı gözlemlemek her zaman mümkün değildir. Hayashi ve arkadaşları, rekabetçi ELISA için doğrusal olmayan kalibrasyon eğrisinde saptama sınırı ve nicelik aralığı için bir öneri sunmuş ve olası hata kaynaklarına dayalı olarak bir belirsizlik denklemi türetmiştir [159, 160]. Benzer şekilde, 0,9900'den oldukça küçük olan $R^2=0,8351$ kalibrasyon katsayısından da

görülebileceği gibi, deneylerde elde edilen verilere lineer bir kalibrasyon eğrisinin uygun olmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, sonuçların (ve R^2) doğruluğunu artırmak için, verilerin doğrusal olmayan regresyon ile diğer olası eğrileri sığdırılması amaçlanmıştır. Bu noktada $y=ce^{Ax}$ formunun en iyi üstel eğrisini, ikinci dereceden ve kübik polinom modelleri düşünülmüştür. Daha sonra deneysel sinyaller, Şekil 4.9'daki üstel fonksiyon ile teorik olarak elde edilen sinyallerle karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.9. Veri noktalarının üstel fonksiyon kullanılarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi

$$P_1(x) = ce^{Ax} = 0,1016e^{-7E-14x}$$

Üstel eğri kullanılarak LOD'nin belirlenmesi için, standart sapma, Eş. 4.2 ile $s=0,00592$ olarak elde edilmiştir.

LOD hesaplamasında kullanılan doğrusal olmayan bir grafiğin eğimi, m , eğrilerin değerinden mutlak eğimin maksimumu alınarak kullanılabilir [161, 162]. Doğrusal olmayan $y=ce^{Ax}$ denkleminden çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi iki durumda en büyük olmaktadır: a) $(P_1'(4,0 \times 10^{12})$ ve $P_1'(3,6 \times 10^{13}))$ fonksiyonları için türevin uç noktalarında, b) fonksiyonun ikinci türevi sıfıra eşit veya tanımsızken, belirtilen durumların her birini değerlendirilip aşağıdaki gibi iki fonksiyon elde edilmiştir:

$$P_1'(x) = -0,7112E - 14e^{-7E-14x},$$

$$P_1''(x) = 4,9784E - 28e^{-7E-14x}$$

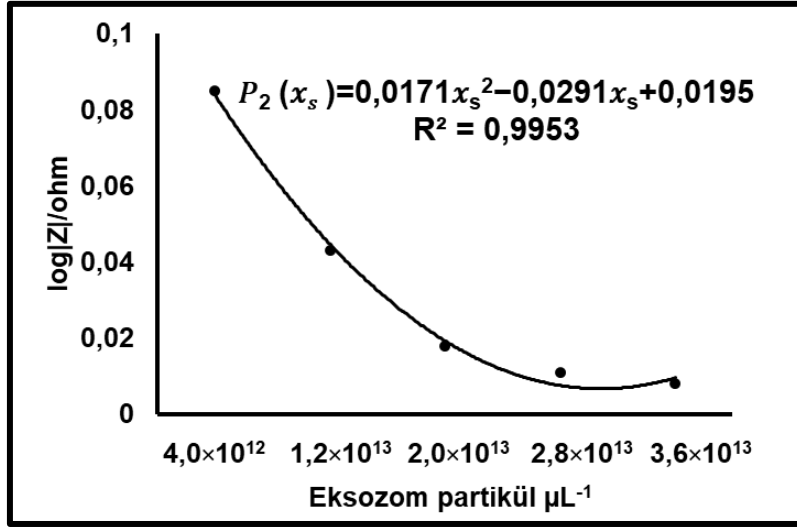
Üstel fonksiyonların tüm reel sayılar için tanımlı olması ve hiçbir zaman sıfır olmaması ve türevlerinin kendilerini içermesi nedeniyle türevleri de asla sıfır olmamaktadır. Özellikle, $P_1''(x)$ asla sıfır veya tanımsız değildir. Bu nedenle, ($P_1'(4,0 \times 10^{12})$ ve $P_1'(3,6 \times 10^{13})$) uç noktaları aşağıdaki gibi değerlendirilerek maksimum mutlak eğimdeki nokta belirlenmiştir:

$$|P_1'(4,0 \times 10^{12})| = 5,3751E - 15 \text{ (maksimum)}$$

$$|P_1'(3,6 \times 10^{13})| = 5,7223E - 16$$

Ayrıca, Denklem 3'den, $LOD = 3,64 \times 10^{12} \text{ eksozom partikül } \mu L^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Elde edilen 0,9902 regresyon değeri 0,9900 sınır değerine yakın olmasına rağmen daha doğru sonuçlar elde etmek için doğrusal olmayan başka bir denklem düşünülmüştür.

Doğru bir polinom modeli, eğrideki bükülme sayısı kullanılarak belirlenebilir ve bir kalibrasyon grafiğindeki bükülme sayısı, n , bir polinom fonksiyonunun grafiğini, LOD ve LOQ değerlerinin türetilmesini belirlemek için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, en iyi uydurma yöntemi genellikle $(n+1)$ dereceli polinom fonksiyonu olarak bulunur; örneğin, bir büküm için ikinci dereceden polinom modeli, iki büküm için ise kübik polinom modeli kullanılır [163]. Bununla birlikte, karmaşık bir modelin kullanımı, doğrusal bir fonksiyondan birine kıyasla, konsantrasyon ve sinyal ilişkisini gözlemlemede zorluk oluşturmaktadır. Tez çalışmasının verilerinde bir bükülme olduğu varsayılarak ikinci dereceden terim, Şekil 4.10'daki doğrusal olmayan modele yerleştirildi.



Şekil 4.10. Veri noktalarının ikinci dereceden polinom fonksiyonu kullanılarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi

X ekseninde yer verilen eksozom partikül değerleri yüksek olduğundan, önceki iki durumdan farklı olarak, en iyi ikinci dereceden polinomun (ve daha sonra kübik polinomun) yapımında katsayıları bulmada bazı problemlerle karşılaşmıştır. Bu sorunun üstesinden gelmek için, MATLAB yazılımında değerler ölçeklendirerek *polyfit* komutu kullanılmıştır ve aşağıdaki (ölçeklendirilmiş) polinom fonksiyonu elde edilmiştir:

$$P_2(x_s) = 0,0171x_s^2 - 0,0291x_s + 0,0195,$$

Burada x'in ölçeklenmiş değeri şu şekilde hesaplanır:

$$x_s = \frac{x - 2 \times 10^{13}}{1,2649 \times 10^{13}}$$

LOD'nin belirlenmesinde kullanılan standart sapma, Eş. 4.2 ile en iyi parabolden $s=0,00222$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca önceki modelde bahsedildiği gibi kalibrasyon eğrisinin eğimi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$P_2'(x_s) = 7,9058 \times 10^{-14}(0,0342 x_s - 0,0291),$$

$$P_2''(x_s) = \frac{0,0342}{(1,2649 \times 10^{13})^2}.$$

İkinci türev sıfırdan farklı bir sabit olduğundan, en büyük mutlak eğim, yalnızca çalışılan aralığın en yüksek ve en düşük konsantrasyon değerleri olan uç noktalarında meydana gelmiştir. Böylece en büyük mutlak eğim değeri aşağıda belirtildiği şekilde elde edilmiştir:

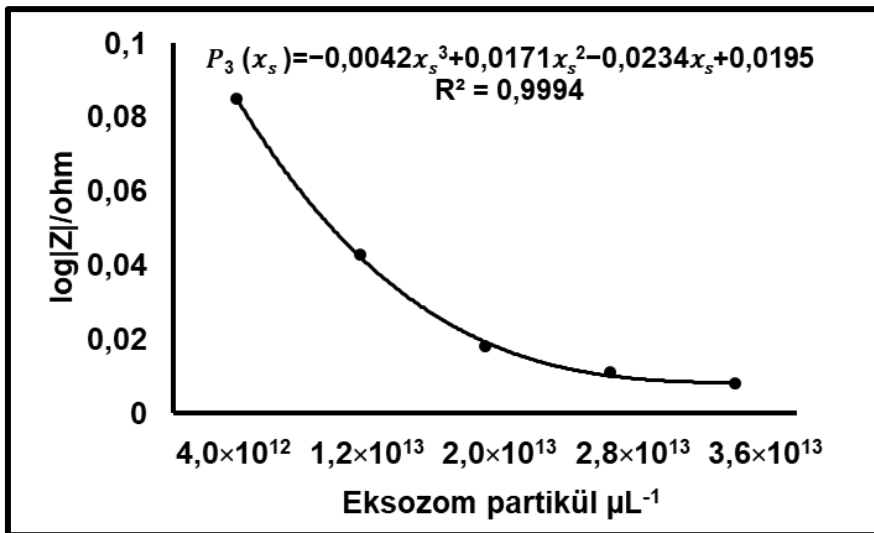
$$|P_2'(4,0 \times 10^{12})| = 5,721 \times 10^{-15} \text{ (maksimum)}$$

$$|P_2'(3,6 \times 10^{13})| = 1,119 \times 10^{-15}$$

Ayrıca Eş. 4.3 kullanılarak en iyi ikinci dereceden polinom için LOD hesaplanmıştır:

$$LOD = 1,28 \times 10^{12} \text{ eksozom partikül } \mu\text{L}^{-1}$$

Kalibrasyon katsayısı R^2 ikinci dereceden polinom modelinde, önceki modellere göre daha makul bir değer olan 0,9953 olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte daha yüksek dereceli bir polinom modelinin daha iyi bir uyum sağlayacağı düşünülmüştür ve bu nedenle kübik polinom modeli, veri noktalarının oluşturduğu eğride iki büküm varsayılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11'de kalibrasyon eğrisi için en iyi kübik polinom fonksiyonu yerleştirildi:



Şekil 4.11. Veri noktalarının üçüncü dereceden polinom fonksiyonu kullanılarak değerlendirilmesine ait kalibrasyon eğrisi

Yukarıda bahsedildiği gibi, MATLAB'daki ölçekleme seçeneği ile *polyfit* komutu en iyi kübik polinom fonksiyonunu gösterdi.

$$P_3(x_s) = -0,0042x_s^3 + 0,0171x_s^2 - 0,0234x_s + 0,0195,$$

Burada x 'in ölçeklenmiş değeri şu şekilde hesaplanmıştır: $x_s = \frac{x-2 \times 10^{13}}{1,2649 \times 10^{13}}$.

Bu kübik polinom fonksiyonunun kalibrasyon katsayısı, elde edilen veriler için neredeyse mükemmel regresyona işaret eden $R^2 = 0,9994$ değeriyle hesaplanmıştır. LOD hesaplaması için standart sapma $s=0,000811$ olarak hesaplanarak aşağıdaki fonksiyonlar elde edilmiştir:

$$P_3'(x_s) = 7,9058 \times 10^{-14} \times (-0,0126x_s^2 + 0,0342x_s - 0,0234),$$

$$P_3''(x_s) = 6,2501 \times 10^{-27} \times (-0,0252x_s + 0,0342).$$

Böylece, $P_3''(x_s)$ sıfıra eşit olduğunda x_s aşağıda belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$x_s = 1,3571, \text{ ya da } x = 3,7167 \times 10^{13}.$$

Görüldüğü üzere, bu değer x değerleri için belirtilen $[4,0 \times 10^{12} - 3,6 \times 10^{13}]$ aralığının dışında kalmaktadır. Dolayısıyla, $P_3'(x_s)$ bu noktada maksimum eğim olamaz. Bu yüzden, aralığın bitiş noktalarında yalnızca aşağıdaki eğim değerleri dikkate alınmıştır:

$$|P_3'(4,0 \times 10^{12})| = 6,8638 \times 10^{-15} (\text{maksimum}),$$

$$|P_3'(3,6 \times 10^{13})| = 2,3723 \times 10^{-17}.$$

Ayrıca, LOD Eş.4.3 kullanılarak $3,90 \times 10^{11}$ eksozom partikül μL^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Matematiksel olarak, doğrusal olmayan fonksiyon modelleri doğrusal olmayan veri noktaları için çok daha uygun olmasına rağmen, bu modeller sensör uygulamalarında nadiren kullanılmaktadır. Çizelge 4.3'deki sonuçlara göre, Colo 320 hücre hatlarından izole edilen eksozomların belirlenmesi çalışması için kalibrasyon eğrisinin en yüksek kalibrasyon katsayısı ($R^2=0,9994$) ve en düşük standart sapma değeri ($s=0,000811$) kübik polinom modelinden hesaplandığı görülmektedir.

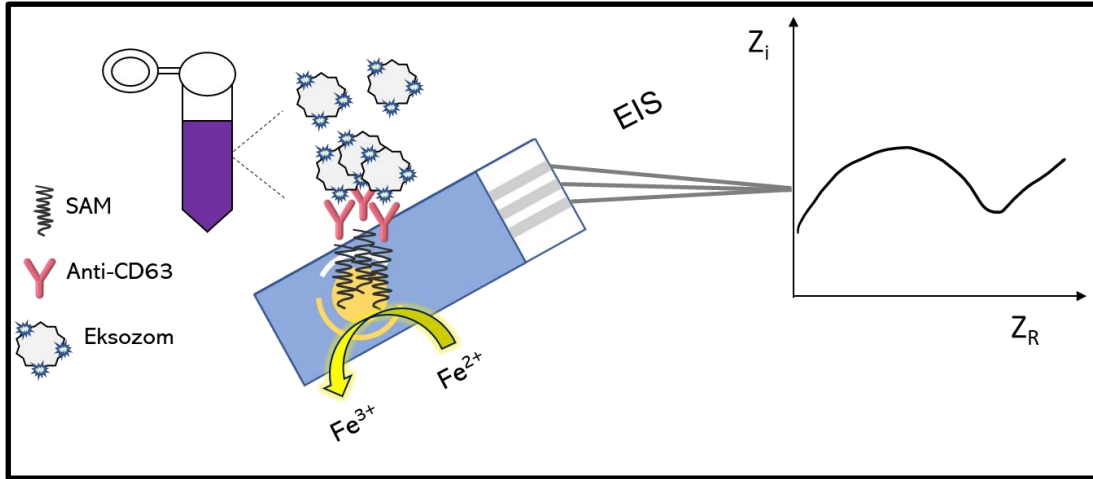
Çizelge 4. 3. Farklı yöntemlerin eğri uydurma etkinliğinin karşılaştırılması

Denklem Yöntemleri	Kalibrasyon Katsayısı 'R ² '	Standart Sapma 's'	LOD Eksozom partikül μL^{-1}
$y = -2 \times 10^{-15}x + 0,0795$	0,8351	0,01517	$2,50 \times 10^{13}$
$y = P_1(x) = 0,1032e^{-8E-14x}$	0,9902	0,00592	$3,64 \times 10^{12}$
$y = P_2(x_s) = 0,0171x_s^2 - 0,0291x_s + 0,0195$	0,9953	0,00222	$1,28 \times 10^{12}$
$y = P_3(x_s) = -0,0042x_s^3 + 0,0171x_s^2 - 0,0234x_s + 0,0195$	0,9994	0,000811	$3,90 \times 10^{11}$

4.2. Ticari Eksozom Örneklerinin Ekran Baskılı Altın Elektrot ile Tayini

4.2.1. Cihaz üretimi

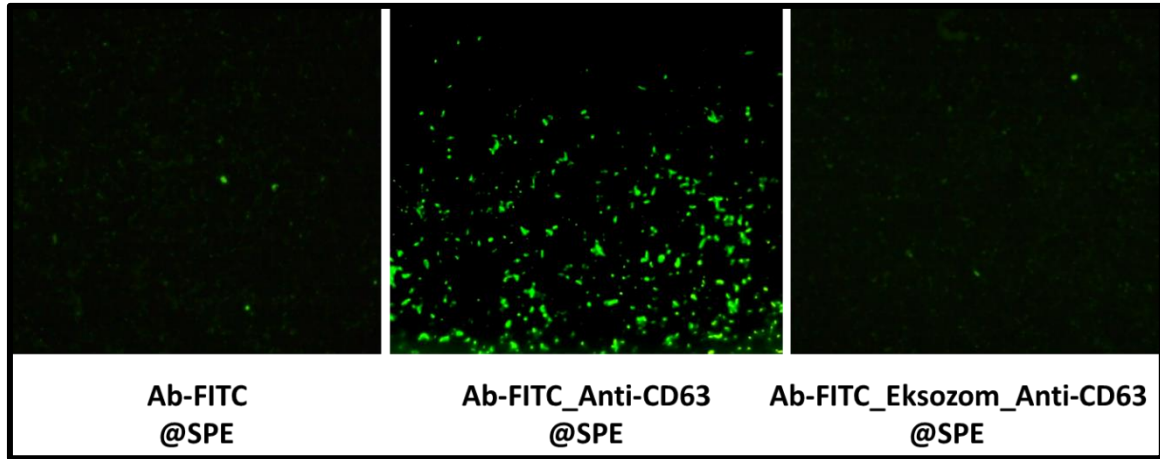
Çalışmanın bu kısmında, SPE'lerin yüzey modifikasyonu ilk olarak MUA ile yapılmıştır. Tiyol (-SH) grupları, SPE'nin çıplak altın WE yüzeyi ile etkileşime girmiştir ve Kendiliğinden Düzenlenmiş Tek Katmanlı Tabaka (SAM) oluşturmuştur. Bir sonraki adımda, MUA-SAM ile hazırlanmış SPE, karboksil (-COOH) ve amin (-NH₂) grupları aracılığıyla Anti-CD63 antikoru ile konjuge edilmiştir. Anti-CD63'ün karboksil fonksiyonel dönüştürücüye kovalent immobilizasyonu, EDC/NHS birleştirme ajanları ile gerçekleştirilmiştir. Böylece, geliştirilen immünosensör, standart eksozomların CD63 yüzey antijenine karşı oldukça duyarlı hale gelmiştir. Sensöre ait çalışma mekanizması Şekil 4.12'de gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Ekran baskılı altın elektrot ile eksozom tayinine yönelik şematik gösterim

4.2.2. SPE'lerin floresans mikroskop görüntüleri

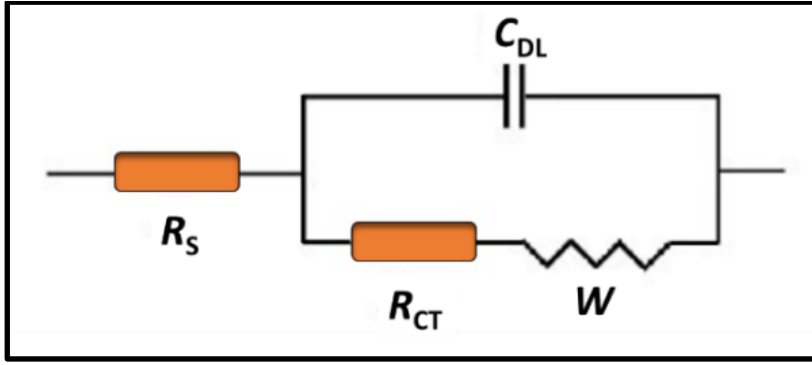
FITC molekülü 495 nm'de bir uyarma spektrumuna sahiptir [164]. Dönüştürücü yüzeyine eksozom bağlanmasını kanıtlamak için bir immüno floresan tahlili yapılmıştır. Bu amaçla, anti-CD63'e özgü FITC-fonksiyonel sekonder antikor kullanılmıştır. Floresan görüntüleme sağlamak için, üç farklı SPE immünoassay prosedürünün farklı aşamalarında Ab-FITC ile etiketlenmiştir. Ab-FITC@SPE'nin temel amacı, Ab-FITC'nin altın yüzeyine olan afinitesini incelemek ve spesifik olmayan etkileşimlerin oranını belirlemektir. Ab-FITC'nin bağlanabileceği yüzeyde Anti-CD63 antikoruna olmadığından, Resim 4.1A'da gösterildiği gibi düşük floresan yoğunluğu elde edilmiştir. Diğer yöntem ile hazırlanan Ab-FITC_Anti-CD63@SPE üzerinde Anti-CD63 bulunduğu için, Ab-FITC, SPE'nin WE yüzeyine yüksek afinite göstermiştir ve gözlemlenen yüksek floresan yoğunluğu, yüksek etkileşimin kanıtı olarak kabul edilmiştir (Resim 4.1B). Ab-FITC_Eksozom_Anti-CD63@SPE için ise eksozom inkübasyonundan sonra yüzeyde serbest Anti-CD63 kalmadığından, bu durum Ab-FITC'nin yüzeye bağlanamamasına neden olmuştur. Eksozomların biyosensör yüzeyine bağlanması Resim 4.1C'deki floresan yoğunluğundaki azalma ile açıklanmaktadır.



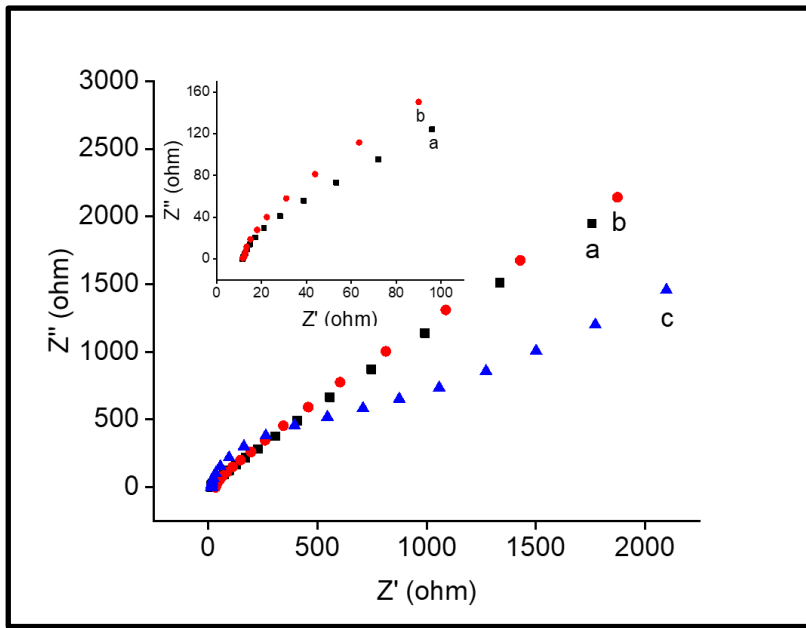
Resim 4.1. SPE'lerin floresan mikroskop görüntüleri: (a)Ab-FITC@SPE, (b) Ab-FITC_Anti-CD63@SPE ve (c) Ab-FITC_Eksozom_Anti-CD63@SPE

4.2.3. SPE biyosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu

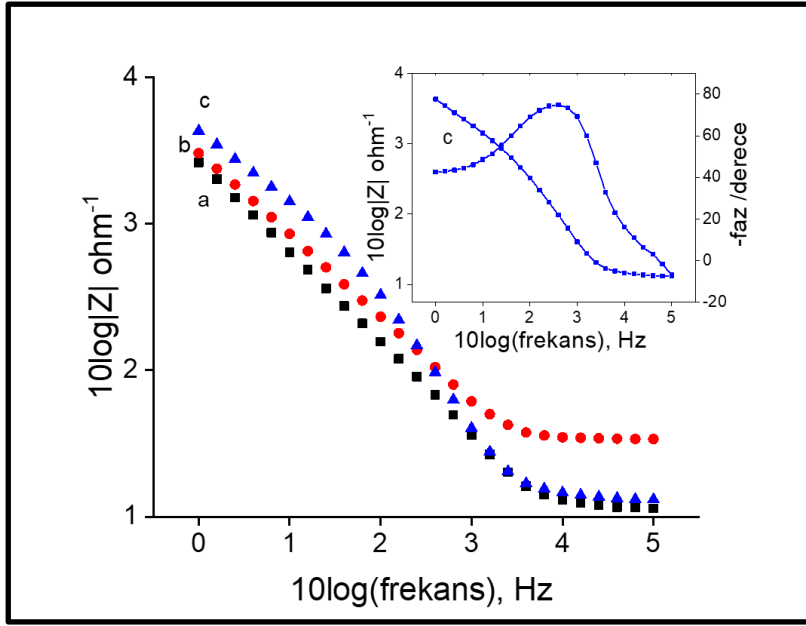
EIS, yüzey modifiye elektrotların arayüz özelliklerini araştırmak için en etkili yöntemlerden biridir ve özellikle immünosensörler alanında kapsamlı çalışmalar yapılmıştır [32, 40]. Bu çalışmada, biyosensörlerin impedans spektrumları Nyquist ve Bode diyagramları olarak sunulmuştur. Tipik bir immün sensörünün Faradayik impedans ölçümü, yarım daire ve ardından düz bir çizgiye sahiptir. Warburg ile ifade edilen bu düz çizgi cevabı nedeniyle R_{CT} değeri, $R_s(C_{DL}(R_{CT}W))$ eşdeğer devresi kullanılarak hesaplanmıştır. Eşdeğer devre sırasıyla çözelti direncini (R_s), Warburg impedans elemanını (W), çift katmanlı kapasitansı (C_{DL}) ve elektron transfer direncini (R_{CT}) içerir [165, 166] ve eşdeğer devre Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Şekil 4.14, 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (10 mM PBS pH 7,4 ve 0,1 M KCl içeren bir çözelti) varlığında +0,1 V potansiyelde elde edilen eksozom immünosensörünün tipik EIS spektrumlarını göstermektedir. MUA tek tabakasının oluşumundan ve dönüştürücü yüzeyinde anti-CD63 konjugasyonundan sonra, R_{CT} $9,6 \pm 0,2$ (BSS%, 2,25%) ohm'dan $75,1 \pm 2,9$ (BSS%, 1,%) ohm'a yükseldi. Bu sonuç, MUA tek tabakasının oluşumunun ve antikör yalıtım filminin bağlanması, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 'nin modifiye elektrota elektron transferini kısmen bloke ettiğini göstermiştir. Bu çalışmada, çalışma elektrotunun yüzeyindeki bağlı analitin miktarını temsil etmesi için yük transfer direnci (R_{CT}) kullanılmıştır. Elektrotların CV ölçümleri de bu sonuçlarla uyumludur ve çıplak SPE, Anti-CD63@SPE ve Exosome_Anti-CD63@SPE ($3,7 \times 10^8$ eksozom partikül mL^{-1}) ile elde edilen CV ölçümlerinin sonuçları Şekil 4.16'da sunulmuştur. Her bir elektroda ait anodik ve katodik akımlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.



