



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**GALAKTOZEMİ TANISI VE TEDAVİSİNİN
İZLENMESİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR TEMELLİ
YÖNTEMLER GELİŞTİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Erhan CANBAY

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**GALAKTOZEMİ TANISI VE TEDAVİSİNİN
İZLENMESİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR TEMELLİ
YÖNTEMLER GELİŞTİRİLMESİ**

Erhan CANBAY

Danışman

Doç. Dr. Ebru SEZER

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Dereceli Doktora

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 16.08.2022

Önsöz

Gerek lisans dönemimde gerekse de lisansüstü dönemde karbohidrat metabolizması dersini işlerken adını duyduğum bir metabolik hastalığı galaktozemi. Galaktozemi konusundaki farkındalığım ise Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında LC MS MS cihazı ile tanışmamla oldu. Galaktozeminin en sık görülen görülen varyantında Galaktozil Uridil Transferaz yani kısaca GALT adı verilen enzimin eksikliği söz konusudur. Bu eksikliğin tespiti için kolorimetrik/florometrik kitlerin yanında LC MS MS temelli bir yöntemde vardı. O dönem için GALT testi için ciddi bir talep söz konusuydu. Nitekim sonrasında Doç. Dr. Ebru Sezer hocamın da özellikle bu ihtiyacı belirtmesiyle uzmanlık öğrencisi olan Uzm. Dr. Muhammet Topbaş ile birlikte GALT enzim aktivitesinin tespitine yönelik bir LC MS MS yöntemi geliştirip validasyonunu yaptık. GALT için talep o kadar fazlaydı ki bizim çalışmamızın bitmesi beklenmeden kolorimetrik/florometrik kit alımı yapılmıştı bile. Bu kit ile hem galaktoz hem de galaktoz-1-fosfat tayini yapılabilirdi. Kolorimetrik kit enzim temelliydi ve kullandığı enzimlerde galaktoz dehidrogenaz ve alkalen fosfatazı. Biyosensör geçmişim bu enzimleri görünce kafamda bir kıvılcım yaktı ve kendime şu soruyu sordum: “Acaba bu enzim sistemini elektrot yüzeyine taşısam total galaktoz tayinini biyosensörle yapamaz mıyım?”. Evet, galaktoz ve galaktoz-1-fosfat düzeylerini ölçen hali hazırda yöntemler vardı ve güzel çalışıyordu. Ama test başı maliyet açısından düşündüğümüzde kolorimetrik kit pahalı oluyordu. Test başı maliyetin daha ucuz olduğu LC MS MS yöntemi vardı ama LC MS MS cihazı mükemmelliğine paralel pahalılıkta ekipmanlara, bakım ve onarım maliyetine sahipti. Yani cihaz çalışırken çok verimliydi ama ya bozulursa! Üstelik her iki yöntemde yerinde ölçüme yani “point of care”a olanak tanımıyordu. Hal böyle olunca kafamda bir terazi ile yöntemleri tarttım. Terazinin biyosensör kefi daha ağır basınca böyle bir tez projesi yapmaya karar verdim. İyi ki de öyle yapmışım. Çünkü taradığımız kadarıyla literatürde ilk defa bu çalışma ile birlikte galaktoz-1-fosfat düzeyini ölçen bir biyosensör yapılmış oldu. Dahası bu tez de geliştirilen biyosensör POCT olma yolunda da ciddi bir potansiyel taşıyor.

“İhtiyaç, değeri tanımlar” Stephen King. Bu tez çalışmasının değerini de ona olan ihtiyaç tanımlıyor bir yerde...

Özet

Galaktozemi Tanısı ve Tedavisinin İzlenmesine Yönelik Biyosensör Temelli Yöntemler Geliştirilmesi