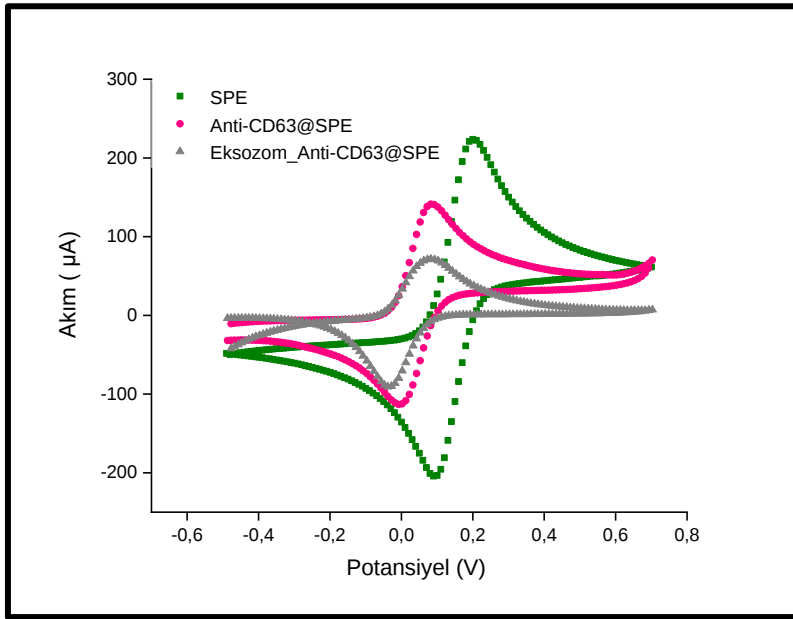
Şekil 4.13. EIS ölçümlerinin simülasyonunda kullanılan R(C(RW)) elektrik devresi



Şekil 4.14. +0,1 V'luk bir potansiyelde immünosensör için Nyquist diyagramı. (a) Çıplak SPE, (b) Anti-CD63@SPE, (c) Eksozom_Anti-CD63@SPE, $3,7 \times 10^8$ eksozom partikül mL^{-1} SPE ile immünreaksiyonu. Veriler 10^5 ila 1 Hz frekans aralığında kaydedilmiştir. İç metin: Eğrilerin büyütülmüş bir süperpozisyonudur.



Şekil 4.15. +0,1 V'luk bir potansiyelde immünosensör için Bode diyagramı. (a) Çıplak SPE, (b) Anti-CD63@SPE, (c) Eksozom_Anti-CD63@SPE, $3,7 \times 10^8$ eksozom partikül mL^{-1} SPE ile immünreaksiyonu. İç metin: $3,7 \times 10^8$ eksozom partikülleri mL^{-1} ile immünreaksiyondan sonra SPE için Bode diyagramı ve faz grafiği



Şekil 4.16. SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin döngüsel voltamogramları (ölçümler 50 mV s^{-1} 'de ve 0,1 M KCl, 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren elektrolit kullanılarak alınmıştır.)

Çizelge 4.4. SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin CV tekniği ile ölçülen anodik ve katodik pik akımlarının ortalama değerleri (n=3)

Elektrotlar	I_a (μA)	I_c (μA)
SPE	203,38 $\pm$ 15,82 (BSS%, 7,78%)	97,27 $\pm$ 6,45 (BSS%, 6,63%)
Anti-CD63@SPE	128,71 $\pm$ 2,46 (BSS%, 1,91%)	62,85 $\pm$ 6,25 (BSS%, 9,95%)
Eksozom_Anti-CD63@SPE	111,23 $\pm$ 15,04 (BSS%, 13,52%)	60,50 $\pm$ 7,50 (BSS%, 12,39%)

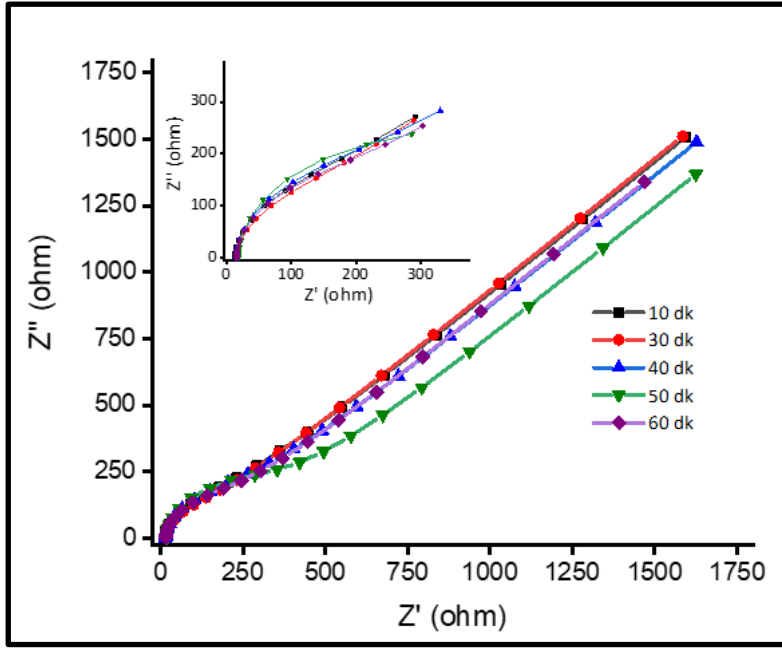
SPE'lerin yüzey modifikasyon işlemi, Şekil 4.15'de ayrıca Bode çizim formatında sunulmuştur. Bode grafiği, hem Z (Ohm) olarak tanımlanan toplam impedansı hem de belirli bir spektrumun frekanslarının (log frek) logaritmalarına göre derece kaymaları cinsinden faz açısını içerir [167]. Öncelikle gerçek impedans ölçümlerinin logaritmik değerlerinin Çizelge 4.4'de gösterildiği gibi kullanılması amaçlanmıştır. R_{CT} değerlerine en iyi korelasyonu Log 0 frekansındaki gerçek impedans ölçümü göstermiştir. R_{CT} 'deki artışa benzer şekilde, anti-CD63'ün ve $3,7 \times 10^8$ eksozom partikül mL^{-1} konsantrasyonunda eksozomların yüzeye bağlanması ile Çizelge 4.5'deki değerlerde artışı gözlemlenmiştir. Log 0 frekansındaki logaritmik impedans verileri analiz edilmiştir ve çıplak SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE için sırasıyla 3,418, 3,481 ve 3,634 sonuçları elde edilmiştir. Öte yandan, modifikasyon aşamalarından sonraki artış, Log 1 ve Log 2 frekans değerleri ile de tutarlıdır.

Çizelge 4.5. SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63@SPE'nin logaritmik reel impedans verileri (n=3)

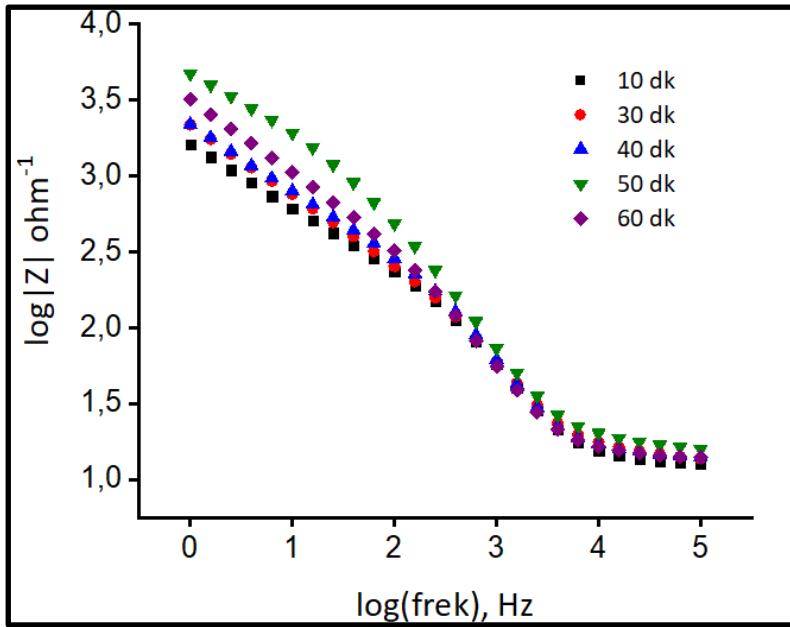
10log(frek)Hz)	SPE 10log Z ohm ⁻¹	Anti- CD63@SPE 10log Z ohm ⁻¹	Eksozom_Anti- CD63@SPE 10log Z ohm ⁻¹
0	3,418±0,099 (BSS%, 2,90%)	3,481±0,214 (BSS%, 6,15%)	3,634±0,126 (BSS%, 3,47%)
1	2,806±0,080 (BSS%, 2,85%)	2,930±0,157 (BSS%, 5,36%)	3,151±0,091 (BSS%, 2,89%)
2	2,195±0,044 (BSS%, 2,01%)	2,365±0,052 (BSS%, 2,20%)	2,513±0,021 (BSS%, 0,84%)

4.2.4. İnkubasyon süresi ve anti-CD63 konsantrasyonunun optimizasyonları

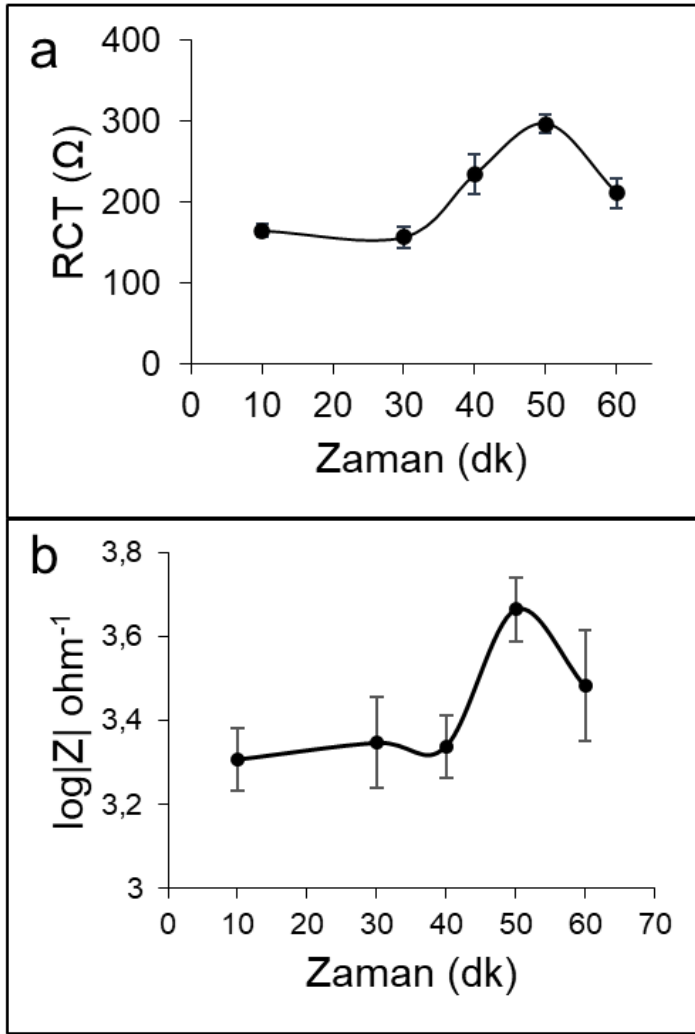
Eksozomların kuluçka süresi, testin kalitesini belirlemede çok önemli bir faktördür. İnkübasyon süresi yetersizse, eksozomlar antikora tam olarak bağlanamaz. İnkübasyon süresinin uzun olması durumunda da spesifik olmayan adsorpsiyon gelişebilmekte ve bu durumda sonuçları etkileyebilmektedir. Çalışmamızın bu kısmında eksozomlar 10, 30, 40, 50 ve 60 dakika Anti-CD63@SPE'ler ile inkübe edilmiş ve optimizasyon sonuçları Nyquist ve Bode diyagramları ile sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de sunulmuştur. Bu grafikler Şekil 4.19'da detaylı olarak değerlendirilmiştir. Hem en yüksek R_{CT} hem de logaritmik (0) gerçek impedans değerleri göz önüne alındığında en iyi bağlanma süresinin 50 dakika olduğu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.17. İnkubasyon süresinin optimizasyonu için Nyquist diyagramı



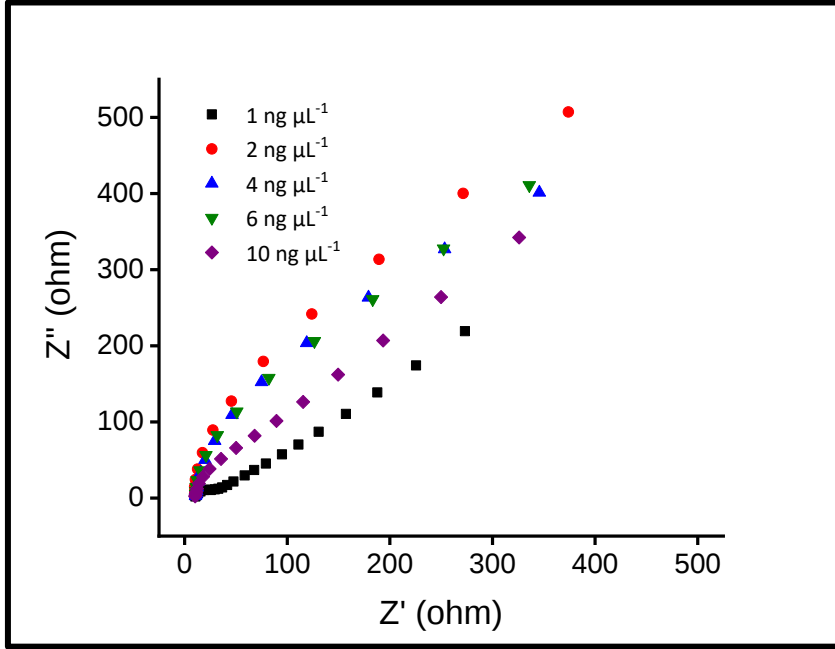
Şekil 4.18. İnkubasyon süresinin optimizasyonu için Bode diyagramı



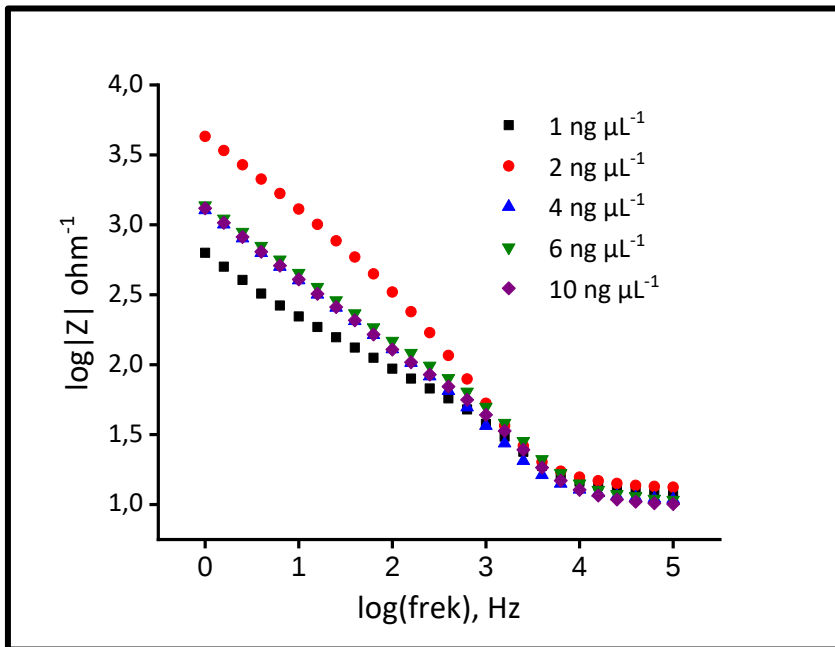
Şekil 4.19. İnkübasyon süresi optimizasyonu, (a) Nyquist Plot (b) Bode Diyagramından elde edilen gerçek impedansların logaritma (0) değerleri

Antikörün dönüştürücü yüzeyine bağlanması, karboksil ve amino gruplarının dehidrasyon hızına bağlıdır. Yüzeydeki karboksil gruplarının sayısı bilinmediğinden, karşılık gelen antikör konsantrasyonu, farklı derişimdeki antikörlerin yüzeye uygulanması ve ardından eksozom numunesi ile inkubasyonları ile belirlenmiştir. Anti-CD63 konsantrasyonunun optimizasyonu için Nyquist ve Bode diyagramları sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de sunulmuştur. Şekil 4.22 a ve b'de gösterildiği gibi R_{CT} ve logaritmik gerçek impedans ($\log 0$) değerlerindeki kabul edilebilir artışla belirlenmiştir. Antikör konsantrasyonu kademeli olarak $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 'den $2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 'e yükselirken, R_{CT} 'de 31 ± 0.17 'den $220 \pm 14 \Omega$ 'a önemli bir artış gözlemlenmiştir. Antikör konsantrasyonu $4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 'den $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 'e artarken, R_{CT} ve gerçek impedans değerleri önce azalmış ve ardından farklılaşma gözlenmemiştir. Bu nedenle, eksozomların antikörlere bağlı olduğu ve dönüştürücü

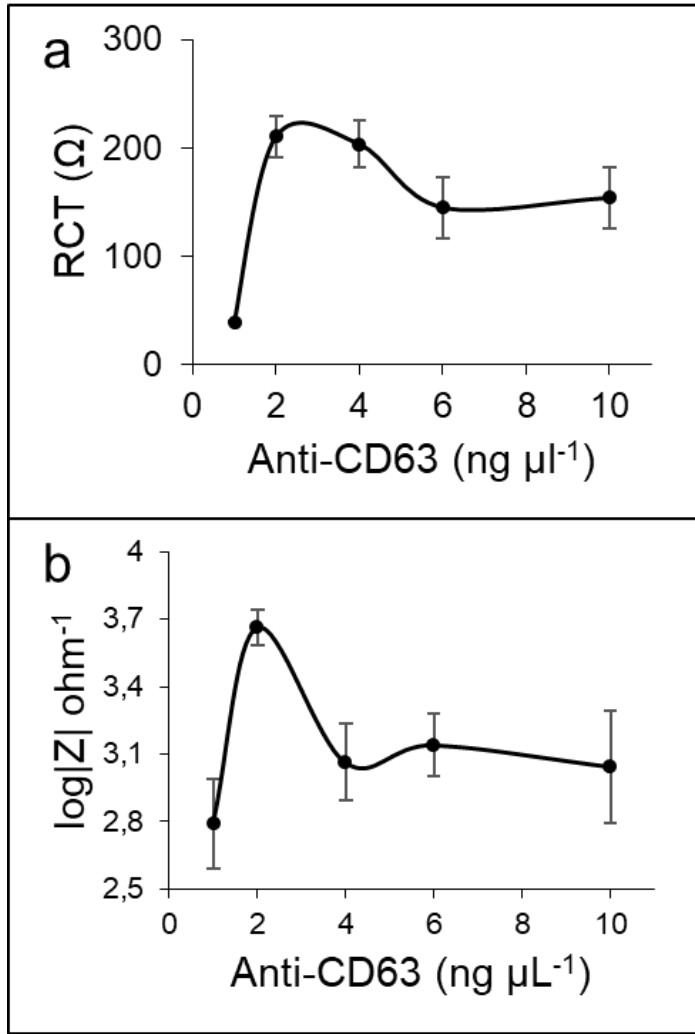
yüzeyinin $2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ anti-CD63 konsantrasyonunda doygunluğa yakın olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Anti-CD63 derişim optimizasyonu için Nyquist diyagramı



Şekil 4.21. Anti-CD63 derişimi optimizasyonu için Bode diyagramı

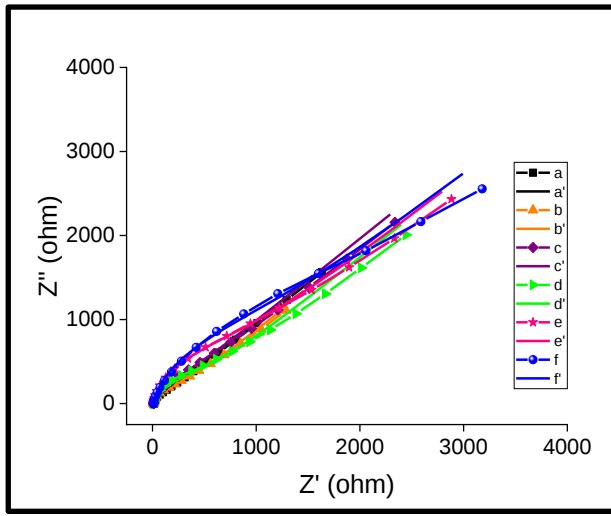


Şekil 4.22. Anti-CD63 konsantrasyonunun ($3,7 \times 10^5$ eksozom mL^{-1}) optimizasyonu, (a) Nyquist Plot (b) Bode Diyagramından gerçek impedansların logaritma (0) değerleri

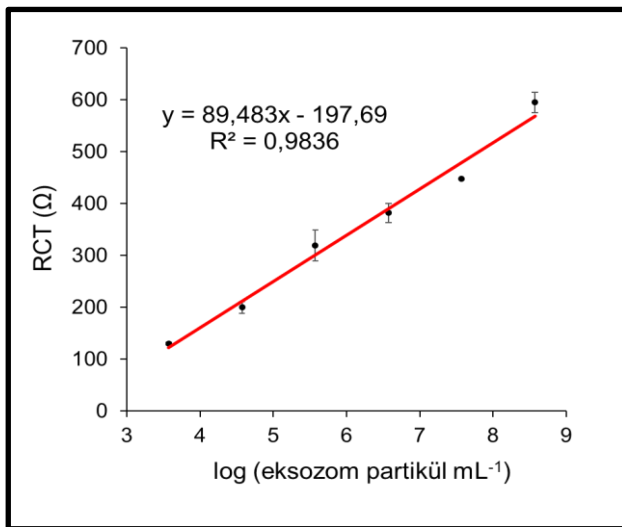
4.2.5. SPE biyosensörünün analitik performansı

SPE biyosensörünün analitik performansı, farklı konsantrasyonlardaki standart eksozomların sabit süre boyunca inkübe edilmesiyle belirlenmiştir. Her bir standart konsantrasyonun inkübasyonundan sonra $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunun elektrokimyasal sinyalleri kaydedilerek izlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi, eksozom derişiminin logaritmasına karşı impedans sinyali olarak kaydedilmiştir. Eksozom derişiminin artmasıyla, eksozomlar elektron akısına çok fazla direnç göstererek impedans değerini arttırmışlardır. Böylelikle, veziküllerin yalıtkan özelliklerinden dolayı en yüksek impedans, $3,7 \times 10^8$ eksozom içeren numune için gözlemlenmiştir. Farklı eksozom konsantrasyonlarına sahip immünosensör için EIS ölçümleri Şekil 4.23’de gösterilmiştir. R_{CT} değerlerinin, $3,7 \times 10^3$ ila $3,7 \times 10^8$

eksozom parçacık mL^{-1} gibi geniş konsantrasyon aralığında doğrusal artışı Şekil 4.24'te sunulmuştur. Lineer regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $y = 89,483x - 197,69$ ve 0,9836 olarak elde edilmiştir. Tespit Sınırı (LOD), verilerin lineer çizgiden sapması kullanılarak $2,0 \times 10^3$ parçacık mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinde kullanılan tüm veriler Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın analitik performanslarını yakın zamanda geliştirilen eksozom deneyleriyle karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.6'de belirtildiği gibi, geliştirilen eksozom biyosensörü yüksek hassasiyet ve geniş lineer aralığa sahiptir.



Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarına eksozom uygulanan immünosensörler için EIS ölçümleri (a'dan f'ye, eksozomların konsantrasyonları $3,7 \times 10^3$, $3,7 \times 10^4$, $3,7 \times 10^5$, $3,7 \times 10^6$, $3,7 \times 10^7$ ve $3,7 \times 10^8$ partikül mL^{-1}) ve kesme işareti (') ölçümlerin simülasyon verilerini göstermektedir.



Şekil 4.24. Eksozom tayini için kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.6. Geliştirilen eksozom biyosensörünün analitik cevapları

Eksozom partikül mL ⁻¹	3,74×10 ³	3,74×10 ⁴	3,74×10 ⁵	3,74×10 ⁶	3,74×10 ⁷	3,74×10 ⁸
R _{CT} (Ω)	132,7	205	279,8	400,3	447,6	603,5
	130,2	184,6	352,0	357,4	449,1	568,6
	126,7	210,5	327,0	390,4	445,8	613,9
$\bar{x}$	129,9	200,0	319,6	382,7	447,5	595,3
SS	2,5	11,1	29,9	18,3	1,4	19,4
BSS, %	1,89	5,57	9,36	4,79	0,30	3,25

R_{CT} değerleri, her derişim için üç kopya olarak halinde ölçülmüştür ve sinyallerin veri analizi, Microsoft Excel kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen Standart Hatadan (SE) $SD=SE \times \sqrt{N}$ formülü ile Standart Sapma (SS) hesaplanmıştır (N, test sayısı olarak temsil edilir). LOD, $LOD=3,3 \times SD/m$ formülüne göre kalibrasyon denkleminin eğim değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen ekzosom tayin yöntemi ve mevcut sistemler Çizelge 4.7’de karşılaştırılmıştır. Elde edilen LOD değeri literatürdeki diğer sistemlerle elde edilen değerle kıyaslandığında literatürdeki birçok çalışmadan daha düşük bir LOD elde edilmiştir.

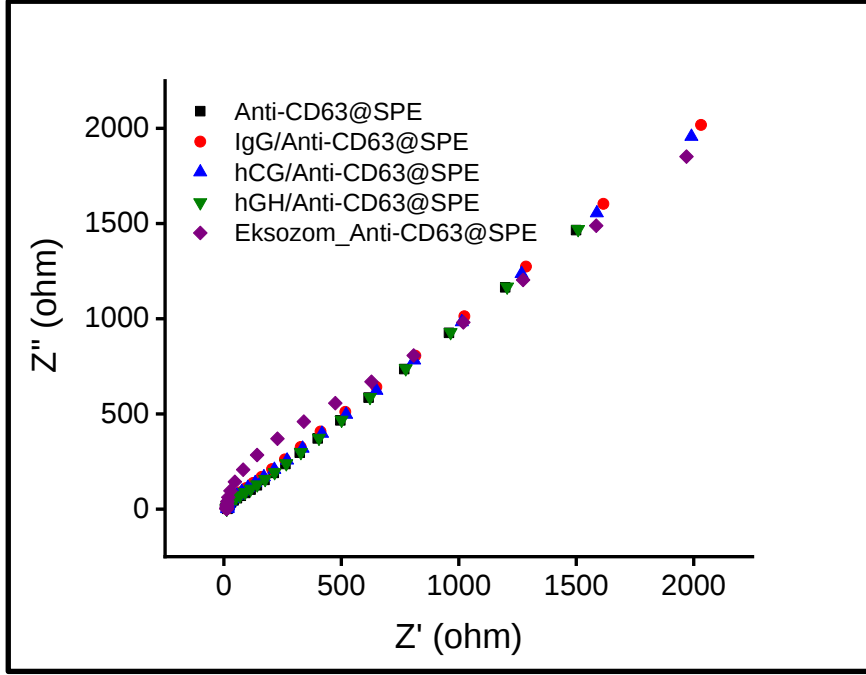
Çizelge 4.7. Literatürdeki mevcut eksozom tayinlerinin analitik performansları ve geliştirilen yöntem ile karşılaştırılması

Uygulanan Teknikler	Doğrusal Aralık	LOD
İmpidimetrik [41]	10^2-10^9 eksozom mL^{-1}	77 eksozom mL^{-1}
Kolorimetrik [168]	10^2-10^8 eksozom mL^{-1}	10^2 eksozom mL^{-1}
Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi [169]	$5,44 \times 10^2 - 2,72 \times 10^4$ eksozom mL^{-1}	$5,44 \times 10^2$ eksozom mL^{-1}
Diferensiyel puls voltametrisi [170]	$7,61 \times 10^4 - 7,61 \times 10^8$ eksozom mL^{-1}	$4,39 \times 10^3$ eksozom mL^{-1}
İmpidimetrik [40]	$50 \times 10^{-12} - 200 \times 10^{-9}$ M	$1,9 \times 10^5$ eksozom mL^{-1}
UV [171]	$0,4 \times 10^8 - 6,0 \times 10^8$ eksozom mL^{-1}	$3,58 \times 10^6$ eksozom mL^{-1}
Geliştirilen eksozom tayin yöntemi	$3,7 \times 10^3 - 3,7 \times 10^8$ eksozom mL^{-1}	$2,0 \times 10^3$ eksozom mL^{-1}

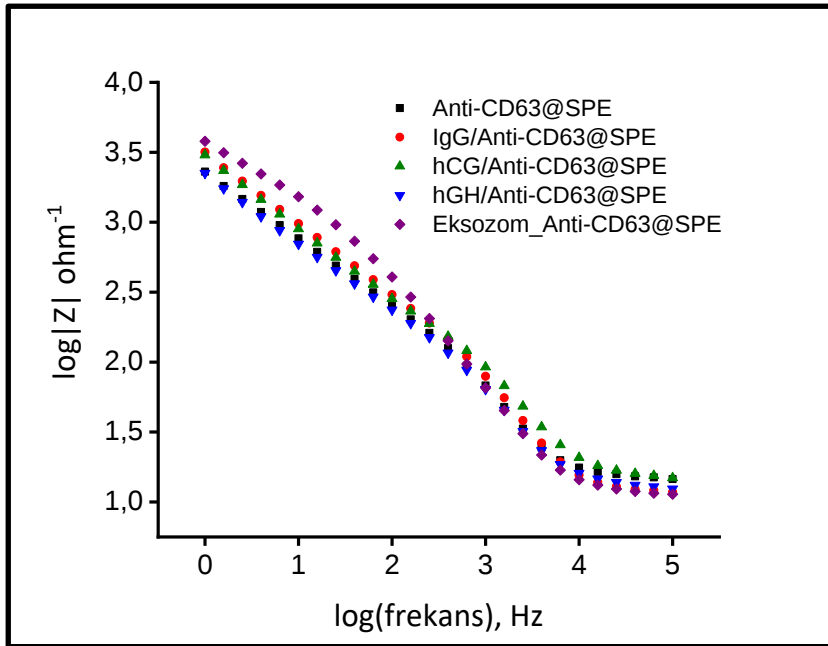
4.2.6. Seçicilik çalışması

Geliştirilen biyosensör sisteminin seçiciliği, Anti-CD63@SPE için farklı tipte proteinler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen R_{CT} (Şekil 4.25) ve frekans 0'daki ($\log 0$) (Şekil 4.26) gerçek impedans sonuçları, eksozomlara karşı anti-CD63 modifiye SPE'nin verileriyle karşılaştırılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.27'de sunulmuştur. Biyosensörün seçiciliğini test etmek için, potansiyel interferanlar olarak $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ insan koryonik gonadotropin (hCG), immünoglobulin G (IgG) ve insan büyüme hormonu (hGH) daha önce bahsedilen inkübasyon prosedürü ile ayrı ayrı inkübe edildi. Eksozomların ve diğer antijenlerin Anti-CD63@SPE biyosensörüne bağlanması ayırt edilebilir olduğundan, gerçek impedans değerindeki farklılık nedeniyle $\log 0$ 'ı seçtik. Önerilen Anti-CD63@SPE, önemli bir R_{CT} farkı ile standart eksozomlara karşı mükemmel hassasiyet ve seçicilik

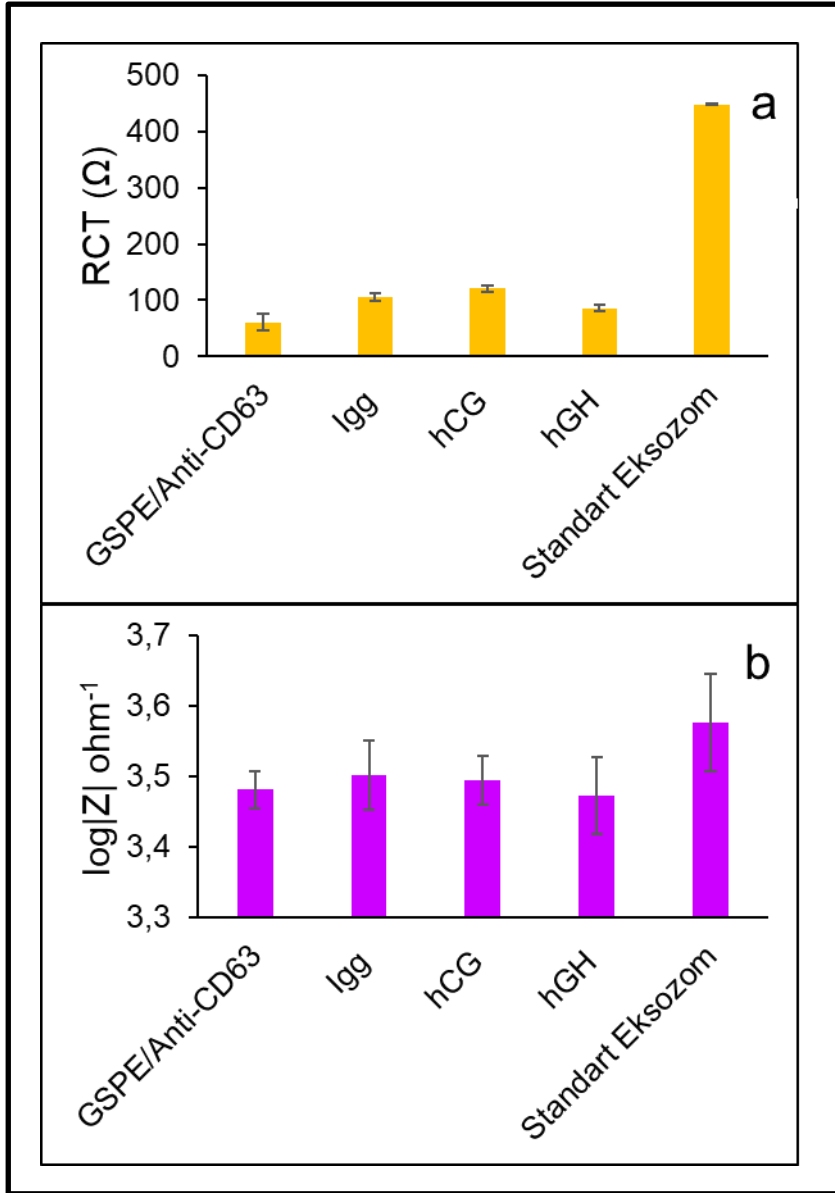
sağlamıştır. Uygulanan proteinler, kalibrasyon eğrisinde herhangi bir eksozom konsantrasyonu ile örtüşmemiştir. Ayrıca, Anti-CD63@SPE'nin eksozomla ilişkisi, gerçek impedansın logaritmik değerleriyle de gösterilmiştir. Diğer antijenler uygulandığında log0'daki gerçek impedans değerlerinde kayda değer bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.25. Biyosensörün seçicilik çalışması için Nyquist diyagramı



Şekil 4.26. Biyosensörün seçicilik çalışması için Bode diyagramı

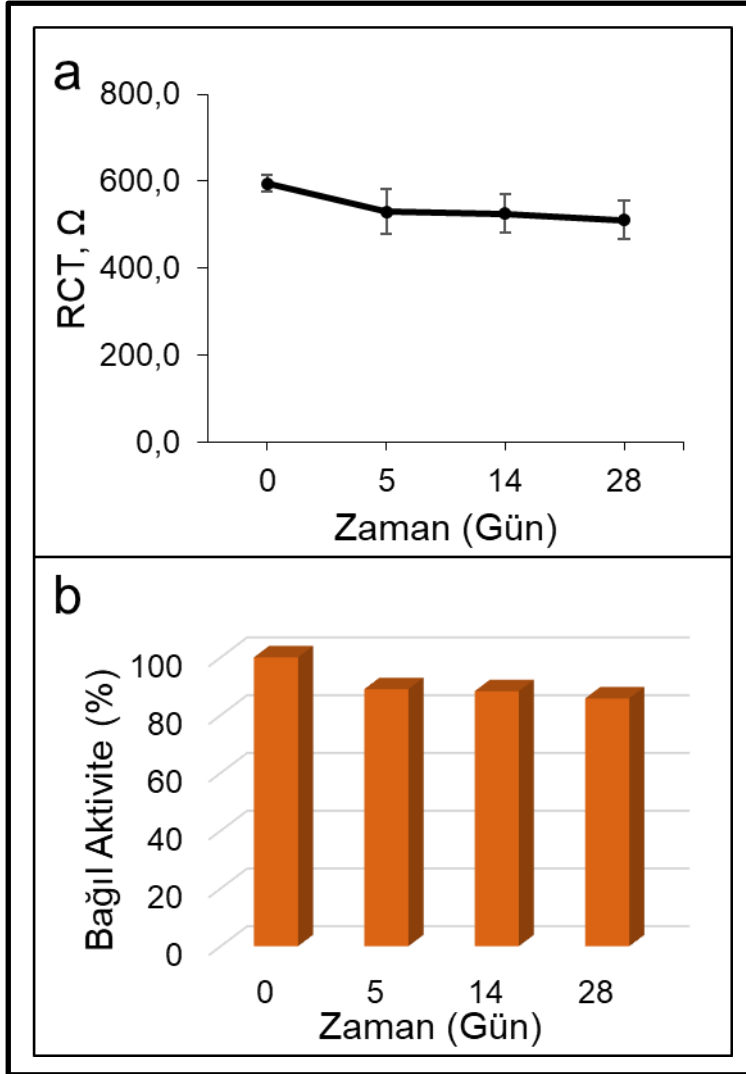


Şekil 4.27. R_{CT} (a) ve 1 frekansındaki ($\log 0$) gerçek impedans (b) değerine sahip anti-CD63@SPE biyosensörünün IgG, hCG, hGH ve $3,7 \times 10^7$ partikül mL^{-1} standart eksozomlarına karşı cevaplarının karşılaştırmalı tespiti

4.2.7. GSPE için stabilite çalışması

Sensörlerin üretiminde antikorlar ve diğer proteinlerin stabilizasyonu, raf ömrü gibi bir dizi uygulama alanı için büyük önem taşımaktadır. Bu parametre, zamanla bozulan kararsız malzemelerin ticarileştirilmesi için hayati önem taşır. Özellikle, tek kullanımlık atılabilir biyosensörlerin imalatında raf stabilitesi önemli bir kriterdir. Bu nedenle geliştirilen eksozom biyosensörleri buzdolabında 28 gün boyunca bekletilmiştir. $3,74 \times 10^8$ eksozom mL^{-1} eksozom içeren numune kullanılmıştır. 5. gün sonunda alınan ölçümde bağlı aktivite

%89,0 olarak ölçülmüştür. 14.gün ve 28. günlerde alınan ölçümlerde ise bağıl aktivite %88,3 ve %85,3 olarak gözlemlenmiştir ve bu durum iyi stabiliteyi göstermektedir. Geliştirilen biyosensörlerin kararlılık çalışmasından elde edilen sonuçlar Şekil 4.28’de grafiğe geçirilmiştir.

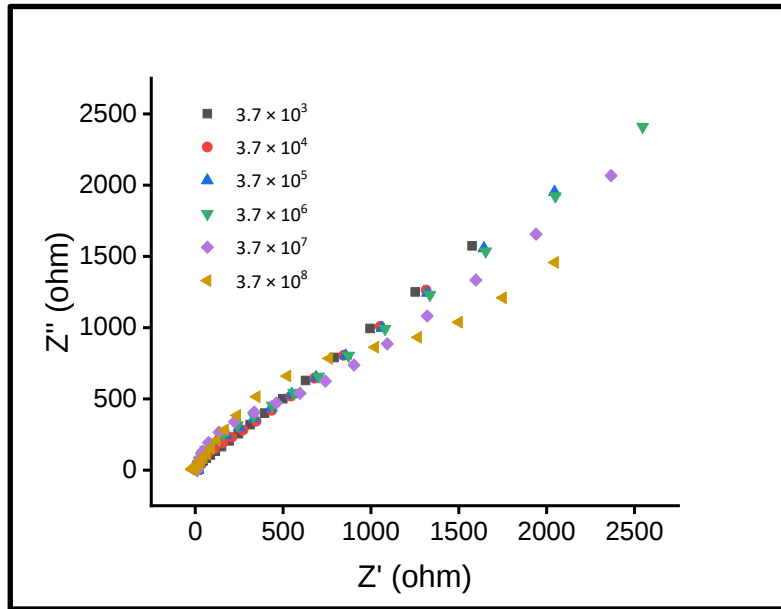


Şekil 4.28. G-SPE eksozom sensörü için stabilite çalışması

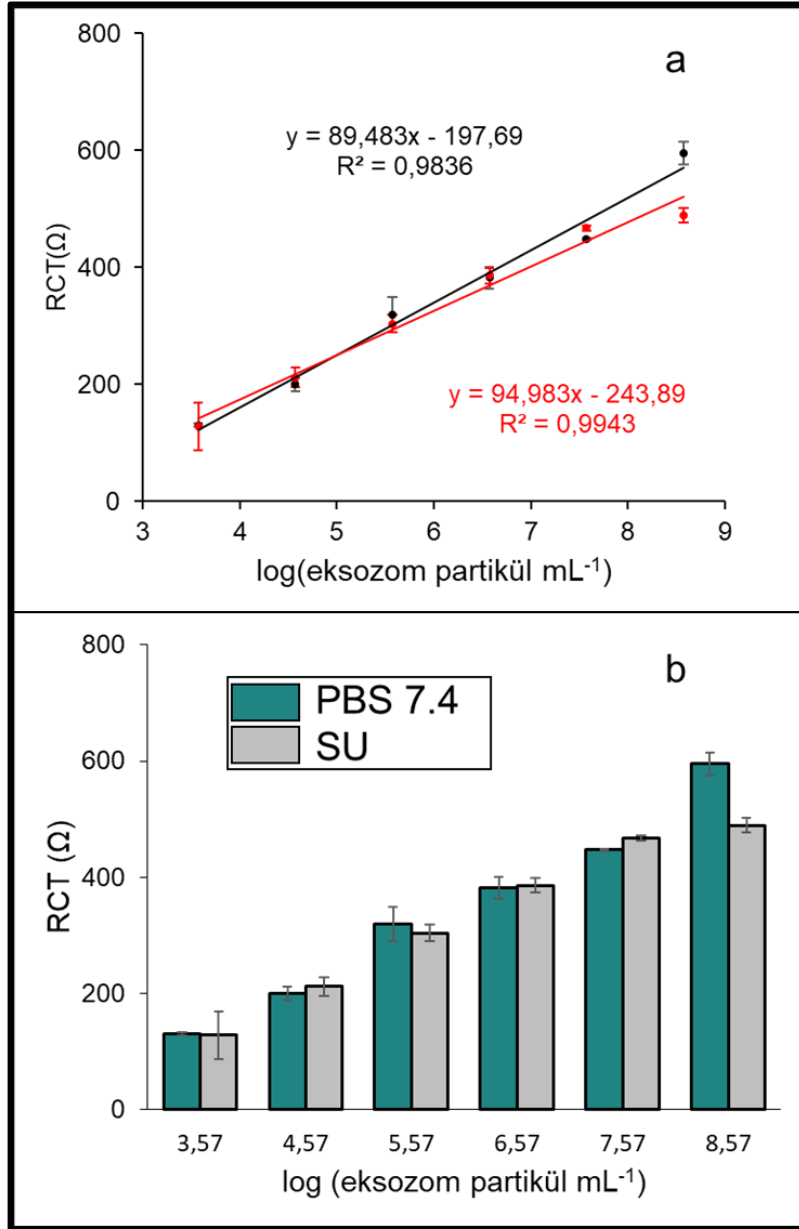
4.2.8. Yöntemin yapay idrar ile doğrulanması

İdrar invaziv olmayan yöntemlerle toplanır; bu da onu mesane ve prostat kanserlerinin potansiyel biyobelirteçlerini saptamak için çekici bir kaynak haline getirmektedir. Yöntemin klinik örneklerde eksozomları tespit edebildiğini doğrulamak için, Yapay İdrarda bulunan (SU) numunelerinde eksozomların tespiti için deneysel prosedür gerçekleştirilmiştir [172] ve farklı konsantrasyonlarda eksozomlar içeren SU numuneleri

için EIS ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.29). EIS ölçümleri sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.30 a'da karşılaştırılmakta ve kıyaslamaya ilişkin sütun grafikleri Şekil 4.30 b'de gösterilmektedir. R_{CT} ile yapay idrar numunelerindeki eksozom konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır ve regresyon denklemi $y=94,983x-243,89$ ($R^2=0,9943$) $3,7 \times 10^3$ - $3,7 \times 10^8$ partikül mL^{-1} aralığındadır. Ayrıca geliştirilen biyosensör, yapay idrardaki üre gibi diğer maddelerin etkilerine rağmen kompleks biyolojik numunelerde $3,8 \times 10^2$ partikül mL^{-1} tayin limitine ulaşmıştır. Yapay idrar doğrulamasına ilişkin tüm veriler Çizelge 4.8'da gösterilmiştir. Geri kazanım oranı, %93,67 ile %90,08 arasındadır ve bu, karmaşık bir matriste eksozomların belirlenmesinde iyi bir performans anlamına gelmektedir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.29. Yapay idrarda eksozom tespiti için Nyquist diyagramı



Şekil 4.30. (a) Eksozom biyosensörü için kalibrasyon (siyah) ve doğrulama (kırmızı) grafikleri (b) PBS ve yapay idrar ortamında eksozom bağlanması ile gözlemlenen RCT değerlerinin sütun grafiği

Çizelge 4.8. Eksozom tayini için, üç farklı yapay idrar örneğiyle yapılan doğruluk çalışması

Hesaplanan Eksozom Sayısı (partikül mL ⁻¹)						
Teorik Eksozom Sayısı (partikül mL ⁻¹)	A	B	C	Ortalama Değer	SS	BSS
$3,74 \times 10^3$	148,4	70,3	164,6	127,8	$\pm 41,2$	32,22
$3,74 \times 10^4$	261,0	191,9	181,8	211,6	$\pm 35,2$	16,64
$3,74 \times 10^5$	338,5	241,5	330,9	303,6	$\pm 44,0$	14,51
$3,74 \times 10^6$	323,7	387,1	447,2	386,0	$\pm 50,4$	13,06
$3,74 \times 10^7$	474,7	489,2	437,5	467,1	$\pm 21,8$	4,66
$3,74 \times 10^8$	504,1	576,6	687,0	589,2	$\pm 75,2$	12,76

%95 güven seviyesi ve 5 serbestlik derecesinde t için kritik değer 2,57'dir. İki yöntemin kıyaslanması sonucu elde edilen t değeri t_{kritik} olduğundan null hipotezi desteklenir ve iki yöntemin aynı sonuç verdiği kabul edilir.