Galaktozemi galaktoz metabolizmasındaki bazı enzimlerin (GALT, GALK, GALE) az veya hiç sentezlenememesi sonucu ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. Özellikle yenidoğanlarda erken tanı konulamaması ağır klinik, hatta ölümcül sonuçlar doğurabilir. Bu projenin amacını biri plazmada serbest galaktoz düzeyini ölçen diğeri de eritrosit hemolizatında total galaktoz (galaktoz+Galaktoz-1-fosfat) düzeyini ölçen iki biyosensör geliştirilmesi oluşturmaktadır. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün immobilizasyon bileşenlerini screen printed karbon elektrot, prusyan blue, kitosan, nafyon, altın nanopartikül ve galaktoz oksidaz oluştururken total galaktoz biyosensöründe yapıya alkalen fosfataz dahil olmaktadır. Biyosensörün yüzey karakterizasyonu döngüsel voltametri ve taramalı elektron mikroskobu ile yapılırken, optimizasyon ve performans karakterizasyonları amperometri tekniği uygulanarak yapılmıştır. Serbest galaktoz biyosensörü için amperometrik çalışma potansiyeli olarak -0,05 V belirlenirken total galaktoz biyosensörü için -0,1 V belirlenmiştir. İmmobilizasyon bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Serbest galaktoz biyosensörü için doğrusal tayin aralığı 0,025-10 mM arasındadır. Bu aralık hem sağlıklı bireylerin hem de hastaların plazmasındaki galaktoz seviyelerini içermektedir. Total galaktoz biyosensörünün Galaktoz-1-fosfat (Gal-1-P) için doğrusal tayin aralığı ise 0,1-10 mM arasında bulunmuştur. Bu aralık klasik tip galaktozemili hastaların eritrosit Gal-1-P düzeylerini içerirken sağlıklıların eser miktardaki Gal-1-P düzeylerini kapsamamaktadır. Her iki biyosensörün de gün içi ve günler arası üç seviye tekrarlanabilirliği için hesaplanan %Varyasyon Katsayısı (VK) değerleri kabul edilebilir limit olan %15'in altındadır. Serbest galaktoz biyosensörünün tekrar üretilebilirliği için hesaplanan %VK %7,78; total galaktoz biyosensörü için hesaplanan %VK değeri ise 8,75'tir. Sağlıklı ve hasta galaktoz düzeylerini içeren plazma örneklerinde galaktoz tayini yapılırken hasta düzeylerini içeren eritrosit hemolizatlarında ise Gal-1-P tayini yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörlerin plazma ve hemolizat matrislerinde doğru ölçüm yaptıkları hem %

geri elde deneyleriyle hem de yöntem karşılaştırılmasıyla gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında geliştirilen yeni galaktoz biyosensörlerinin benzersiz analitik özellikleri ve zahmetsiz hazırlanması, onları hasta başı tanı testi uygulaması için ciddi birer aday haline getirmektedir.

Anahtar Kelimeler; galaktoz, galaktoz-1-fosfat, biyosensör, galaktozemi, kitosan, nafyon

Abstract

Development of Biosensor-Based Methods for Monitoring Galactosemia

Diagnosis and Treatment

Galactosemia is an inherited disease that occurs as a result of insufficient or no synthesis of specific enzymes (GALT, GALK, GALE) in galactose metabolism. Failure to make an early diagnosis, especially in newborns, can lead to severe clinical and even fatal consequences. The aim of this project is to develop two biosensors, one measuring free galactose levels in plasma and the other measuring total galactose (galactose+Gal-1-P) levels in erythrocyte hemolysate. While screen printed carbon electrode, prussian blue, chitosan, nafion, gold nanoparticle and galactose oxidase are the immobilization components of the developed free galactose biosensor, alkaline phosphatase is included in the structure of the total galactose biosensor. While the surface characterization of the biosensor was performed with cyclic voltammetry and scanning electron microscopy, the optimization and performance characterizations were made by applying the amperometry technique. For the free galactose biosensor, -0.05 V was determined as the amperometric operating potential, while -0.1 V was determined for the total galactose biosensor. The linear detection range for the free galactose biosensor is between 0.025-10 mM. This range involves galactose levels in plasma of both healthy subjects and galactosemia patients. The linear detection range for Gal-1-P of the total galactose biosensor was found to be between 0.1 and 10 mM. This range involves erythrocyte Gal-1-P levels of patients with classical type galactosemia, but not Gal-1-P levels of healthy subjects. The %CV values calculated for the intra-day and inter-day three-level reproducibility of both biosensors are below the acceptable limit of 15%. The % CV calculated for the reproducibility of the free galactose biosensor was 7.78%, the %CV value calculated for the total galactose biosensor is 8.75. While galactose was determined in plasma samples containing healthy and patient galactose levels, Gal-1-P was determined in erythrocyte hemolysates containing patient levels. It has been shown that the developed biosensors make accurate measurements in plasma and hemolysate matrices, both by % recovery trials and by method comparisons. The

unique analytical properties and effortless preparation of the new galactose biosensors developed in this thesis make them notable candidates for point-of-care diagnostic testing.