Çizelge 4.9. Yapay idrarda eksozom tespiti için geri kazanım değerleri

Eklenen Derişim (partikül mL ⁻¹)	R _{CT} (Ω)	Bulunan Derişim (partikül mL ⁻¹)	Geri Kazanım (%)	t-test*	t-kritik
$3,7 \times 10^6$	$386 \pm 50,4$	$3,333 \times 10^6$	90,08		
$3,7 \times 10^7$	$467,1 \pm 21,8$	$3,466 \times 10^7$	93,67	2,50	2,57

*%95 güven seviyesinde 6 deney sonucu için

4.3. Eksozom Standartlarının Kâğıt-Tabanlı Elektrotlar Kullanılarak Tayini

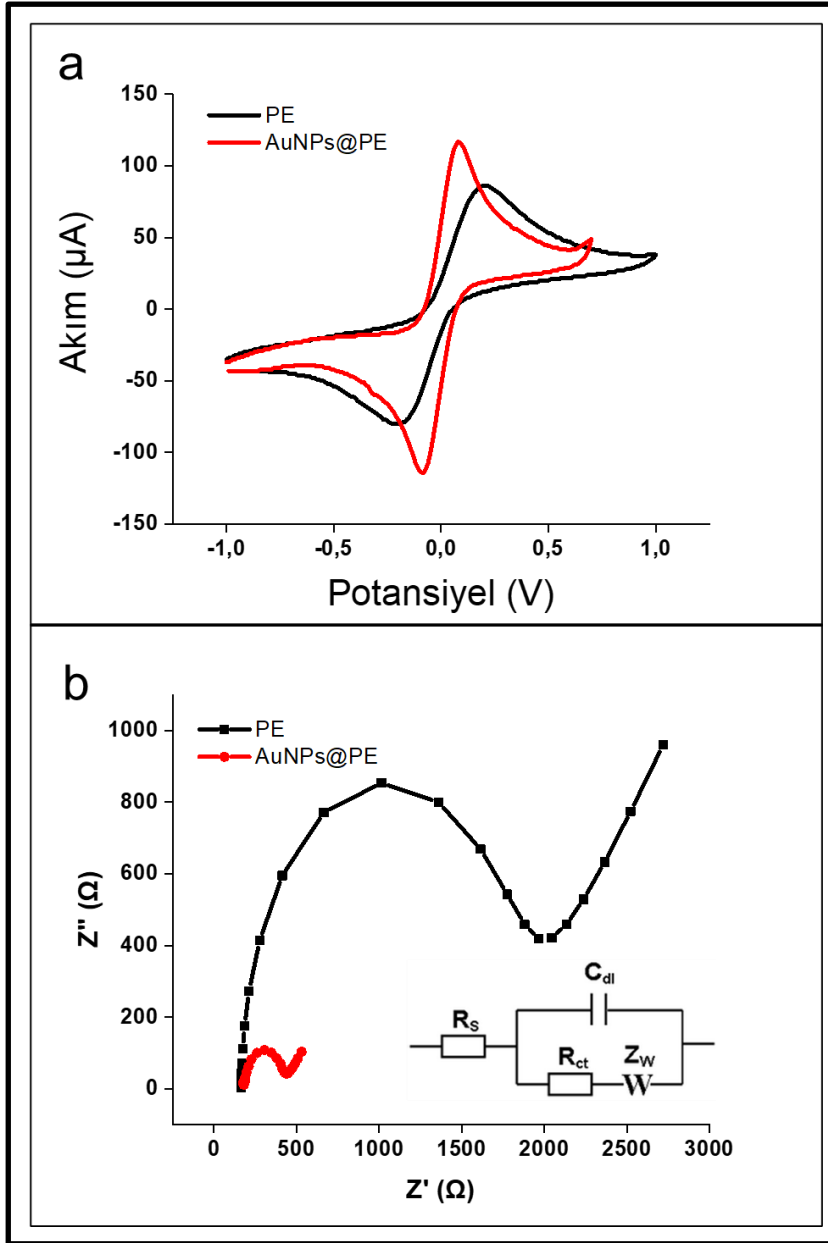
4.3.1. Kâğıt tabanlı elektrotların karakterizasyonu

Kâğıt tabanlı eksozom biyosensörünün yapımındaki ilk adım, elektrot yüzeyinde AuNP'lerin oluşturulmasıdır. Böylelikle yüzeye tiyol grupları kolaylıkla bağlanacak ve biyoreseptörlerin tutturulma işlemi gerçekleştirilecektir. Bu nanopartiküller ayrıca, normal bir karbon elektrodun elektrokimyasal performansını iyileştirmeye yardımcı olabilecek olağanüstü elektriksel özellik sergilemektedir [173]. AuNP'ler sebebi ile oluşan yüksek iletkenlik ve yüzey alanı mevcut iyileştirmenin bir sonucudur. Kaplama işlemi, altın tuzu çözeltisi damlatılan elektrodun yüzeyine sabit bir potansiyel uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir ve AuNP'lerin yerinde oluşumuyla sonuçlanmıştır.

Çalışmanın bu kısmında ilk olarak hem modifiye edilmemiş hem de AuNPs ile modifiye edilmiş kâğıt elektrotların (PE) karakterizasyonu için Döngüsel Voltametri (CV) tekniği uygulanmıştır (Şekil 4.31a). CV tekniği kullanılarak elde edilen PE ve AuNPs@PE'nin anodik ve katodik akımları; I_a , I_c , Çizelge 4.10'da gösterilmektedir. Bu durum, PE yüzeyine AuNPs birikmesiyle elektron transferinin kolaylaştırıldığını gösterir. 600 s elektrokimyasal biriktirme için CV'den alınan ölçümlerde, anodik ve katodik pik akımlarında önemli bir yükselme meydana gelmiştir. Kaplama öncesindeki anodik pik akımı $81,15 \pm 1,05 \mu A$ olarak gözlemlenirken, kaplama sonrasında bu değer $121,55 \pm 5,50 \mu A$ olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. PE ve AuNPs@PE'nin CV tekniği ile ölçülen anodik ve katodik pik akımlarının ortalama değerleri (n=3)

Elektrotlar	$I_a (\mu A)$	$I_c (\mu A)$
PE	$81,15 \pm 1,05$ (%BSS,%1,29)	$12,52 \pm 0,82$ (%BSS,%6,55)
AuNPs@PE	$121,55 \pm 5,50$ (%BSS,%4,53)	$45,21 \pm 2,22$ (%BSS,%4,90)



Şekil 4.31. PE ve AuNPs@PE için (a) CV ve (b) EIS ölçümleri. Destek elektrolit olarak 0,1M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır.

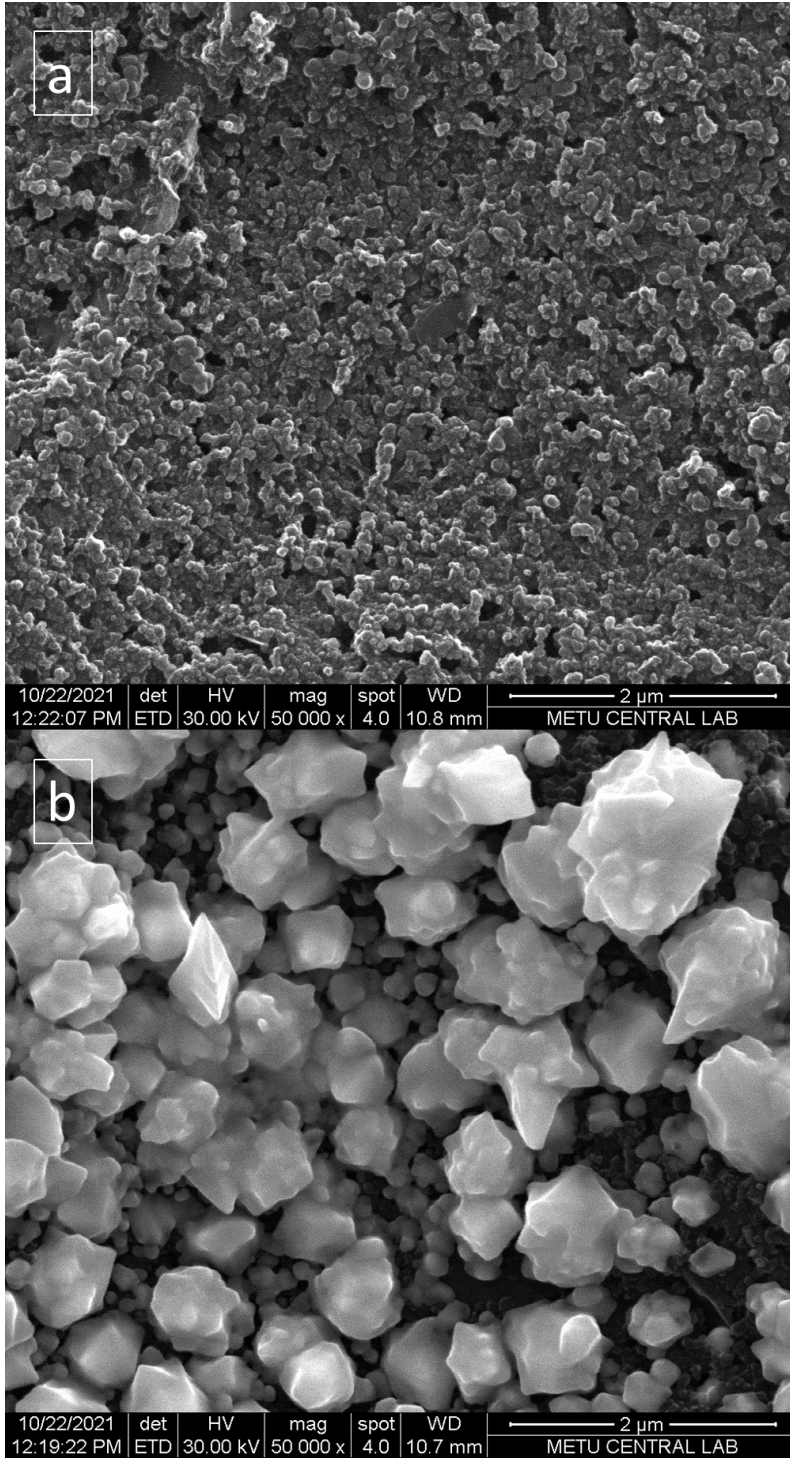
Şekil 4.31b'de gösterildiği gibi hem karbon hem de AuNP kaplanan çalışma elektrotlarının yük transfer direncindeki (R_{CT}) değişiklikleri incelemek için EIS ölçümleri yapılmıştır. Karbon kaplı yüzeyin yük transfer direnci $1625 \pm 26,335$ ohm (BSS %, %1,6, n=3) olarak hesaplanırken, AuNPs birikimi ile yük transfer direncinde önemli bir azalma meydana gelmiş ve R_{CT} $227 \pm 7,512$ ohm (BSS%, 3,3%, n = 3) olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.11). Bu sonuçlar, hızlandırılmış elektron transferinin AuNP'ler tarafından kolaylaştırdığını doğrulamıştır.

Çizelge 4.11. AuNP'lerin birikmesinden önce ve sonra kâğıt elektrotlar için yük RCT, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%BSS) değerleri

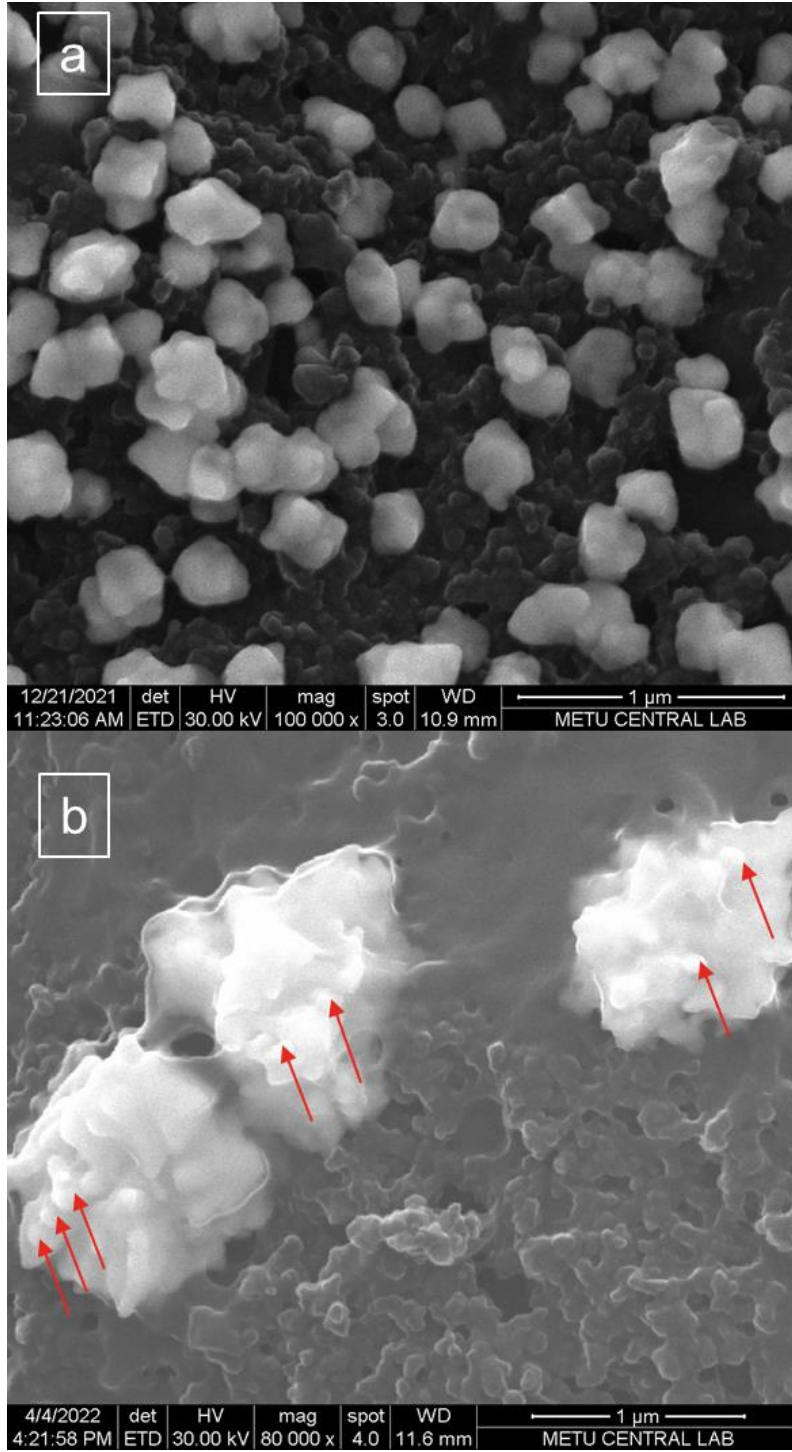
Sensör	PE	PE/AuNPs
RCT, Ω	1625,0	227,0
SD	26,3	7,5
%BSS (n=3)	1,6	3,3

Sırasıyla karbon, AuNP, Anti-CD9 ve eksozomlarla kaplanmış PE'lerin dört farklı yüzeyini karakterize etmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. Resim 4.2a, modifiye edilmemiş, yani sadece karbon kaplı PE'yi gösterirken, Resim 4.2b, elektrokimyasal indirgeme ile PE yüzeyinde biriken AuNP'lerin morfolojisini ve boyutunu göstermektedir. AuNP'ler, resimde gösterildiği gibi PE yüzeyini homojen bir şekilde kaplamıştır. PE üzerinde AuNP'ler farklı boyutlarda, keskin kenarlı ve lokalize parçacıklar olarak gözlemlenmiştir. AuNP'lerin parlaklığındaki azalmaya, yüzeyi kaplayan antikör neden olmuştur ve Resim 4.3a'da gösterilmiştir. Korunmuş zar bütünlüğüne sahip eksozomların taramalı elektron mikroskop görüntüsü, parçacıkların küresel bir şekle sahip olduğunu ve yaklaşık 50-100 nm çapında olduğunu göstermiştir. Resim 4.3b'de kırmızı oklarla gösterilen eksozomların görüntüsü literatürdeki çalışmalarla uyumludur [174–176].

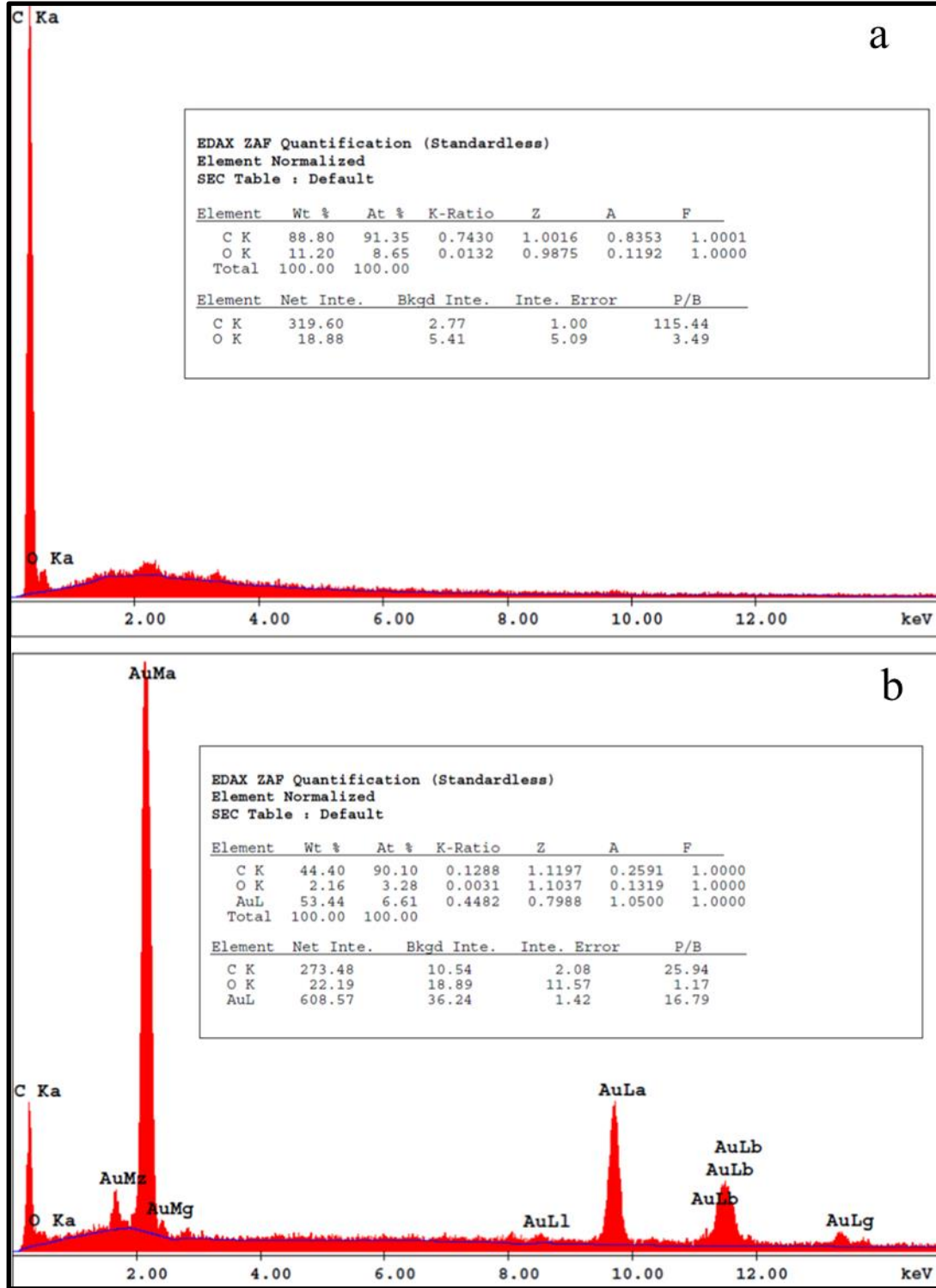
Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM/EDX) ile taramalı elektron mikroskobu, yüzey analitik tekniklerinin en iyi bilinen ve en yaygın olarak kullanılanlarıdır. Araştırmacılar EDX yöntemini kullanarak, bir numunenin kimyasal bileşimi, hangi elementlerin mevcut olduğu, dağılımları ve konsantrasyonları da dahil olmak üzere hızlı bir şekilde bilgi üretebilir. PE ve AuNPs@PE'nin SEM görüntülerine ilaveten SEM-EDX analizi, kâğıt yüzeyinde altın nanoparçacıkların oluştuğunu kanıtlamak için yapılmıştır. Şekil 4.32a'da belirtilen PE'nin EDX analiz sonucunda Karbon ve Oksijen atomlarının baskın şekilde bulunduğu görülmektedir. Kaplama sonrasında ise AuNPs@PE için beklenildiği gibi yüzeyde Altın atomlarının varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.32b).



Resim 4.2. (a) PE ve (b) AuNPs@PE için SEM görüntüleri



Resim 4.3. (a) Anti-CD9/AuNPs@PE ve (b) eksozom inkübe edilmiş Anti-CD9/AuNPs@PE'nin SEM görüntüleri

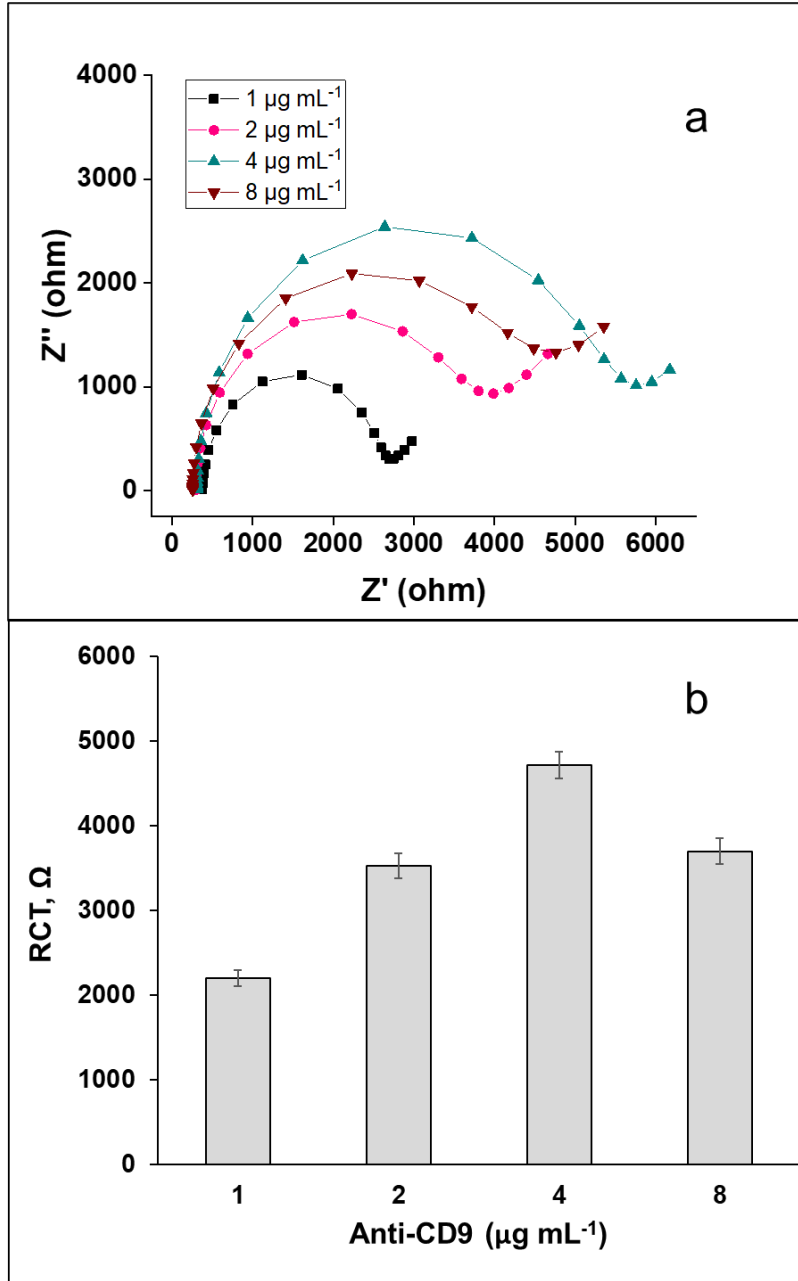


Şekil 4.32. PE ve AuNPS@PE için SEM-EDX analiz sonuçları

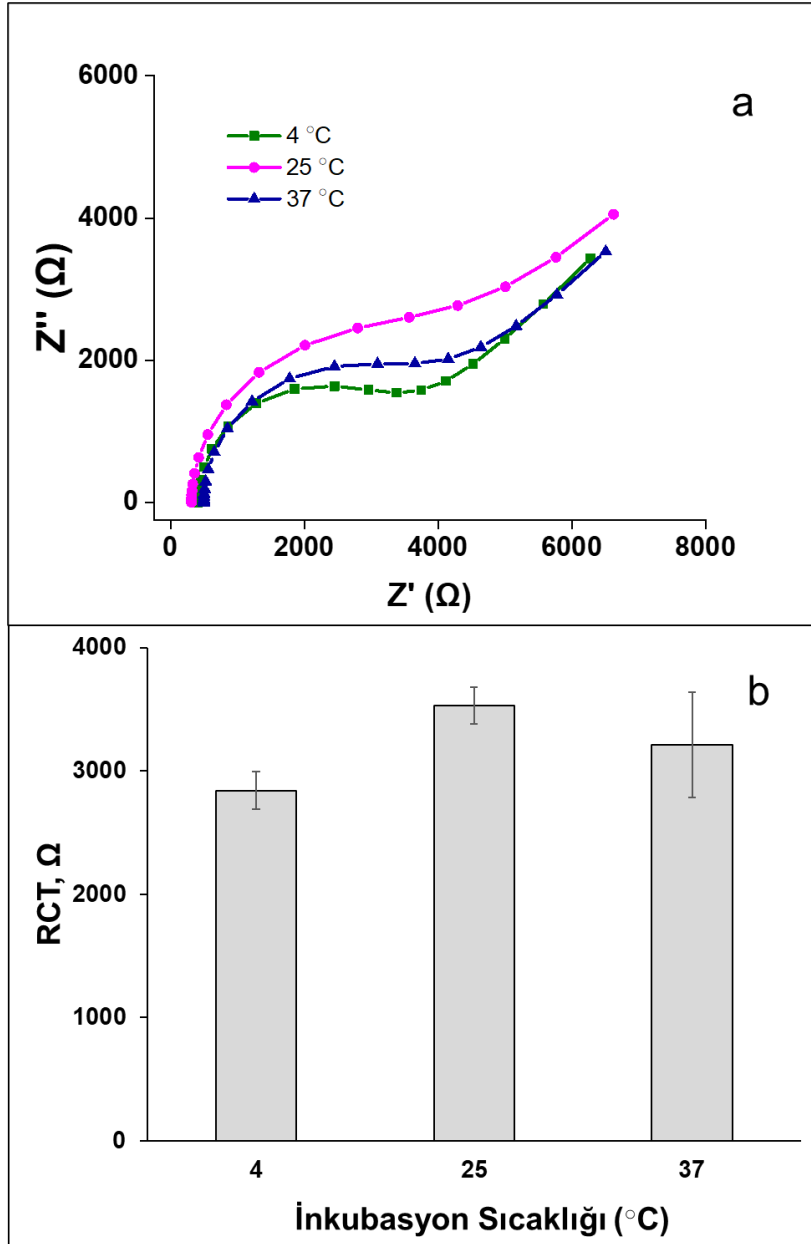
4.3.2. Deneysel koşulların optimizasyonu

Deneysel parametrelerin eksozom sensörüne olan etkisini incelemek için elektrokimyasal impedans tekniği uygulanmıştır. Eksozom sensörünün seçiciliğini ve hassasiyetini

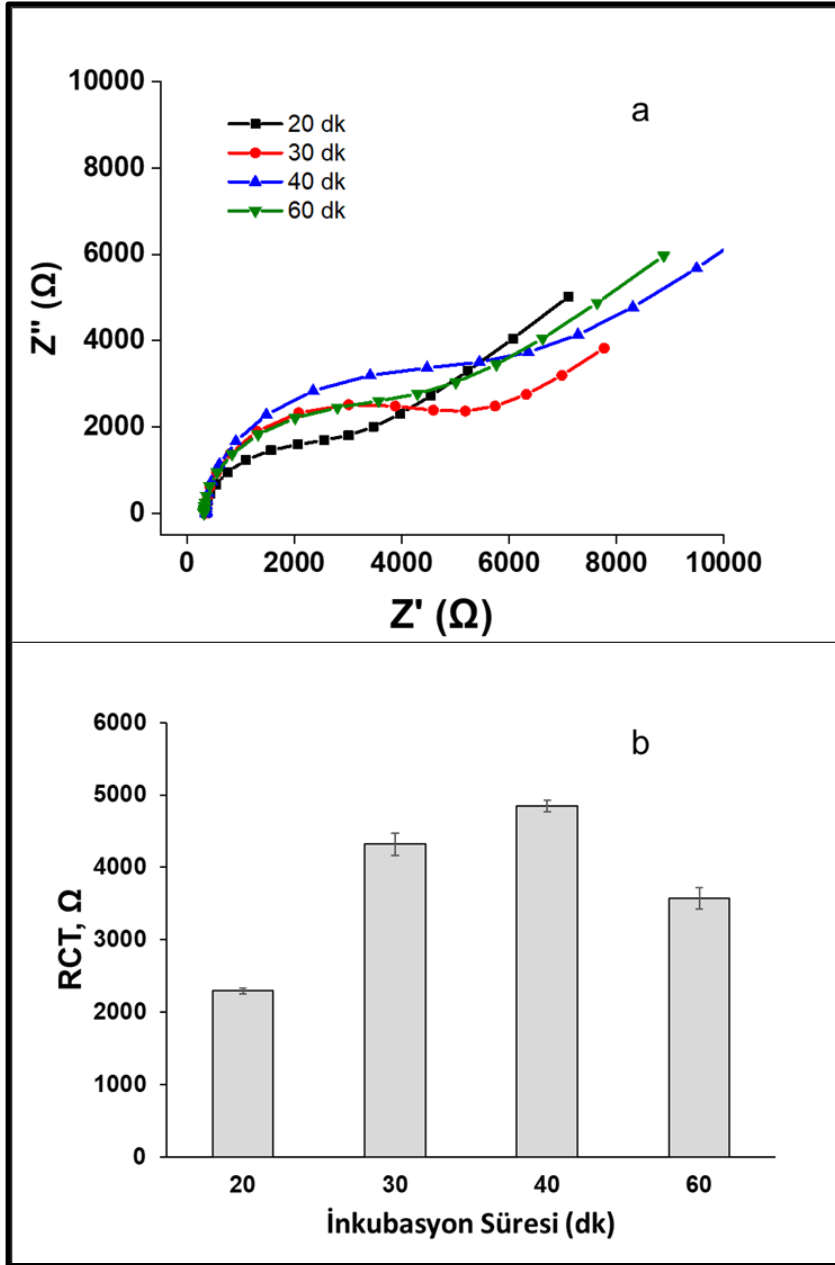
sağlamak için, anti-CD9 konsantrasyonunun mevcut 1×10^{12} eksozom mL^{-1} yanıtı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.33a, anti-CD9 konsantrasyonunun $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye kadar artmasıyla yanıt R_{CT} 'sinin arttığını göstermektedir. Daha sonra, artan antikör konsantrasyonu ile R_{CT} yanıtında bir artış gözlenmemiştir. Seçicilik ve duyarlılığı dengelemek için anti-CD9 konsantrasyonu $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak seçilmiştir (Şekil 4.33b). İnkübasyon sıcaklığının etkisi $+4$, $+25$ ve $+37$ $^{\circ}\text{C}$ 'ta incelenmiş ve Şekil 4.34a'da belirtilmiştir. R_{CT} 'de maksimum artış $+25$ $^{\circ}\text{C}$ 'ta gözlemlendiğinden bu nokta optimum inkübasyon sıcaklığı olarak belirlenmiş (Şekil 4.34b). Kuluçka süresinin etkisi 20-60 dakika aralığında incelenmiştir ve Şekil 4.35a'da belirtilmiştir. İnkübasyon periyodu uzun ise spesifik olmayan adsorpsiyon gelişebilir ve beklenmeyen R_{CT} değerleri ortaya çıkabilir. Şekil 4.35b, en yüksek R_{CT} ile ilgili olarak en iyi bağlanma süresinin 40 dakika olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.33. Anti-CD9 derişim optimizasyonu a) Nyquist diyagramı, b) verilerin değeriendirilmesi



Şekil 4.34. İnkubasyon sıcaklığı optimizasyonu a) Nyquist diyagramı, b) verilerin değerlendirilmesi

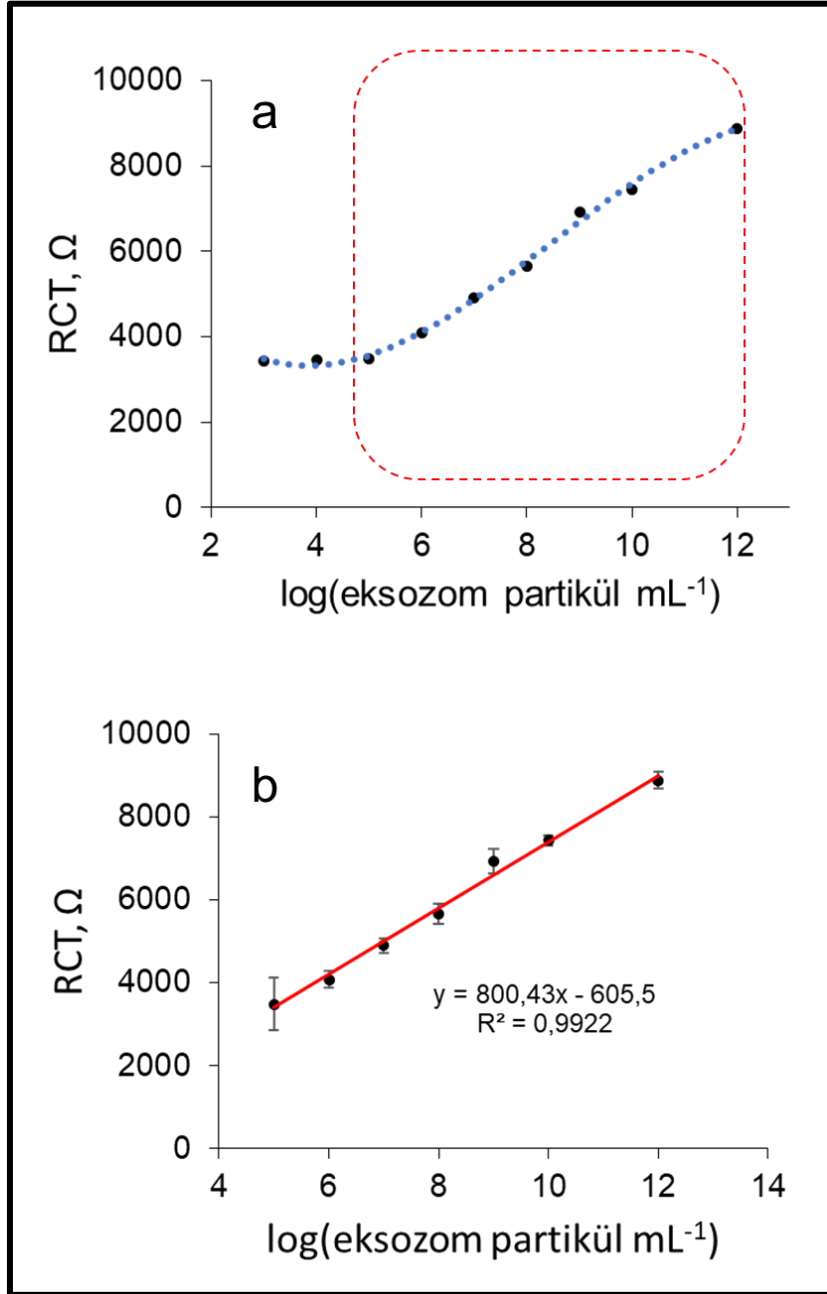


Şekil 4.35. İnkubasyon süresi optimizasyonu a) Nyquist diyagramı, b) verilerin değerlendirilmesi

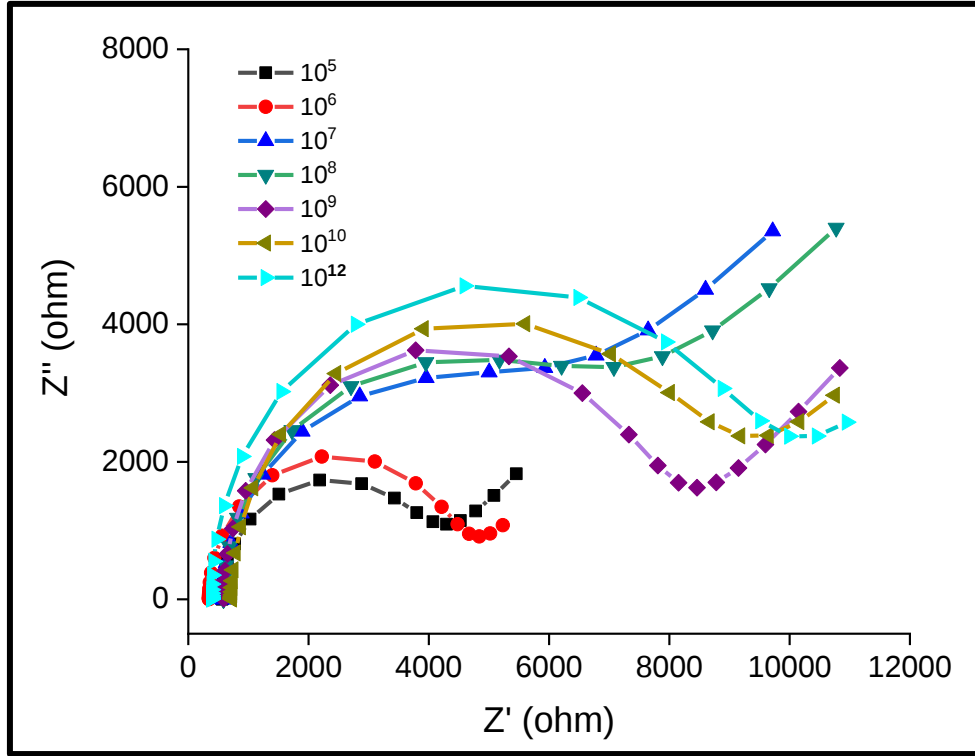
4.3.3. Kâğıt tabanlı eksozom biyosensörünün analitik performansının incelenmesi

Üretilen eksozom sensörlerinin analitik performansı, optimize edilmiş koşullar altında incelenmiştir. Eksozom sensörlerinin impedimetrik sinyalleri, bağımsız olarak hazırlanmış yedi eksozom konsantrasyonuna karşı Şekil 4.36a'da gösterilmektedir. Şekil 4.36b'deki kalibrasyon eğrisine göre, $1,7 \times 10^3$ ila 1×10^{12} eksozom mL^{-1} arasındaki eksozom konsantrasyonu aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir ve bu ilişki belirtilen denklemle verilmiştir: $y = 800,43x - 605,5$ ve $R^2 = 0,9922$. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD),

$5,08 \times 10^2$ eksozom mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. Literatürde bildirilen diğer eksozom sensörleriyle karşılaştırıldığında, üretilen PE'ler geniş bir doğrusal aralık ve yüksek hassasiyet sergilemiştir. Farklı derişimlere ait EIS ölçümleri Şekil 4.37'de belirtilmiştir.



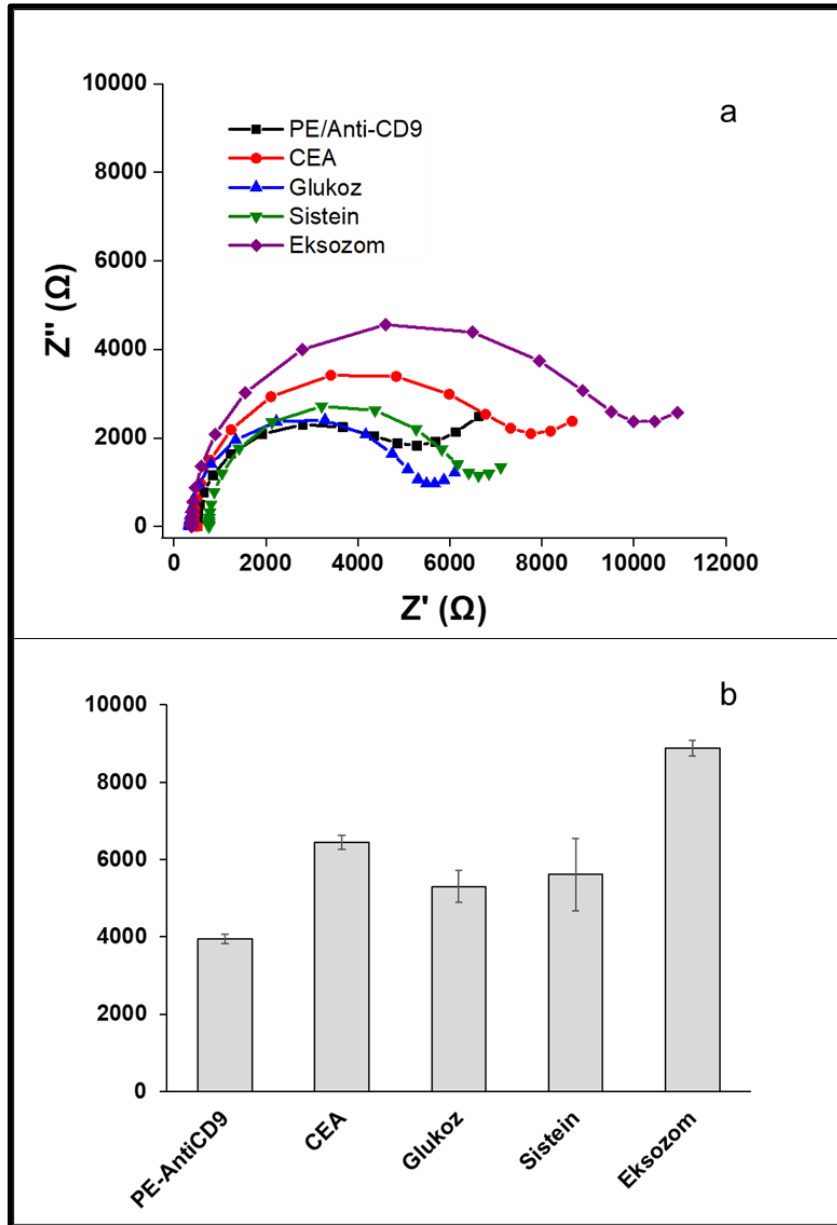
Şekil 4.36. Kâğıt tabanlı eksozom biyosensörüne ait a) kantitatif ölçüm sonuçları ve b) kalibrasyon grafiği



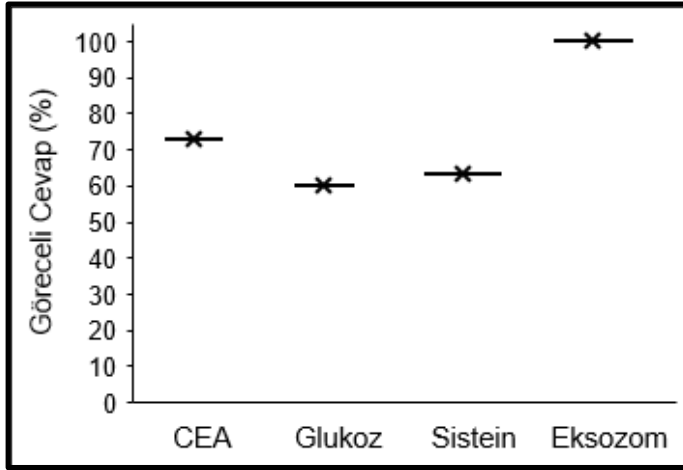
Şekil 4.37. PE Eksozom biyosensörüne ait EIS ölçümleri

4.3.4. Eksozom biyosensörünün seçiciliği

PE eksozom sensörlerinin seçiciliğinin belirlenmesi için, PE'nin glukoz ve sistein gibi plazmada bulunan biyomoleküllere olan tepkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, seçicilik çalışmasında birçok kanser türünde (mide kanseri, meme kanseri ve yumurtalık kanseri gibi) anormal şekilde eksprese edilen Karsinoembriyonik Antijen (CEA) glukoproteini kullanılmıştır [177]. Eksozomları tespit etmek için kullanılan protokol, ilgili biyomoleküllerin anti-CD9@PE sensörüne uygulanmasında kullanılmıştır ve inkübasyondan sonra her sensörün R_{CT} değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.38). Sistein ve glukoz için anlamlı bir R_{CT} elde edilmezken, CEA için, PE yüzeyindeki reseptör ile protein-protein etkileşiminden kaynaklanan R_{CT} artışı gözlemlenmiş ancak elde edilen R_{CT} değerleri 'Göreceli Yanıt' formunda değerlendirildiğinde, Anti-CD9@PE'nin eksozomlara oldukça duyarlı bir davranış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.39).