Keywords; galactose, galactose-1-phosphate, biosensor, galactosemia, chitosan, nafion

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	XIII
Şekiller Dizini	XV
Kısaltma Listesi	XXI
Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	3
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Galaktozemi.....	4
2.2. Amperometrik enzim biyosensörleri.....	9
2.3. Alkalen fosfataz	12
2.4. Nafion	13

2.5. Kitosan	15
2.6. Prussian Blue	17
2.6.1. Kimyasal reaksiyon yöntemi	19
2.6.2. Elektrokimyasal depozisyon yöntemi.....	20
2.7. Screen Printed Elektrotlar	21
3. Gereç ve Yöntem	23
3.1. Gereç.....	23
3.1.1. Çalışmada kullanılan gereçler ve kimyasallar	23
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	25
3.2.2. Örneklerin toplanması.....	26
3.2.3. Serbest galaktoz biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar	26
3.2.3.1. Serbest galaktoz biyosensörünün hazırlanması	26
3.2.3.2. Serbest galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi.....	28
3.2.3.3. İmmobilizasyon konfigürasyonunun belirlenmesi	30
3.2.3.4. Kitosan konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	31
3.2.3.5. Nafyon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	31
3.2.3.6. Damlatma hacminin biyosensör cevabına etkisi	31
3.2.3.7. Altın nano partikül kullanılmasının biyosensör cevabına etkisi	32
3.2.3.8. Galaktoz oksidaz miktarının biyosensör cevabına etkisi	32

3.2.3.9. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün optimum pH'nın belirlenmesi.....	32
3.2.3.10. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	32
3.2.3.11. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	33
3.2.3.12. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği	33
3.2.3.13. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliği ve girişimci etkisinin belirlenmesi	33
3.2.3.14. Örnek uygulaması denemesi	34
3.2.3.15. Serbest galaktoz biyosensörünün depo karalılığı.....	35
3.2.4. Total galaktoz biyosensörünün geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar	35
3.2.4.1. Total galaktoz biyosensörünün hazırlanması.....	35
3.2.4.2. Total galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi	35
3.2.4.3. Alkalen fosfataz miktarının biyosensör cevabına etkisi	36
3.2.4.4. Geliştirilen total galaktoz biyosensörün optimum pH'nın belirlenmesi ...	36
3.2.4.5. Geliştirilen total galaktoz biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	37
3.2.4.6. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	37
3.2.4.7. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği	37
3.2.4.8. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliği	37

3.2.4.9. Total galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması denemesi.....	38
3.2.4.10. Total galaktoz biyosensörünün depo karalılığı	38
4. Bulgular.....	39
4.1. Serbest Galaktoz Biyosensörüne İlişkin Bulgular.....	39
4.1.1. Modifiye elektrotların elektrokimyasal davranışına ilişkin bulgular	39
4.1.2. Modifiye elektrodun yüzey morfolojisine ilişkin bulgular	51
4.1.3. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular	52
4.1.4. İmmobilizasyon konfigürasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgular	53
4.1.5. Kitosan miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	55
4.1.6. Nafyon miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	57
4.1.7. Damlatma hacminin optimizasyonuna ilişkin bulgular	59
4.1.8. GNP'nin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	60
4.1.9. Galaktoz oksidaz konsantrasyonunun optimizasyonuna ilişkin bulgular	63
4.1.10. Serbest galaktoz biyosensörünün pH optimizasyonuna ilişkin bulgular	64
4.1.11. Serbest galaktoz biyosensörünün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular	65
4.1.12. Serbest galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin bulgular	65
4.1.13. Serbest galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğine ilişkin bulgular	69
4.1.14. Serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliği ve girişim etkisine ilişkin bulgular.....	71