Şekil 4.38. Kâğıt sensörün seçicilik çalışmasına ait a) Nyquist diyagramları ve b) R_{CT} verilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.39. CEA, Glukoz ve Sistein inkübasyonu için Göreceli Tepki değerleri

4.3.5. Eksozom biyosensörü için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması

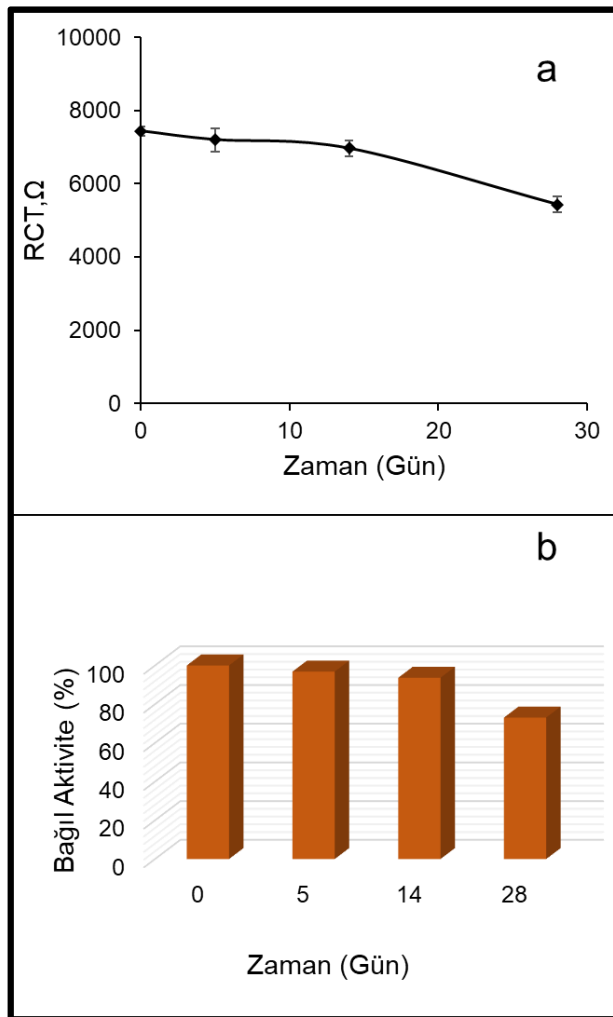
Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğu ve kesinliği, eksozomların üç farklı konsantrasyonda analiz edilmesi ile belirlendi: $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^{10}$ partikül mL^{-1} . Gün içi analizler, aynı gün içinde üç adet eksozom örneği analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Günler arası analiz ise, 1 aylık bir süre boyunca 1. gün, 5. gün, 14. gün ve 28. günde alınan, aynı konsantrasyonlarda ve ekipman tarafından gerçekleştirilen dört ölçümünün ortalamasıdır. Kesinlik için bağıl standart sapma (BSS) olarak ifade edilen sonuçlar hem gün içi hem de gün içi değerler için Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Kesinlik için, BSS %5,84'den küçüktür, bu sebeple belirtilen sonuçların kabul edilebilir değerler olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.12. PE eksozom biyosensörüne ait gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

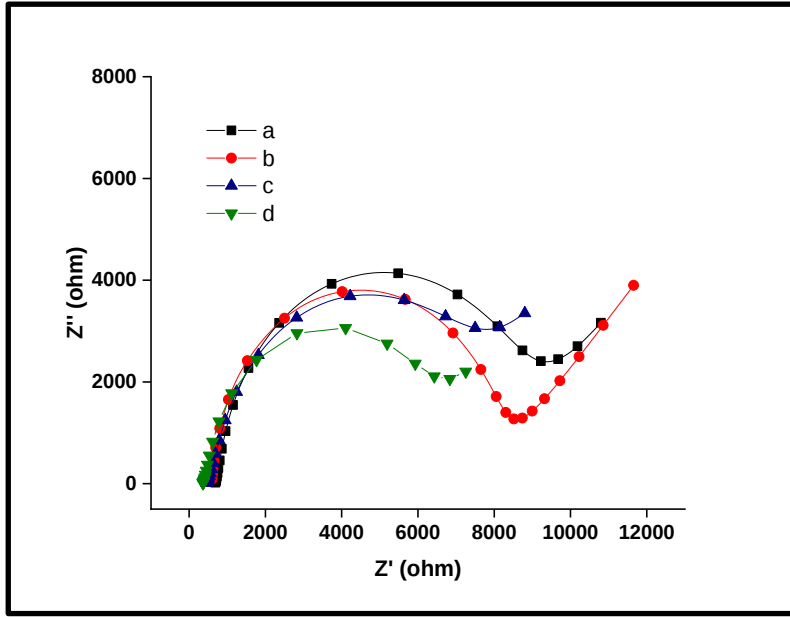
Gün içi kesinlik (n=3)			Günler arası kesinlik (n=4)	
Eksozom (Log_{10})(partikül mL^{-1})	Bulunan Eksozom (Log_{10})(partikül mL^{-1})	BSS	Bulunan Eksozom (Log_{10})(partikül mL^{-1})	BSS
7	$6,85 \pm 0,35$	5,11	$6,87 \pm 0,39$	5,68
8	$7,82 \pm 0,14$	1,79	$7,70 \pm 0,45$	5,84
10	$10,10 \pm 0,54$	5,35	$9,81 \pm 0,42$	4,28

4.3.6. Eksozom biyosensörünün kararlılığı

Kararlılık, biyosensörün pratik uygulamasını etkileyen bir diğer önemli parametredir. Bir biyosensörün yüzeyindeki reseptörün hedef molekül için duyarsız hale gelmesi genel kullanımlar için sınırlamalar getirmektedir. +4°C'ta saklanarak eksozom PE'nin in vitro uzun vadeli kararlılığı, Şekil 4.40'da belirtilen günler için $1,0 \times 10^{10}$ eksozom mL^{-1} uygulandığında gözlemlenen impedans yanıtları ile değerlendirilmiştir. Biyosensörün stabilite çalışması için Nyquist diyagramı Şekil 4.41'de gösterilmiştir. İlk 14 gün için PE sensörünün impedimetrik tepkileri oldukça yakındır. İki haftanın sonunda, nispi aktivite değeri %75'e düşmüştür, bu da proteinin +4°C'ta uzun süreli depolamadan sonra hala kabul edilebilir aralıkta olan hafif bozunması nedeniyledir (Tablo 4.13). Bağlı aktivitede meydana gelen azalmadan dolayı hazırlanan immünosensör mümkün olan en kısa sürede kullanılmalıdır.



Şekil 4.40. PE eksozom sensörlerinin kararlılık çalışması



Şekil 4.41. Eksozom biyosensörün kararlılık çalışması için Nyquist diyagramı (a) 0. gün (b) 5. gün (c) 14. gün ve (d) 28. gün

Çizelge 4.13. PE eksozom biyosensörüne ait kararlılık çalışması sonuçları

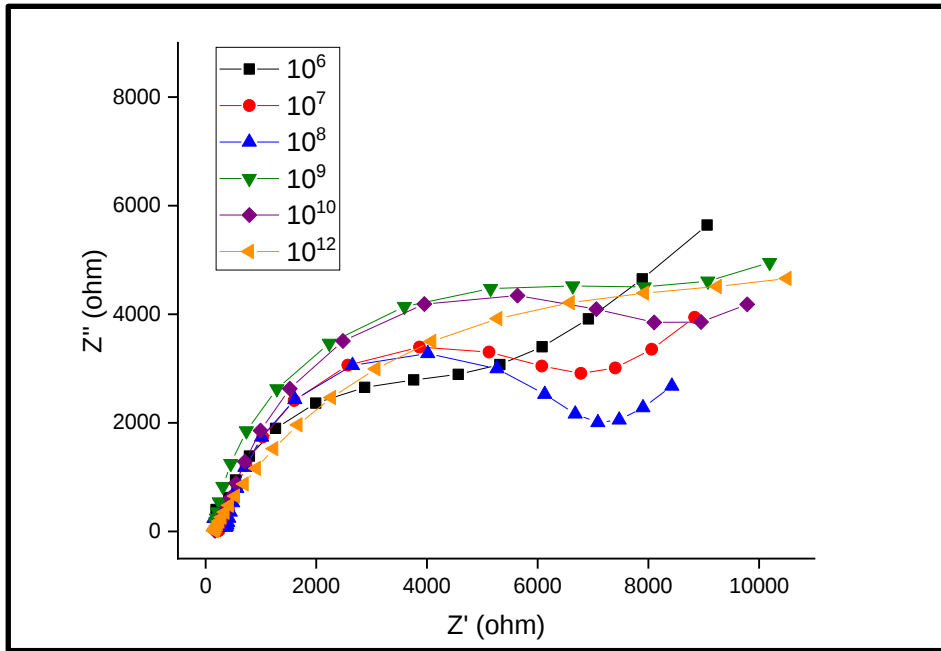
Gün	Sinyal (R_{CT})	SS	BSS
5	7203	± 314	4,4
14	6965	± 211	3,0
28	5579	± 12	0,2

4.3.7. Kâğıt tabanlı elektrot ile Colo 741 Hücre hattından elde edilen eksozomların tayini

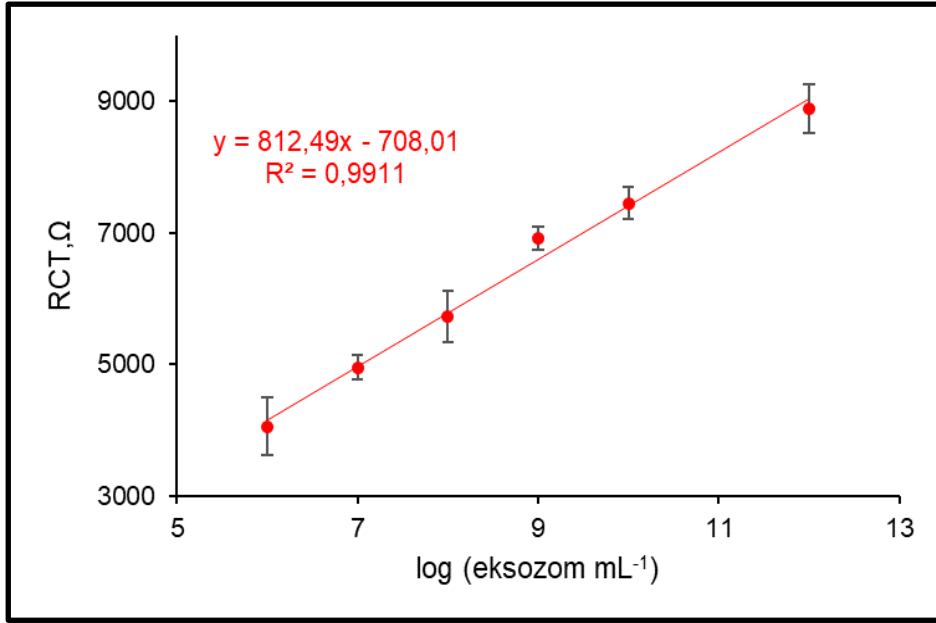
CRC (kolorektal kanser) oluşumu, kolon epitel hücrelerinde genetik ve epigenetik transformasyonun gelişmesiyle ortaya çıkar. Kolon kanseri hücre serileri büyüme hızı ve morfolojisine göre değişiklik göstermektedir. Colo 741 Hücre serisi de kolon kanseri hücre zincirlerinden biridir. Colo 741 hücre hattından elde edilen eksozomlar geliştirilen yöntem ile tayin edilmiştir. $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$, $1,0 \times 10^{10}$ ve $1,0 \times 10^{12}$ eksozom mL^{-1} derişimindeki numuneler anti-CD9 modifiye kâğıt elektrotlara uygulanarak R_{CT} cevapları değerlendirilmiştir ve Şekil 4.42’de belirtilmiştir. Ayrıca kıyaslamaya ilişkin doğrusal impedimetrik cevaplar Şekil 4.43’de, sütun grafikleri ise Şekil 4.44’de gösterilmektedir.

R_{CT} ile sentetik colo 741 eksozom konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır ve regresyon denklemi $y=812,49x-708,01$ ($R^2=0,9911$) olarak elde edilmiştir. Hücre kültürü içinde aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlar bulunmasına rağmen geliştirilen biyosensörün, kompleks biyolojik numunelerde kullanılabileceği görülmektedir. Colo 741 eksozomlarının doğrulanmasına ilişkin tüm veriler Çizelge 4.14’de gösterilmiştir. Geri kazanım oranı, %88 ile %68 arasındadır. Hücre kültürü ortamında eksozom seçiciliğinin düşmesi, düşük geri kazanım sonuçları ile bağlantılı olabilmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde ise, karmaşık bir matriste eksozomların belirlenmesinde önerilen sensör tasarımının iyi bir performans göstereceği anlamına gelmektedir (Çizelge 4.15).

%95 güven seviyesi ve 5 serbestlik derecesinde t için kritik değer 2,57’dir. İki yöntemin kıyaslanması sonucu elde edilen t değeri $< t_{kritik}$ olduğundan null hipotezi desteklenir ve iki yöntemin aynı sonuç verdiği kabul edilir.



Şekil 4.42. Colo 741 hücre hattından elde edilen eksozomların EIS ölçümleri



Şekil 4.43. Colo 741 eksozomların doğrusal impedimetrik cevapları

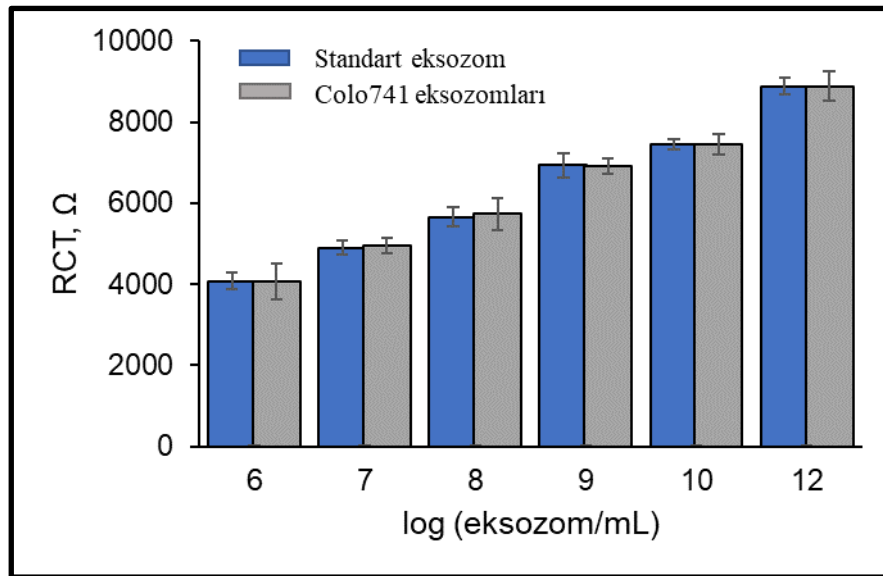
Çizelge 4.14. Eksozom biyosensörünün farklı derişimdeki Colo 741 eksozomlarına olan impedimetrik cevapların değeriendirilmesi

Teorik Eksozom Sayısı (partikül mL ⁻¹)	Hesaplanan Eksozom Sayısı (partikül mL ⁻¹)					
	A	B	C	Ortalama Değer	SS	BSS
1,0×10 ⁶	4145	3490	4554	4063	±438	10,8
1,0×10 ⁷	4975	4713	5170	4953	±187	3,8
1,0×10 ⁸	6253	5319	5613	5728	±390	6,8
1,0×10 ⁹	6736	6852	7162	6947	±180	2,6
1,0×10 ¹⁰	7345	7804	7215	7537	±253	3,4
1,0×10 ¹²	9233	8381	9045	8886	±366	4,1

Çizelge 4.15. Colo 741 Eksozom tayininin % Geri kazanım hesabının yapılması

Eklenen Derişim (partikül/ml)	$R_{CT}(\Omega)$	Geri Kazanım (%)	t-test*	t-kritik
$1,0 \times 10^6$	4063 ± 428	68		
$1,0 \times 10^7$	4953 ± 187	88	2,28	2,57
$1,0 \times 10^8$	5728 ± 390	82		

*%95 güven seviyesinde 6 deney sonucu için



Şekil 4.44. İmpidimetrik cevapların her bir konsantrasyon için sütun grafiği ile belirtilmesi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserin erken teşhisi, hastanın hayatta kalması ve hastalığın iyileşme şansının olup olmamasının belirlenmesinde oldukça önemlidir ve erken teşhis için hassas ve spesifik yöntemler gereklidir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında kanser oluşumunda vücutta aktif olarak arttıkları bilinen eksozomların tayinine yönelik biyosensörler tasarlanması hedeflenmektedir.

Geliştirilen her analitik yöntem, bir cihazın kalibrasyonunu gerektirir. Bu, tipik olarak, ilgili analitin bilinen bir miktarını içeren standart dizisinin hazırlanmasını, her bir standart için cihaz tepkisinin ölçülmesini ve cihaz tepkisi ile analit konsantrasyonu arasındaki ilişkinin kurulmasını içerir. Kalibrasyon, analitik yöntemlerde gerekli ve önemli bir adım olduğundan, araştırmacıların kalibrasyon deneylerini nasıl kuracağı ve elde edilen sonuçların nasıl değerlendirileceği konusunda iyi bir anlayışa sahip olması önemlidir.

Cihaz kalibrasyonu ile ilgili olarak, doğrusal regresyonun amacı, cihaz tepkisi (y) ve analit seviyesi (x) arasındaki doğrusal ilişkiyi en iyi tanımlayan denklemi kurmaktır. İlişki, çizginin denklemi ile tanımlanır, yani $y = mx + c$, burada m çizginin eğimi ve c, y eksenini kesişimidir. Kalibrasyon eğrisi ile kullanılan bir analitin (standartlar) bilinen konsantrasyonları ile cihaz yanıtı arasındaki ilişki, benzer bir regresyon modeli ile açıklanabilir.

Doğrusallık, yöntemin belirli bir aralıktaki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçlarını ortaya çıkarma yeteneği olarak tanımlanır. Doğrusal bir kalibrasyon eğrisinin, kalibrasyon verileriyle iyi uyum sağlamadığı zamanlar da bulunmaktadır. Bulunan sonuçlar bu doğrusallığı desteklemiyorsa, kullanılan modelin değiştirilmesi gerekir. Bazı analitik teknikler için, ölçülen sinyaller ve analit konsantrasyonları arasındaki ilişki, doğrusal değildir. Bu gibi durumlarda, kalibrasyon eğrisi için doğrusal olmayan bir fonksiyon kullanmak yaygındır. Ashley ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada, β -Laktoglobülin analizinde veri noktalarının doğrusal olmayan bir korelasyonu kullanılmıştır [178].

Tez çalışmasının ilk kısmında, yüksek konsantrasyonlu Colo 320 hücre hattından elde edilen eksozom numuneleri için bir biyosensör tasarlanarak, sınırlı veri ve dar bir

konsantrasyon aralığından elde edilen kalibrasyon grafiğinde en güvenilir ve doğru LOD değerini bulmak için matematiksel bir yaklaşım geliştirilmiştir. Literatürde lineer olmayan kalibrasyon eğrilerinin oldukça karmaşık olması ve deneysel sonuçlara kolay uygulanabilir olmaması nedeni ile bu çalışmanın gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Colo 320 eksozomlarının yüksek konsantrasyonlarda ölçülmesi için son derece hassas ve etiketsiz tekniklerden biri olan elektrokimyasal impedimetrik analiz uygulanmıştır. LOD ve çalışma aralığını belirlemek için doğrusal fonksiyon, üstel fonksiyon, ikinci dereceden polinom ve kübik polinom için eğri uydurma teknikleri kullanılarak dört farklı matematiksel model uygulanmıştır. Her bir fonksiyon için data noktalarının eğriye uymasının ölçütleri olan standart sapma, kalibrasyon katsayısı ve LOD değerleri hesaplanıp kıyaslanmıştır. Eksozom tespiti için LOD değeri, LOD'nin en düşük değeri olarak üçüncü dereceden polinom fonksiyonundan $3,90 \times 10^{11}$ partikül μL^{-1} olarak elde edilmiştir. Bu yaklaşım, hücre kültürü gibi ortamların yüksek konsantrasyonlarındaki eksozom miktarını belirlemek ve kalibrasyon grafiğindeki verilerden LOD ve LOQ değerlerini tahmin etmek için güçlü bir metodoloji olarak hizmet eder.

Tez çalışmasının ikinci kısmında ise, eksozomların elektrokimyasal impedans tekniği kullanılarak ekran baskılı elektrotlar ile tayini gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal biyosensörlerin en önemli özelliği, analitlerin yerinde tespiti için taşınabilir cihazlara entegre olabilmeleridir. Serigrafi, düşük maliyet, kullanım kolaylığı ve ölçeklenebilirlik gibi üstün avantajları nedeniyle, öne çıkan elektrot malzemelerinden biri olmuştur. SPE'ler, altın, platin ve karbon mürekkebi dahil olmak üzere çeşitli malzeme türleri kullanılarak üretilir.

Elektrot malzemesi olarak ekran baskılı altın elektrotlar kullanılmıştır ve çalışma bu elektrotların modifikasyonunu, deney koşullarının optimizasyonunu ve yöntemin validasyon çalışmalarını içermektedir. Altın yüzey ile biyoreseptör arasındaki bağlantı 11-Merkaptoundekanoik asit bileşiğinin etanol içinde (20mM) hazırlanan çözeltisi ile sağlanmıştır. Ayrıca yöntem için, antikor derişimi ve inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Hem reel impedansın logaritmik verileri hem de yük transfer direçleri ele alındığında optimum antikor derişiminin $2\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, inkübasyon süresinin ise 50 dk olduğu gözlemlenmiştir. Ferrisiyanür/ferrosiyanür, redoks probunda diğer parametrelere göre elektron transferinin daha yüksek oranda engellenmesi optimum koşulların belirlenmesinde kullanılmıştır.

Yüzeye ait karakterizasyonlarda hem EIS hem de CV tekniği kullanılmıştır. Modifikasyon işlemi öncesi ve sonrasında I_A , SPE, Anti-CD63@SPE ve Eksozom_Anti-CD63 için sırasıyla $203,38 \pm 15,82$; $128,71 \pm 2,46$; $111,23 \pm 15,04$ μA olarak ölçülmüştür ve aynı yüzeyler için logaritmik gerçek impedans değerleri $3,418 \pm 0,099$; $3,481 \pm 0,214$; $3,643 \pm 0,126$ olarak elde edilmiştir. CV ve EIS yöntemleri SPE yüzeyin modifikasyon aşamalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Tüm bu çalışmalara ilaveten eksozomun Anti-CD63@SPE sensörüne bağlanması floresans mikroskopi yöntemi ile de kanıtlanmıştır. Burada floresans etiket (FITC) bağlı Anti-CD63'e özgü ikincil bir antikor kullanılmıştır. Böylelikle yüzeyde anti-CD63 bağlı olduğunda yüksek floresans şiddeti gözlemlenirken, yüzeyin eksozom ile kaplanması Anti-CD63 ile AB-FITC arasındaki ikincil etkileşimi önlediğinden floresans şiddette radikal bir azalma gözlenmiştir. Bu da Anti-CD63 kaplı yüzeye eksozomların bağlandığını göstermiştir.

G-SPE ile hazırlanan eksozom sensörünün analitik performansının incelendiği kısımda ise artan eksozom derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen yük transfer dirençleri kullanılarak kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Eksozom sensörüne ait doğrusal çalışma aralığı $3,7 \times 10^3 - 3,7 \times 10^8$, LOD ise $2,0 \times 10^3$ partikül mL^{-1} olarak elde edilmiştir. Bu değerler tasarlanan biyosensörün klinik uygulamalar için kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Literatürde ekran baskılı elektrotlar ile meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomların tayini çalışmasında LOD $9,6 \times 10^2$ partikül μL^{-1} olarak elde edilmiştir [179]. Ekran baskılı elektrotların kullanıldığı başka bir çalışmada ise, tümör eksozomlarının tespiti için sinyal amplifikasyonu ve DNA hibridizasyon zincir reaksiyonuna (HCR) dayalı bir elektrokimyasal aptasensör geliştirilmiştir ve optimal koşullar altında, bu yöntem, 96 partikül μL^{-1} LOD değerine ulaşmıştır [180]. Dahası bir diğer çalışmada, manyetik toplama ve saflaştırma ön işlemlerinden sonra Au-NPFe₂O₃NC'ye bağlı eksozomlar, kendilerine özgü antikorla modifiye edilmiş ekran baskılı elektrotlara aktarılmış ve LOD 1×10^3 partikül mL^{-1} olarak elde edilmiştir [61]. Literatürde ekran baskılı elektrotlar ile yapılan eksozom tayini çalışmalarına bakıldığında geliştirilen yöntemin tespit sınırının diğer çalışmalara kıyasla daha düşük olduğunu, hedeflenen analitik performansı gösterdiğini ve bu durumda yönteminin uygulanabilir olma özelliğini arttırdığını söyleyebiliriz.

Eksozom sensörünün, CD63 eksozom yüzey antijeni dışındaki farklı türlere cevabını değerlendirmek için seçicilik çalışması yapılmıştır ve bu çalışmada hem R_{CT} hem de gerçek impedansın logaritmik değerleri kullanılmıştır. Bu çalışma eksozomun oluşturduğu yük transfer direncindeki cevabın diğer antijenlere kıyasla yaklaşık beş kat daha fazla olması ve diğer antijen cevaplarının çalışma aralığındaki herhangi eksozom derişimine karşılık gelmemesi sebebi ile sensör eksozomlara karşı mükemmel hassasiyet ve seçicilik göstermiştir.

Anti-CD63@SPE modifiye elektrodun pratik uygulanabilirliğini incelemek için yapay idrar numunelerinde eksozomun elektrokimyasal tayini yapılmıştır. Yapay idrar içine artan derişimlerde eksozom ilave edilmiş ve herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan analiz edilmiştir. Sensörün cevabında eksozom derişimleri hesaplanmış ve geri kazanımlar belirlenmiştir. Geri kazanımlar, %90,08 ve 93,67 aralığındadır. Ayrıca geliştirilen yöntem ELISA ile kıyaslanmış ve sonuçlar t-testine tabi tutularak t değeri 2,50 olarak elde edilmiştir. İki yöntemin kıyaslanması sonucu elde edilen t değeri t_{kritik} olduğundan null hipotezi desteklenir ve iki yöntemin aynı sonuç verdiği kabul edilir. Bu sonuç, gerçek numunelerde eksozomların pratik olarak belirlenmesi için Anti-CD9@PE modifiye elektrodun potansiyel kullanılabilirliğini kanıtlamıştır.

Tez çalışmasının üçüncü kısmında ise, eksozomların elektrokimyasal impedans tekniği kullanılarak elle hazırlanan kâğıt elektrotlar ile tayini gerçekleştirilmiştir. Son zamanlarda, kâğıt tabanlı elektrotlar, minyatür, hafif ve biyoyumlu cihazları düşük maliyetle geliştirmenin etkili bir yolu olarak ortaya çıkmıştır. Elektrotlar, esas olarak serigrafi teknikleri ile kâğıt substratlar üzerinde üretilir. Ek olarak, yüzeyi kimyasal ve fiziksel olarak kolayca değiştirilebilir, kesilebilir, katlanabilir ve/veya istifleenebilir. Bu bağlamda bir dizi farklı teknoloji uygulanabilse de cihazlar çoğunlukla kâğıt üzerindeki farklı alanları modellemek için mum baskı işlemleriyle üretilir.

Yüzeyde elektrokimyasal hücreler tanımlanır. Bu kısımda genellikle, grafen, altın, gümüş veya karbondan oluşan iletken macunlar kullanılır. İletken karbon pasta CE ve WE imalatında yaygın olarak kullanılmaktadır. RE'ye gelince, gümüş macun, sinyal çıkışını artıran elektrokimyasal algılama için tutarlı potansiyeli ve kararlılığı nedeniyle oldukça uygun bir malzemedir. Bu işlemlerden sonra çalışma elektrodunun yüzeyi hedef biyobelirteç için seçici hale getirilir.

Analizler genellikle gerekli çözeltilerin damlatılmasıyla gerçekleştirilir, bu nedenle numune ve/veya reaktifler doğrudan elektrokimyasal hücrenin tanımlandığı hidrofilik algılama alanına eklenir.

Tez kapsamında geliştirilen kâğıt tabanlı eksozom biyosensörünün mum baskı tasarımı hem çalışma elektrodunu hem de üç elektrotlu sistemi kapsayan iki farklı yuvarlak bariyer ile yapılmıştır. Çalışma elektroduna ait bariyer, bu bölgedeki modifikasyon işleminde düşük numune kullanımına olanak sağladı. Üç elektrotlu sistemi kapsayan ikinci bariyer ise elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan elektrolitin bu bölgede hareketsiz kalmasını sağlamıştır. Genel olarak bu tasarım, reaktif ve numune hacimlerini azaltmış ve çalışma elektrodunun modifikasyonu sırasında karşıt ve referans elektrotlarının kontaminasyonunu önlemiştir.

Hazırlanan kâğıt elektrot yüzeyindeki karbon çalışma elektrodu, sabit potansiyelde altın tuzu çözeltisi kullanılarak altın nanoparçacık ile kaplanmıştır. Bu işlem, hem çalışma elektrodunun yüzey modifikasyonunu kolaylaştırmış, hem de yüzeyi elektriksel olarak daha iletken hale getirdiğinden çok küçük miktarda da olsa her türlü elektron transferine ait bloklama tespit edilebilmiştir. Ayrıca kâğıdın nanoyapılarla modifikasyonu, duyarlılık, dinamik aralık, algılama limiti ve girişim yapan türlere karşı seçicilik gibi önemli parametrelerde bir dizi iyileştirme sağlamıştır.

Altın nanoparçacık kaplama işlemi ile kaplama öncesi ve sonrasındaki iki yüzeyin elektrokimyasal ve mikroskobik karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kaplama öncesindeki anodik pik akımı $81,15 \pm 1,05 \mu\text{A}$ olarak gözlemlenirken, kaplama sonrasında bu değer $121,55 \pm 5,50 \mu\text{A}$ olarak elde edilmiştir. İlaveten, karbon kaplı yüzeyin yük transfer direnci $1625 \pm 26,335 \text{ ohm}$ olarak hesaplanırken, AuNPs birikimi ile yük transfer direncinde önemli bir azalma meydana gelmiş ve $R_{CT} 227 \pm 7,512 \text{ ohm}$ olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, elektron transferinin AuNP'ler tarafından kolaylaştırıldığını doğrulamıştır. İlaveten, elektrokimyasal indirgeme ile PE yüzeyinde biriken AuNP'lerin morfolojisi ve boyutları SEM görüntüleri ile gösterilmiştir. AuNP'ler, PE yüzeyini homojen bir şekilde kaplamıştır. PE üzerinde AuNP'ler farklı boyutlarda, keskin kenarlı ve lokalize parçacıklar olarak gözlemlenmiştir.

Altın kaplama işleminden sonra, çalışma elektrotlarının modifikasyonu, deney koşullarının optimizasyonu ve yöntemin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. AuNPs yüzey ile biyoreseptör arasındaki bağlantı 11-Merkaptoundekanoik asit bileşiğinin etanol içinde (20mM) hazırlanan çözeltisi ile sağlanmıştır. Ayrıca yöntem için, antikor derişimi, inkubasyon sıcaklığı ve inkubasyon süresi optimize edilmiştir. Yük transfer direncinde gözlemlenen en yüksek değer, hedef molekül ve biyoreseptör arasındaki en yüksek bağlanma oranını gösterdiğinden optimum antikor derişimi $4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, inkubasyon sıcaklığı 25°C ve inkubasyon süresinin ise 40 dk olduğu gözlemlenmiştir.

PE ile hazırlanan eksozom sensörünün analitik performansının incelendiği kısımda ise artan eksozom derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen yük transfer dirençleri kullanılarak kalibrasyon grafiğı hazırlanmıştır. Eksozom sensörüne ait doğrusal çalışma aralığı $1,7 \times 10^3 - 1 \times 10^{12}$, LOD ise $5,07 \times 10^2$ partikül mL^{-1} olarak elde edilmiştir. Bu değerler tasarlanan biyosensörün klinik uygulamalar için kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Literatürde PAD'ler ile yapılan eksozom analiz çalışmalarına bakıldığında, Eksozomların tespiti için ilginç bir kâğıt tabanlı aptasensör Chen, Lan ve diğerleri tarafından geliştirilmiştir. Burada, eksozomların belirlenmesi için lüminesans rezonans enerji transferine (LRET) dayalı kâğıt destekli aptasensör kullanılmış ve LOD $1,1 \times 10^3$ partikül μL^{-1} olarak belirlenmiştir [181]. Yapılan bir başka çalışmada, eksozomların taşınabilir ve kantitatif belirlenmesi için metal-organik çerçeve ile işlevselleştirilmiş bir kâğıt ve ekran baskılı bir elektrodun birleşimi ile nükleik asit temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Etiketsiz kâğıt bazlı biyosensör, 5×10^3 partikül mL^{-1} 'ye kadar bir algılama limiti ile ultrasensitif eksozom tahlili yapabilir [182]. Yang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, eksozomal miRNA-155 (33.4 aM) ve eksozomal miRNA-21 (23.1 aM) için moleküler düzeyde hassasiyet sağlayan tek kullanımlık kâğıt tabanlı elektrotlar geliştirilmiştir [183]. Literatürde ekran baskılı elektrotlar ile yapılan eksozom tayini çalışmalarına bakıldığında geliştirilen yöntemin tespit sınırının diğer çalışmalara kıyasla daha düşük olduğunu, hedeflenen analitik performansı gösterdiğini ve bu durumda yönteminin uygulanabilir olma özelliğini arttırdığını söyleyebiliriz.

Eksozom sensörünün, CD9 eksozom yüzey antijeni dışındaki farklı türlere cevabını değerlendirmek için seçicilik çalışması yapılmıştır. Moleküler etkenlere zayıf cevap

gözlemlenirken (sistein, glikoz), protein türevi olan CEA için protein-protein etkileşiminden kaynaklanan R_{CT} artışı gözlemlenmiştir. Bu çalışma, eksozomun oluşturduğu yük transfer direncindeki cevabın diğer antijenlere kıyasla ayırt edilebilir olduğunu fakat protein türevi varlığında spesifik olmayan etkileşimlerin gerçekleşebileceğini göstermiştir.

Anti-CD9@PE modifiye elektrodun pratik uygulanabilirliğini incelemek için Colo 741 hücre zincirinden izole edilen eksozomların geliştirilen yöntem ile elektrokimyasal tayini yapılmıştır. Numuneler artan derişimlerde hazırlanıp analiz edilmiştir. Sensör cevabına karşılık gelen eksozom derişimleri hesaplanıp geri kazanımlar belirlenmiştir. Geri kazanımlar %68 ve %88 aralığındadır. Ayrıca geliştirilen yöntem ELISA ile kıyaslanmış ve sonuçlar t-testine tabi tutularak t değeri 2,28 olarak elde edilmiştir. İki yöntemin kıyaslanması sonucu elde edilen t değeri t_{kritik} olduğundan null hipotezi desteklenir ve iki yöntemin aynı sonuç verdiği kabul edilir. Bu sonuç, gerçek numunelerde eksozomların pratik olarak belirlenmesi için Anti-CD9@PE modifiye elektrodun potansiyel kullanılabilirliğini kanıtlamıştır.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan eksozom biyosensörlerinin hazırlanmasının kolay olması, geniş bir tayin aralığına sahip olması ve düşük tespit limitlerine sahip olması biyosensörleri başarılı kılmaktadır. Dahası gerçek uygulamalardaki başarısı biyosensörü ticari hale getirilip kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Cheng, H., Yang, Q., Wang, R., Luo, R., Zhu, S., Li, M., Li, W., Chen, C., Zou, Y., Huang, Z., Xie, T., Wang, S., Zhang, H. and Tian, Q. (2022). Emerging advances of detection strategies for tumor-derived exosomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 14-15.
2. Cho, I. H., Kim, D. H. and Park, S. (2020). Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research*, 24(1), 21-25.
3. Kirchhain, A., Bonini, A., Vivaldi, F., Poma, N. and di Francesco, F. (2020). Latest developments in non-faradic impedimetric biosensors: Towards clinical applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 133, 14-16.
4. Pradhan, R., Mitra, A. and Das, S. (2011). *Characterization of electrode/electrolyte interface for bioimpedance study*. TechSym 2011 - Proceedings of the 2011 IEEE Students' Technology Symposium, 275–280.
5. Uygun, Z. O. and Ertuğrul Uygun, H. D. (2014). A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 202, 448–453.
6. Xie, Q.-Z., Lin, M.-W., Hsu, W.-E. and Lin, C.-T. (2020). Review—advancements of nanoscale structures and materials in impedimetric biosensing technologies. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 9(11), 115027.
7. Bordbar, M. M., Sheini, A., Hashemi, P., Hajian, A. and Bagheri, H. (2021). Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—a review. *Biosensors*, 11(9), 22-25.
8. Nguyen, T., Chidambara, V. A., Andreasen, S. Z., Golabi, M., Huynh, V. N., Linh, Q. T., Bang, D. D. and Wolff, A. (2020). Point-of-care devices for pathogen detections: The three most important factors to realise towards commercialization. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 131, 17-22.
9. Liu, S., Su, W. and Ding, X. (2016). A review on microfluidic paper-based analytical devices for glucose detection. *Sensors (Switzerland)*, 16(12), 1–17.
10. Wang, P. and Kricka, L. J. (2018). Current and emerging trends in point-of-care technology and strategies for clinical validation and implementation. *Clinical Chemistry*, 64(10), 1439–1452.
11. Ming, T., Luo, J., Liu, J., Sun, S., Xing, Y., Wang, H., Xiao, G., Deng, Y., Cheng, Y., Yang, Z., Jin, H. and Cai, X. (2020). Paper-based microfluidic aptasensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 170, 14-18.
12. Ozer, T. and Henry, C. S. (2021). Paper-based analytical devices for virus detection: Recent strategies for current and future pandemics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 144, 32-33.

13. Yarali, E., Eksin, E., Torul, H., Ganguly, A., Tamer, U., Papakonstantinou, P. and Erdem, A. (2022). Impedimetric Detection of miRNA Biomarkers Using Paper-Based Electrodes Modified With Bulk Crystals or Nanosheets of Molybdenum Disulfide. *Talanta*, 250(1), 241.
14. Bordbar, M. M., Sheini, A., Hashemi, P., Hajian, A. and Bagheri, H. (2021). Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—a review. *Biosensors*, 11(9), 14-15.
15. Bracher, P. J., Gupta, M. and Whitesides, G. M. (2009). Shaped films of ionotropic hydrogels fabricated using templates of patterned paper. *Advanced Materials*, 21(4), 445–450.
16. Sastry, S. S. M., Panjekar, S. and Raman, R. S. (2021). Graphene and graphene oxide as a support for biomolecules in the development of biosensors. *Nanotechnology, Science and Applications*, 14, 197–220.
17. Koh, A., Kang, D., Xue, Y., Lee, S., Pielak, R. M., Kim, J., Hwang, T., Min, S., Banks, A., Bastien, P., Manco, M. C., Wang, L., Ammann, K. R., Jang, K. I., Won, P., Han, S., Ghaffari, R., Paik, U., Slepian, M. J. and Rogers, J. A. (2016). A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat. *Science Translational Medicine*, 8, 366-367.
18. Laplatine, L., Luan, E., Cheung, K., Ratner, D. M., Dattner, Y. and Chrostowski, L. (2018). System-level integration of active silicon photonic biosensors using Fan-Out Wafer-Level-Packaging for low cost and multiplexed point-of-care diagnostic testing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 273, 1610–1617.
19. Lee, H., Choi, T. K., Lee, Y. B., Cho, H. R., Ghaffari, R., Wang, L., Choi, H. J., Chung, T. D., Lu, N., Hyeon, T., Choi, S. H. and Kim, D. H. (2016). A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy. *Nature Nanotechnology*, 11(6), 566–572.
20. Qiu, G., Gai, Z., Tao, Y., Schmitt, J., Kullak-Ublick, G. A. and Wang, J. (2020). Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS Nano*, 14(5), 5268–5277.
21. Sassolas, A., Blum, L. J. and Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511.
22. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 144-148.
23. Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology*, 6(5), 343–357.
24. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. and Blum, L. J. (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*, 108(1), 109–139.

25. Banerjee, P. and Bhunia, A. K. (2009). Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins. *Trends in Biotechnology*, 27(3), 179–188.
26. Dincer, C., Bruch, R., Costa-Rama, E., Fernández-Abedul, M. T., Merkoçi, A., Manz, A., Urban, G. A. and Güder, F. (2019). Disposable sensors in diagnostics, food, and environmental monitoring. *Advanced Materials*, 31(30), 24-27.
27. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34(5), 635–659.
28. Naresh, V. and Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors (Switzerland)*, 21(4), 1–35.
29. Cesewski, E. and Johnson, B. N. (2020). Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 159, 21-22.
30. Grieshaber, D., Mackenzie, R., Vörös, J. and Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8, 1400–1458.
31. Matthews, C. J., Andrews, E. S. V. and Patrick, W. M. (2021). Enzyme-based amperometric biosensors for malic acid – A review. *Analytica Chimica Acta*, 1156, 54-57.
32. Lakard, B. (2020). Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(18), 54-59.
33. Karimizefreh, A., Mahyari, F. A., VaezJalali, M., Mohammadpour, R. and Sasanpour, P. (2017). Impedimetric biosensor for the DNA of the human papilloma virus based on the use of gold nanosheets. *Microchimica Acta*, 184(6), 1729–1737.
34. Espinosa, J. R., Galván, M., Quiñones, A. S., Ayala, J. L., Ávila, V. and Durón, S. M. (2021). Electrochemical resistive dna biosensor for the detection of hpv type 16. *Molecules*, 26(11), 120-121.
35. MacDonald, D. D. (2006). Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 51(8–9), 1376–1388.
36. Bahadir, E. B. and Sezgintürk, M. K. (2016). A review on impedimetric biosensors. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(1), 248–262.
37. Chuang, C.-H. and Shaikh, M. O. (2017). Label-free impedance biosensors for Point-of-Care diagnostics. *Point-of-Care Diagnostics-New Progresses and Perspectives*, 171–201.
38. Demirbakan, B. and Kemal Sezgintürk, M. (2021). An impedimetric biosensor system based on disposable graphite paper electrodes: Detection of ST2 as a potential biomarker for cardiovascular disease in human serum. *Analytica Chimica Acta*, 1144, 43–52.
39. Daniels, J. S. and Pourmand, N. (2007). Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. *Electroanalysis*, 19(12), 1239–1257.

40. Dorledo de Faria, R. A., Dias Heneine, L. G., Matencio, T. and Messaddeq, Y. (2019). Faradaic and non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy as transduction techniques for sensing applications. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5(1), 147-168.
41. Park, J. S., Kim, H. J., Lee, J. H., Park, J. H., Kim, J., Hwang, K. S. and Lee, B. C. (2018). Amyloid beta detection by faradaic electrochemical impedance spectroscopy using interdigitated microelectrodes. *Sensors (Switzerland)*, 18(2), 130-135.
42. Kang, J., Wen, J., Jayaram, S. H., Yu, A. and Wang, X. (2014). Development of an equivalent circuit model for electrochemical double layer capacitors (EDLCs) with distinct electrolytes. *Electrochimica Acta*, 115, 587–598.
43. Xi, F., Gao, J., Wang, J. and Wang, Z. (2011). Discrimination and detection of bacteria with a label-free impedimetric biosensor based on self-assembled lectin monolayer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 656(1–2), 252–257.
44. Elshafey, R., Tavares, A. C., Siaj, M. and Zourob, M. (2013). Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles-protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 143–149.
45. Li, Q., Tofaris, G. K. and Davis, J. J. (2017). Concentration-normalized electroanalytical assaying of exosomal markers. *Analytical Chemistry*, 89(5), 3184–3190.
46. Kilic, T., Valinhas, A. T. D. S., Wall, I., Renaud, P. and Carrara, S. (2018). Label-free detection of hypoxia-induced extracellular vesicle secretion from MCF-7 cells. *Scientific Reports*, 8(1), 97-112.
47. Koklu, A., Giuliani, J., Monton, C. and Beskok, A. (2020). Rapid and sensitive detection of nanomolecules by an ac electrothermal flow facilitated impedance immunosensor. *Analytical Chemistry*, 92(11), 7762–7769.
48. Hierlemann, A., Brand, O., Hagleitner, C. and Baltes, H. (2003). Microfabrication techniques for chemical/biosensors. *Proceedings of the IEEE*, 91(6), 839–863.
49. Taleat, Z., Khoshroo, A. and Mazloun-Ardakani, M. (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta*, 181(-10), 865–891.
50. Kadilak, A. L., Liu, Y., Shrestha, S., Bernard, J. R., Mustain, W. E. and Shor, L. M. (2014). Selective deposition of chemically-bonded gold electrodes onto PDMS microchannel side walls. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 727, 141–147.
51. Abdulbari, H. A. and Basheer, E. A. M. (2017). Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication. *ChemBioEng Reviews*, 4(2), 92–105.

52. Han, L., Liu, C. M., Dong, S. L., Du, C. X., Zhang, X. Y., Li, L. H. and Wei, Y. (2017). Enhanced conductivity of rGO/Ag NPs composites for electrochemical immunoassay of prostate-specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 466–472.
53. Liang, Y. R., Zhang, Z. M., Liu, Z. J., Wang, K., Wu, X. Y., Zeng, K., Meng, H. and Zhang, Z. (2017). A highly sensitive signal-amplified gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor for dibutyl phthalate detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 199–202.
54. Cai, X., Weng, S., Guo, R., Lin, L., Chen, W., Zheng, Z., Huang, Z. and Lin, X. (2016). Ratiometric electrochemical immunoassay based on internal reference value for reproducible and sensitive detection of tumor marker. *Biosensors and Bioelectronics*, 81, 173–180.
55. Ma, H., Li, X., Yan, T., Li, Y., Zhang, Y., Wu, D., Wei, Q. and Du, B. (2016). Electrochemiluminescent immunosensing of prostate-specific antigen based on silver nanoparticles-doped Pb (II) metal-organic framework. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 379–385.
56. Bahadir, E. B. and Sezginürk, M. K. (2016). Label-free, ITO-based immunosensor for the detection of a cancer biomarker: Receptor for Activated C Kinase 1. *Analyst*, 141(19), 5618–5626.
57. Fang, C. S., Oh, K. H., Oh, A., Lee, K., Park, S., Kim, S., Park, J. K. and Yang, H. (2016). An ultrasensitive and incubation-free electrochemical immunosensor using a gold-nanocatalyst label mediating outer-sphere-reaction-philic and inner-sphere-reaction-philic species. *Chemical Communications*, 52(34), 5884–5887.
58. Tertiş, M., Cernat, A., Lacatiş, D., Florea, A., Bogdan, D., Suciu, M., Săndulescu, R. and Cristea, C. (2017). Highly selective electrochemical detection of serotonin on polypyrrole and gold nanoparticles-based 3D architecture. *Electrochemistry Communications*, 75, 43–47.
59. Rahman, M. A., Kwon, N. H., Won, M. S., Choe, E. S. and Shim, Y. B. (2005). Functionalized conducting polymer as an enzyme-immobilizing substrate: An amperometric glutamate microbiosensor for in vivo measurements. *Analytical Chemistry*, 77(15), 4854–4860.
60. Arshak, K., Velusamy, V., Korostynska, O., Oliwa-Stasiak, K. and Adley, C. (2009). Conducting polymers and their applications to biosensors: Emphasizing on foodborne pathogen detection. *IEEE Sensors Journal*, 9(12), 1942–1951.
61. Soni, I., Kumar, P., Sharma, S. and Kudur Jayaprakash, G. (2021). A Short Review on Electrochemical Sensing of Commercial Dyes in Real Samples Using Carbon Paste Electrodes. *Electrochem*, 2(2), 274–294.
62. Jeong, S., Park, J., Pathania, D., Castro, C. M., Weissleder, R. and Lee, H. (2016). Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis. *ACS Nano*, 10(2), 1802–1809.

63. Nagles, E., García-Beltrán, O. and Calderón, J. A. (2017). Evaluation of the usefulness of a novel electrochemical sensor in detecting uric acid and dopamine in the presence of ascorbic acid using a screen-printed carbon electrode modified with single walled carbon nanotubes and ionic liquids. *Electrochimica Acta*, 258, 512–523.
64. Kampeera, J., Pasakon, P., Karuwan, C., Arunrut, N., Sappat, A., Sirithammajak, S., Dechokiattawan, N., Sumranwanich, T., Chaivisuthangkura, P., Ounjai, P., Chankhamhaengdech, S., Wisitsoraat, A., Tuantranont, A. and Kiatpathomchai, W. (2019). Point-of-care rapid detection of vibrio parahaemolyticus in seafood using loop-mediated isothermal amplification and graphene-based screen-printed electrochemical sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 132, 271–278.
65. Antuña-Jiménez, D., González-García, M. B., Hernández-Santos, D. and Fanjul-Bolado, P. (2020). Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing. *Biosensors*, 10(2), 171-178.
66. Boriachek, K., Masud, M. K., Palma, C., Phan, H. P., Yamauchi, Y., Hossain, M. S. A., Nguyen, N. T., Salomon, C. and Shiddiky, M. J. A. (2019). Avoiding pre-isolation step in exosome analysis: Direct isolation and sensitive detection of exosomes using gold-loaded nanoporous ferric oxide nanozymes. *Analytical Chemistry*, 91(6), 3827–3834.
67. Masud, M. K., Mahmudunnabi, R. G., Aziz, N. B., Stevens, C. H., Do-Ha, D., Yang, S., Blair, I. P., Hossain, M. S. A., Shim, Y. B., Ooi, L., Yamauchi, Y. and Shiddiky, M. J. A. (2020). Sensitive Detection of Motor Neuron Disease Derived Exosomal miRNA Using Electrocatalytic Activity of Gold-Loaded Superparamagnetic Ferric Oxide Nanocubes. *ChemElectroChem*, 7(16), 3459–3467.
68. Castrovilli, M. C., Bolognesi, P., Chiarinelli, J., Avaldi, L., Cartoni, A., Calandra, P., Tempesta, E., Giardi, M. T., Antonacci, A., Arduini, F. and Scognamiglio, V. (2020). Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 163, 112299-112305.
69. Razzino, C. A., Serafin, V., Gamella, M., Pedrero, M., Montero-Calle, A., Barderas, R., Calero, M., Lobo, A. O., Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S. and Pingarrón, J. M. (2020). An electrochemical immunosensor using gold nanoparticles-PAMAM-nanostructured screen-printed carbon electrodes for tau protein determination in plasma and brain tissues from Alzheimer patients. *Biosensors and Bioelectronics*, 163, 112238-112245.
70. Sanli, S., Moulahoum, H., Ugurlu, O., Ghorbanizamani, F., Gumus, Z. P., Evran, S., Coskunol, H. and Timur, S. (2020). Screen Printed Electrode-Based Biosensor Functionalized with Magnetic Cobalt/Single-Chain Antibody Fragments for Cocaine Biosensing in Different Matrices. *Talanta*, 217, 121111-121117.
71. Silva, N. F. D., Neves, M. M. P. S., Magalhães, J. M. C. S., Freire, C. and Delerue-Matos, C. (2020). Electrochemical Immunosensor Towards Invasion-Associated Protein p60: an Alternative Strategy for *Listeria Monocytogenes* Screening in Food. *Talanta*, 216, 120976- 120982.