4.1.15. Serbest galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması ve geri eldesine ilişkin bulgular.....	74
4.1.16. Serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular.....	77
4.2. Total Galaktoz Biyosensörü İle İlgili Bulgular.....	78
4.2.1. Total galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin bulgular	78
4.2.2. Total galaktoz biyosensörünün galaktoz-1-fosfata cevabına ilişkin bulgular	79
4.2.3. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular	81
4.2.4. Alkalen fosfatazın optimizasyonuna ilişkin bulgular	82
4.2.5. Total galaktoz biyosensörünün pH ve sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular	84
4.2.6. Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı	86
4.2.7. Total galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği	91
4.2.8. Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı.....	93
4.2.9. Total Galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması ve geri eldesine ilişkin bulgular	95
4.2.10. Total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular	98
5. Tartışma	100
6. Sonuç ve Öneriler	119
Kaynaklar	122
Ekler	143

Teşekkür	150
Özgeçmiş	151

Tablolar Dizini

Tablo 1. Galaktozeminin anahatları	8
Tablo 2. Tez projesi kapsamında kullanılan gereçlerin adları, marka ve modelleri ..	24
Tablo 3. Kitosan miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin veriler.....	56
Tablo 4. Nafyon miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin veriler	58
Tablo 5. Damlatma hacminin optimizasyonuna ilişkin bulgular	59
Tablo 6. GaOX miktarı optimizasyonuna ilişkin bulgular.....	63
Tablo 7. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular.....	70
Tablo 8. Geliştirilen biyosensörün farklı elektrotlarla tayin aralığında elde edilen grafik denklemleri	71
Tablo 9. Serbest galaktoz biyosensörünün girişim etkisi denemesine ilişkin bulgular	74
Tablo 10. Serbest galaktoz biyosensörünün geri elde denemesine ilişkin bulgular...	75
Tablo 11. Alkalen fosfatazın optimum miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular ...	83
Tablo 12. Total galaktoz biyosensörünün gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular	92
Tablo 13. Total galaktoz biyosensörünün farklı elektrotlarla tayin aralığında elde edilen grafik denklemleri	92
Tablo 14. Total galaktoz biyosensörünün geri elde denemesine ilişkin bulgular.....	96
Tablo 15. Galaktozemili kişilerin eritrosit hemolizat total galaktoz düzeylerini yansıtan örneklere ilişkin sonuçlar.....	98

Tablo 16. Literatürde var olan galaktoz biyosensörleri ile bu çalışmanın karşılaştırılması	118
--	-----

Şekiller Dizini

Şekil 1. Leloir yolağı	4
Şekil 2. Galaktoz metabolizması yolağı	6
Şekil 3. Bir biyosensörün şematik gösterimi	9
Şekil 4. Enzimatik biyosensörlerin ölçüm prensibine göre sınıflandırılması	11
Şekil 5. Nafion'un kimyasal yapısı.....	15
Şekil 6. Kitin ve kitosanın değişik kaynaklardan ekstraksiyonu (Petrucci, Di Matteo, et al., 2021).....	16
Şekil 7. a) PB'nin birim hücre yapısı (Piernas Muñoz & Castillo Martínez, 2018) ; b) PB temelli biyosensörlerin çalışma prensibi (F. Ricci & Palleschi, 2005b); c) Toz halinde PB; d) PB modifiye elektrodun döngüsel voltammogramı (Francesco Ricci et al., 2003) (i), çözünür PB'nin redoks tepkimesi (Ellis et al., 1981)(ii), çözünür olmayan PB'nin redoks tepkimesi (Itaya et al., 1986).....	19
Şekil 8. SPE elektrodun bileşenleri.....	22
Şekil 9. Serbest galaktoz biyosensörünün hazırlanması aşamaları.....	27
Şekil 10. A) Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi. B) a) Karıştırmalı yöntem b) Damlatmalı yöntem.....	29
Şekil 11. Total galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi.....	36
Şekil 12. PB'nin elektrodepozisyonuna ilişkin -0,2V&1,0 V (tarama hızı 50 mV/s) arasında alınmış döngüsel voltammogramları. Ölçümler 2,0 mM FeCl ₃ , 2,0 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 0,1 M KCl ve 20 mM HCl içeren karışımda alınmıştır.....	40
Şekil 13. SPCE ve SPCE/PB elektrotlar ile 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,0 PBS'de alınmış döngüsel voltammogramlar	41