72. Uygun, Z. O., Yeniay, L. and Girgin Sağın, F. (2020). CRISPR-dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs. *Analytica Chimica Acta*, 1121, 35–41.
73. Yu, J., Ge, L., Huang, J., Wang, S. and Ge, S. (2011). Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. *Lab on a Chip*, 11(7), 1286–1291.
74. Comer, J. P. (1953). Handbook of Chemistry. *Stain Technol*, 28(1), 44-48.
75. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J. and Whitesides, G. M. (2007). Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie*, 119(8), 1340–1342.
76. Dungchai, W., Chailapakul, O. and Henry, C. S. (2009). Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81(14), 5821–5826.
77. Bracher, P. J., Gupta, M. and Whitesides, G. M. (2010). Patterning precipitates of reactions in paper. *Journal of Materials Chemistry*, 20(24), 5117–5122.
78. Jesuet, M. S. G., Musa, N. M., Idris, N. M., Musa, D. N. S. and Bakansing, S. M. (2019). Properties of nitrocellulose from acacia mangium. *Journal of Physics: Conference Series*, 1358(1), 125-128.
79. Jamal, S. H., Roslan, N. J., Shah, N. A. A., Noor, S. A. M., Ong, K. K. and Yunus, W. M. Z. W. (2019). Preparation and characterization of nitrocellulose from bacterial cellulose for propellant uses. *Materials Today: Proceedings*, 29, 185–189.
80. Trache, D., Khimeche, K., Mezroua, A. and Benziane, M. (2016). Physicochemical properties of microcrystalline nitrocellulose from alfa grass fibres and its thermal stability. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 124(3), 1485–1496.
81. Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Scurlock, J. M. O. and Huisman, W. (2000). Miscanthus: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 19, 28-36.
82. Lin, W. C., Lien, C. C., Yeh, H. J., Yu, C. M. and Hsu, S. H. (2013). Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 603–611.
83. Yu, F., Quan, F., Xu, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zhang, J., Lan, Y., Yuan, H., Zhang, H., Cheng, S., Xiao, Y. and Li, X. (2019). Breast cancer prognosis signature: Linking risk stratification to disease subtypes. *Briefings in Bioinformatics*, 20(6), 2130–2140.
84. Gutiérrez-capitán, M., Baldi, A. and Fernández-sánchez, C. (2020). Electrochemical paper-based biosensor devices for rapid detection of biomarkers. *Sensors (Switzerland)*, 20(4), 41-48.
85. Tan, S. N., Ge, L., Tan, H. Y., Loke, W. K., Gao, J. and Wang, W. (2012). Paper-based enzyme immobilization for flow injection electrochemical biosensor integrated with reagent-loaded cartridge toward portable modular device. *Analytical Chemistry*, 84(22), 10071–10076.

86. Silveira, C. M., Monteiro, T. and Almeida, M. G. (2016). Biosensing with paper-based miniaturized printed electrodes-a modern trend. *Biosensors*, 6(4), 151-153.
87. Karuppiyah, S., Mishra, N. C., Tsai, W.-C., Liao, W.-S. and Chou, C.-F. (2021). Ultrasensitive and Low-Cost Paper-Based Graphene Oxide Nanobiosensor for Monitoring Water-Borne Bacterial Contamination. *ACS Sensors*, 6(9), 3214–3223.
88. Rengaraj, S., Cruz-Izquierdo, Á., Scott, J. L. and di Lorenzo, M. (2018). Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 265, 50–58.
89. Ruecha, N., Rangkupan, R., Rodthongkum, N. and Chailapakul, O. (2014). Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/polyvinylpyrrolidone/polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 13–19.
90. Bouri, M., Zuaznabar-Gardona, J. C., Novell, M., Blondeau, P. and Andrade, F. J. (2021). Paper-based potentiometric biosensor for monitoring galactose in whole blood. *Electroanalysis*, 33(1), 81–89.
91. Eksin, E., Torul, H., Yarali, E., Tamer, U., Papakonstantinou, P. and Erdem, A. (2021). Paper-Based Electrode Assemble for Impedimetric Detection of miRNA. *Talanta*, 225, 122043-122048.
92. Narang, J., Malhotra, N., Singhal, C., Mathur, A., Chakraborty, D., Anil, A., Ingle, A. and Pundir, C. S. (2017). Point of care with micro fluidic paper based device integrated with nano zeolite–graphene oxide nanoflakes for electrochemical sensing of ketamine. *Biosensors and Bioelectronics*, 88, 249–257.
93. Panraksa, Y., Siangproh, W., Khampieng, T., Chailapakul, O. and Apilux, A. (2018). Paper-Based Amperometric Sensor for Determination of Acetylcholinesterase Using Screen-Printed Graphene Electrode. *Talanta*, 178, 1017–1023.
94. Wang, S., Ge, L., Song, X., Yu, J., Ge, S., Huang, J. and Zeng, F. (2012). Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 212–218.
95. Wu, Y., Xue, P., Hui, K. M. and Kang, Y. (2014). Electrochemical- and Fluorescent-Mediated Signal Amplifications for Rapid Detection of Low-Abundance Circulating Tumor Cells on a Paper-Based Microfluidic Immunodevice. *ChemElectroChem*, 1(4), 722–727.
96. Ratnarathorn, N., Chailapakul, O., Henry, C. S. and Dungchai, W. (2012). Simple Silver Nanoparticle Colorimetric Sensing for Copper by Paper-Based Devices. *Talanta*, 250(1), 99, 552–557.
97. Liu, H., Zhao, P., Wang, Y., Li, S., Zhang, L., Zhang, Y., Ge, S. and Yu, J. (2020). Paper-based sandwich type SERS sensor based on silver nanoparticles and biomimetic recognizer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 313, 127989-127997.

98. Nantaphol, S., Kava, A. A., Channon, R. B., Kondo, T., Siangproh, W., Chailapakul, O. and Henry, C. S. (2019). Janus electrochemistry: simultaneous electrochemical detection at multiple working conditions in a paper-based analytical device. *Analytica Chimica Acta*, 1056, 88–95.
99. Yang, H., Kong, Q., Wang, S., Xu, J., Bian, Z., Zheng, X., Ma, C., Ge, S. and Yu, J. (2014). Hand-drawn&written pen-on-paper electrochemiluminescence immunodevice powered by rechargeable battery for low-cost point-of-care testing. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 21–27.
100. Li, W., Li, L., Li, S., Wang, X., Li, M., Wang, S. and Yu, J. (2013). 3D origami electrochemiluminescence immunodevice based on porous silver-paper electrode and nanoporous silver double-assisted signal amplification. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 188, 417–424.
101. Ji, S., Lee, M. and Kim, D. (2018). Detection of early stage prostate cancer by using a simple carbon nanotube@paper biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 345–350.
102. Liu, H. and Crooks, R. M. (2011). Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44), 17564–17566.
103. Huang, G. W., Feng, Q. P., Xiao, H. M., Li, N. and Fu, S. Y. (2016). Rapid Laser Printing of Paper-Based Multilayer Circuits. *ACS Nano*, 10(9), 8895–8903.
104. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J. and Whitesides, G. M. (2007). Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8), 1318–1320.
105. Asano, H. and Shiraishi, Y. (2015). Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography. *Analytica Chimica Acta*, 883, 55–60.
106. Lu, R., Shi, W., Jiang, L., Qin, J. and Lin, B. (2009). Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 30(9), 1497–1500.
107. De Oliveira, T. R., Fonseca, W. T., de Oliveira Setti, G. and Faria, R. C. (2019). Fast and Flexible Strategy to Produce Electrochemical Paper-Based Analytical Devices Using a Craft Cutter Printer to Create Wax Barrier and Screen-Printed Electrodes. *Talanta*, 195(1), 480–489.
108. Arduini, F., Cinti, S., Caratelli, V., Amendola, L., Palleschi, G. and Moscone, D. (2019). Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 346–354.
109. Olkkonen, J., Lehtinen, K. and Erho, T. (2010). Flexographically printed fluidic structures in paper. *Analytical Chemistry*, 82(24), 10246–10250.

110. Ma, C., Li, W., Kong, Q., Yang, H., Bian, Z., Song, X., Yu, J. and Yan, M. (2015). 3D origami electrochemical immunodevice for sensitive point-of-care testing based on dual-signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 63, 7–13.
111. Bhardwaj, J., Devarakonda, S., Kumar, S. and Jang, J. (2017). Development of a paper-based electrochemical immunosensor using an antibody-single walled carbon nanotubes bio-conjugate modified electrode for label-free detection of foodborne pathogens. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 253, 115–123.
112. Medina-Sánchez, M., Cadevall, M., Ros, J. and Merkoçi, A. (2015). Eco-friendly electrochemical lab-on-paper for heavy metal detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(28), 8445–8449.
113. Wang, X., Lin, G., Cui, G., Zhou, X. and Liu, G. L. (2017). White blood cell counting on smartphone paper electrochemical sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 549–557.
114. Bee Chin LEE, V., Faizah MOHD-NAIM, N., Tamiya, E. and Uddin AHMED, M. (2018). Trends in Paper-based Electrochemical Biosensors: From Design to Application. *Analytical Sciences*, 34, 178-185.
115. Cocucci, E. and Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 364–372.
116. Kalluri, R. and LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367, 6478-6517.
117. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. and Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659.
118. Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383.
119. Tan, S. S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Zhang, B., Choo, A. and Lim, S. K. (2013). Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 22614.
120. Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205–212.
121. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. and Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*, 9(1), 163-175.
122. İnanır, C. and Ekici, L. (2020). Eksozomlar: Kompozisyonları, Biyolojik Fonksiyonları ve Biyoaktif Bileşiklerin Taşınmasındaki Potansiyelleri. *Akademik Gıda*, 421–432.
123. Théry, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569–579.

124. Chiriaco, M. S., Bianco, M., Nigro, A., Primiceri, E., Ferrara, F., Romano, A., Quattrini, A., Furlan, R., Arima, V. and Maruccio, G. (2018). Lab-on-chip for exosomes and microvesicles detection and characterization. *Sensors (Switzerland)*, 18(10), 81-89.
125. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammonds, J. R., Orro, L. and Turbide, C. (1987). Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation Association Of Plasma Membrane Activities With Released Vesicles (Exosomes), *The Journal of Biological Chemistry*, 262(9), 179-195.
126. Desdín-Micó, G. and Mittelbrunn, M. (2017). Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adhesion and Migration*. Taylor and Francis Inc. 11(2), 127–134.
127. Aheget, H., Mazini, L., Martin, F., Belqat, B., Marchal, J. A. and Benabdellah, K. (2021). Exosomes: Their role in pathogenesis, diagnosis and treatment of diseases. *Cancers*, 13(1), 1–45.
128. Altevogt, P., Bretz, N. P., Ridinger, J., Utikal, J. and Umansky, V. (2014). Novel insights into exosome-induced, tumor-associated inflammation and immunomodulation. *Seminars in Cancer Biology*, 28, 51–57.
129. Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920.
130. Kastelowitz, N. and Yin, H. (2014). Exosomes and microvesicles: Identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. *ChemBioChem*, 15(7), 923–928.
131. Comisso, C., Davidson, S. M., Soydaner-Azeloglu, R. G., Parker, S. J., Kamphorst, J. J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J. A., Thompson, C. B., Rabinowitz, J. D., Metallo, C. M., vander Heiden, M. G. and Bar-Sagi, D. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 497(7451), 633–637.
132. Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y. and Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12048–12053.
133. Wiklander, O. P. B., Nordin, J. Z., O’Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Edvard Smith, C. I., le Blanc, K., Macchiarelli, P., Jungebluth, P., Wood, M. J. A. and el Andaloussi, S. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(2015), 1–13.
134. Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Laheesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A. and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1969–1978.

135. Suetsugu, A., Honma, K., Saji, S., Moriwaki, H., Ochiya, T. and Hoffman, R. M. (2013). Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 383–390.
136. Bryant, R. J., Pawlowski, T., Catto, J. W. F., Marsden, G., Vessella, R. L., Rhee, B., Kuslich, C., Visakorpi, T. and Hamdy, F. C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 106(4), 768–774.
137. Jalalian, S. H., Ramezani, M., Jalalian, S. A., Abnous, K. and Taghdisi, S. M. (2019). Exosomes, new biomarkers in early cancer detection. *Analytical Biochemistry*, 571, 1–13.
138. Zhao, L., Yu, J., Wang, J., Li, H., Che, J. and Cao, B. (2017). Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *Journal of Cancer*, 8(7), 1145–1152.
139. Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., Tao, Y., He, Z., Chen, C. and Jiang, Y. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 19–30.
140. Khushman, M., Bhardwaj, A., Patel, G. K., Laurini, J. A., Roveda, K., Tan, M. C., Patton, M. C., Singh, S., Taylor, W. and Singh, A. P. (2017). Exosomal Markers (CD63 and CD9) Expression Pattern Using Immunohistochemistry in Resected Malignant and Nonmalignant Pancreatic Specimens. *Pancreas*, 46(6), 782–788.
141. Chen, S., Jiang, T., Lin, H., Chen, J., Yang, S., Wang, P., Gan, X., Wang, Y., Xu, B., Sun, J., Yin, C., Huang, Z. and Fang, Y. (2021). Fast and ultrasensitive visual detection of exosomes in body fluids for point-of-care disease diagnosis. *Analytical Chemistry*, 93(29), 10372–10377.
142. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A. and Vlassov, A. v. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), 1128–1145.
143. Aghabozorgi, A. S., Bahreyni, A., Soleimani, A., Bahrami, A., Khazaei, M., Ferns, G. A., Avan, A. and Hassanian, S. M. (2019). Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*, 157, 64–71.
144. Atkin, W. S., Kralj-Hans, I., Edwards, R., Duff, S. W., Cuzick, J., Atkin, W. S., Edwards, R., Kralj-Hans, I., Wooldrage, K., Hart, A. R., A Northover, J. M., Max Parkin, D., Wardle, J., Duff, S. W. and Cuzick, J. (2010). Articles Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*, 375, 1624–1633.
145. Ni, Y., Xie, G. and Jia, W. (2014). Metabonomics of human colorectal cancer: New approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, 13(9), 3857–3870.

146. Zhou, Y., Wu, Y., Pokhonenko, O., Papper, V., Marks, R. S. and Steele, T. W. J. (2019). Design and optimisation of photochrome aptamer switch assay (PHASA). *Analytica Chimica Acta*, 1061, 134–141.
147. Zhou, J., Meng, L., Ye, W., Wang, Q., Geng, S. and Sun, C. (2018). A sensitive detection assay based on signal amplification technology for alzheimer's disease's early biomarker in exosome. *Analytica Chimica Acta*, 1022, 124–130.
148. Pang, Y., Wang, C., Lu, L. C., Wang, C., Sun, Z. and Xiao, R. (2019). Dual-SERS biosensor for one-step detection of microRNAs in exosome and residual plasma of blood samples for diagnosing pancreatic cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 204–213.
149. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S. and Kim, M. (2015). Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Switzerland)*, 15(5), 10481–10510.
150. Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P. and Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780–788.
151. Van der Pol, E., Hoekstra, A. G., Sturk, A., Otto, C., van Leeuwen, T. G. and Nieuwland, R. (2010). Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(12), 2596–2607.
152. Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S. and Li, P. (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917–6934
153. Escamilla-Gómez, V., Hernández-Santos, D., González-García, M. B., Pingarrón-Carrazón, J. M. and Costa-García, A. (2009). Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8), 2678–2683.
154. Magar, H. S., Hassan, R. Y. A. and Mulchandani, A. (2021). Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. *Sensors*, 21(19), 6578–6598.
155. Boukamp, B. A. (1993). SOLID STATE IOLILCS Practical application of the Kramers-Kronig transformation on impedance measurements in solid state electrochemistry. *Solid State Ionics*, 62, 951–960.
156. Sani, U. S. and Shanono, I. (2014). An Equivalent Circuit of Carbon Electrode Supercapacitors. *Nigeria Engineering Conference*.
157. Gerengi, H., Darowicki, K., Slepiski, P., Bereket, G. and Ryl, J. (2010). Investigation effect of benzotriazole on the corrosion of brass-MM55 alloy in artificial seawater by dynamic EIS. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 14(5), 897–902.

158. Yu, Y., Li, Y. T., Jin, D., Yang, F., Wu, D., Xiao, M. M., Zhang, H., Zhang, Z. Y. and Zhang, G. J. (2019). Electrical and label-free quantification of exosomes with a reduced graphene oxide field effect transistor biosensor. *Analytical Chemistry*, 91(16), 10679–10686.
159. Niu, W. J., Zhu, R. H., Cosnier, S., Zhang, X. J. and Shan, D. (2015). Ferrocyanide-ferricyanide redox couple induced electrochemiluminescence amplification of carbon dots for ultrasensitive sensing of glutathione. *Analytical Chemistry*, 87(21), 11150–11156.
160. Deng, S. Y., Zhang, T., Shan, D., Wu, X. Y., Dou, Y. Z., Cosnier, S. and Zhang, X. J. (2014). Unusual Fe(CN)₆^{3-/4-} capture induced by synergic effect of electropolymeric cationic surfactant and graphene: characterization and biosensing application. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(23), 21161–21166.
161. Lisdat, F. and Schäfer, D. (2008). The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5), 1555–1567.
162. Wang, M., Wang, L., Wang, G., Ji, X., Bai, Y., Li, T., Gong, S. and Li, J. (2004). Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 575–582.
163. Tanak, A. S., Jagannath, B., Tamrakar, Y., Muthukumar, S. and Prasad, S. (2019). Non-faradaic electrochemical impedimetric profiling of procalcitonin and C-reactive protein as a dual marker biosensor for early sepsis detection. *Analytica Chimica Acta: X*, 3, 100029-100039.
164. Katz, E. and Willner, I. (2003). Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis*, 15(11), 913-945.
165. Kazusaki, M., Ueda, S., Takeuchi, N. and Ohgami, Y. (2012). Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatography*, 33(2), 215-218.
166. Hayashi, Y., Matsuda, R., Ito, K., Nishimura, W., Imai, K. and Maeda, M. (2005). Introduction Detection Limit Estimated from Slope of Calibration Curve: An Application to Competitive ELISA. *Analytical Sciences*, 21(2), 165-169.
167. Hayashi, Y., Matsuda, R., Maitani, T., Imai, K., Nishimura, W., Ito, K. and Maeda, M. (2004). Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive elisa. *Analytical Chemistry*, 76(5), 1295–1301.
168. Lavín, Á., de Vicente, J., Holgado, M., Laguna, M. F., Casquel, R., Santamaría, B., Maigler, M. V., Hernández, A. L. and Ramírez, Y. (2018). On the determination of uncertainty and limit of detection in label-free biosensors. *Sensors (Switzerland)*, 18(7), 485-492.

169. Rozet, E., Ziemons, E., Marini, R. D. and Hubert, P. (2013). Usefulness of information criteria for the selection of calibration curves. *Analytical Chemistry*, 85(13), 6327–6335.
170. İnternet: Frost, J. How to Choose Between Linear and Nonlinear Regression. URL: <https://statisticsbyjim.com/regression/choose-linear-nonlinear-regression/>, Son Erişim Tarihi: 19.01.2023.
171. Bu, L., Shen, B. and Cheng, Z. (2014). Fluorescent imaging of cancerous tissues for targeted surgery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 76(1), 21–38.
172. Varshosaz, J., Ghassami, E., Noorbakhsh, A., Jahanian-Najafabadi, A. and Minayian, M. (2019). Implementation of electrochemical impedance spectroscopy to evaluate HER-2 aptamer conjugation to Ecoflex® nanoparticles for docetaxel delivery in breast cancer cells. *Journal of Applied Electrochemistry*, 49(1), 87–97.
173. Swainson, N. M., Aiemderm, P., Saikaew, C., Theeraraksakul, K., Rimdusit, P., Kraiya, C., Unajak, S. and Choowongkomon, K. (2021). Biosensors for the detection of organophosphate exposure by a new diethyl thiophosphate-specific aptamer. *Biotechnology Letters*, 43(9), 1869–1881.
174. Abrao Nemeir, I., Mouawad, L., Saab, J., Hleihel, W., Errachid, A. and Zine, N. (2020). Electrochemical Impedance Spectroscopy Characterization of Label-free Biosensors for the Detection of HER2 in Saliva. *The 1st International Electronic Conference on Biosensors*, 60(1), 17–25.
175. Liu, W., Li, J., Wu, Y., Xing, S., Lai, Y. and Zhang, G. (2018). Target-induced proximity ligation triggers recombinase polymerase amplification and transcription-mediated amplification to detect tumor-derived exosomes in nasopharyngeal carcinoma with high sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 204–210.
176. Li, T. da, Zhang, R., Chen, H., Huang, Z. P., Ye, X., Wang, H., Deng, A. M. and Kong, J. L. (2018). An ultrasensitive polydopamine bi-functionalized SERS immunoassay for exosome-based diagnosis and classification of pancreatic cancer. *Chemical Science*, 9(24), 5372–5382.
177. Xu, H., Liao, C., Zuo, P., Liu, Z. and Ye, B. C. (2018). Magnetic-based microfluidic device for on-chip isolation and detection of tumor-derived exosomes. *Analytical Chemistry*, 90(22), 13451–13458.
178. Chen, J., Xu, Y., Lu, Y. and Xing, W. (2018). Isolation and visible detection of tumor-derived exosomes from plasma. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14207–14215.
179. Shmaefsky, B. R. (1990). A Comparison of the Heart Rate of Male Subjects While Resting and Reading Aloud How-To-Do-It Artificial Urine for Laboratory Testing. *The American Biology Teacher*, 52(3), 170–172.
180. Da Silva, E. T. S. G., Souto, D. E. P., Barragan, J. T. C., de F. Giarola, J., de Moraes, A. C. M. and Kubota, L. T. (2017). Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem*, 4(4), 778–794.

181. Kore, R. A., Henson, J. C., Hamzah, R. N., Griffin, R. J., Tackett, A. J., Ding, Z. and Mehta, J. L. (2019). Molecular events in MSC exosome mediated cytoprotection in cardiomyocytes. *Scientific Reports*, 9(1), 141-162.
182. Pan, S., Pei, L., Zhang, A., Zhang, Y., Zhang, C., Huang, M., Huang, Z., Liu, B., Wang, L., Ma, L., Zhang, Q. and Cui, D. (2020). Passion fruit-like exosome-PMA/Au-BSA@Ce6 nanovehicles for real-time fluorescence imaging and enhanced targeted photodynamic therapy with deep penetration and superior retention behavior in tumor. *Biomaterials*, 230, 119606-119616.
183. Rafighdoust, Z., Baharara, J., Forghanifard, M. M. and Kerachian, M. A. (2021). Isolation and Characterization of Exosomes Derived From Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line. *Gene, Cell and Tissue*, 8(1), 36-39.
184. Joshi, S., Raj, K. A., Rao, M. R. and Ghosh, R. (2022). An electronic biosensor based on semiconducting tetrazine polymer immobilizing matrix coated on rGO for carcinoembryonic antigen. *Scientific Reports*, 12(1), 48-62.
185. Ashley, J., D'Aurelio, R., Piekarska, M., Temblay, J., Pleasants, M., Trinh, L., Rodgers, T. L. and Tothill, I. E. (2018). Development of a β -Lactoglobulin sensor based on SPR for milk allergens detection. *Biosensors*, 8(2), 14-19.
186. An, Y., Li, R., Zhang, F. and He, P. (2020). Magneto-mediated electrochemical sensor for simultaneous analysis of breast cancer exosomal proteins. *Analytical Chemistry*, 92(7), 5404–5410.
187. An, Y., Jin, T., Zhu, Y., Zhang, F. and He, P. (2019). An ultrasensitive electrochemical aptasensor for the determination of tumor exosomes based on click chemistry. *Biosensors and Bioelectronics*, 142, 111503-111509.
188. Chen, X., Lan, J., Liu, Y., Li, L., Yan, L., Xia, Y., Wu, F., Li, C., Li, S. and Chen, J. (2018). A paper-supported aptasensor based on upconversion luminescence resonance energy transfer for the accessible determination of exosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 582–588.
189. Liu, X., Gao, X., Yang, L., Zhao, Y. and Li, F. (2021). Metal-organic framework-functionalized paper-based electrochemical biosensor for ultrasensitive exosome assay. *Analytical Chemistry*, 93(34), 11792–11799.
190. Yang, H., Zhao, J., Dong, J., Wen, L., Hu, Z., He, C., Xu, F., Huo, D. and Hou, C. (2022). Simultaneous detection of exosomal microRNAs by nucleic acid functionalized disposable paper-based sensors. *Chemical Engineering Journal*, 438, 135594-135602.



Gazili olmak ayrıcalıktır