Şekil 14. İmmobilizasyon aşamalarına ilişkin modifiye elektrotlar ile 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,0 PBS’de alınmış -0,3&0,4 arası döngüsel voltammogramlar (tarama hızı 50 mV/s).....	43
Şekil 15. Serbest galaktoz biyosensörünün İmmobilizasyon aşamalarına ilişkin 0,1 M KCl içeren 5,0 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} ’de alınmış döngüsel voltammogramlar (50 mV/s).....	45
Şekil 16. GNP’nin sağladığı yüzey alanının belirlenmesine amacıyla alınmış 0,1 M KCl içeren 5,0 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} ‘de alınmış döngüsel voltammogramlar (50 mV/s).....	47
Şekil 17. Geliştirilen biyosensörün (SPCE/PB/CHIT-GNP/E/NAF-GNP/E/CHIT) değişik tarama hızlarında 0,1 M KCl ve 5,0 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} ‘de içeren pH:7,5 PBS’de alınmış döngüsel voltammogramları.....	48
Şekil 18. Serbest galaktoz biyosensörünün (SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT) 0 ve 5 mM galaktoz içeren 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS’de cevabına ilişkin döngüsel voltammogramlar.	49
Şekil 19. Serbest galaktoz biyosensörünün (SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT) 1 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometri sonuçları. Ölçümler 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS’de alınmıştır. Amperometrik ölçümler -0,05 V’ta alınmıştır.....	50
Şekil 20. Optimizasyon çalışmalarında çalışan konsantrasyon aralığına ilişkin amperometri cevapları. Serbest galaktoz biyosensörünün (SPCE/PB/CHIT /GaOX/NAF /GaOX/CHIT) 0,2-10 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometri sonuçları. Ölçümler 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS’de alınmıştır. Amperometrik ölçümler -0,05 V’ta alınmıştır.	51
Şekil 21. Modifiye elektrotların taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile alınmış görüntüleri. SPCE/PB (50000 x büyütme) (A); SPCE/PB/CHIT-GNP/NAF-GNP/CHIT (20000 x büyütme) (B); SPCE/PB/ CHIT-GNP/ E/ NAF-GNP/E/CHIT (10000 x büyütme) (C).....	52

Şekil 22. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular. Cevaplar 1 mM galaktoza (çözelti içerisinde) ilişkindir.	53
Şekil 23. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı modifiye edilmiş SPCE'ler ile alınmış amperometrik cevaplar (A) ve buna ilişkin çizilmiş sütun grafiğini (B) göstermektedir.	55
Şekil 24. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı kitosan miktarları ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarını karşılaştırır.....	57
Şekil 25. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı nafyon miktarları ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarını karşılaştırır.....	58
Şekil 26. 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı damlatma hacimleri ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarının karşılaştırılması	60
Şekil 27. Biyosensör cevabına GNP'nin etkisi. SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT ve SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT elektrotların 0,2-10 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometri sonuçları.	61
Şekil 28. SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/E/CHIT ve SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT elektrotların 0,2-10 mM arası galaktoz cevabına ilişkin kalibrasyon grafiği	62
Şekil 29. 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı GNP ile modifiye edilmiş ve edilmemiş SPCE'lerin duyarlılıklarının karşılaştırılması.	62
Şekil 30. 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı GaOX konsantrasyonları ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarının karşılaştırılması.....	64

Şekil 31. Biyosensörün pH optimizasyonuna ilişkin sonuçlar. 1 mM galaktoz konsantrasyonu için 3 tekrarlı ölçümler alınmıştır.....	64
Şekil 32. Biyosensörün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin sonuçlar. 1 mM galaktoz konsantrasyonu için 3 tekrarlı ölçümler alınmıştır.....	65
Şekil 33. Biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesine yönelik amperometri sonuçları. A) 0,025-0,5 mM ; B) 0,025-10 mM arası galaktoz konsantrasyonlarına ilişkin amperometrik cevaplar.....	66
Şekil 34. Biyosensörün doğrusal tayin aralığına ilişkin kalibrasyon grafiği	67
Şekil 35. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün karıştırmalı ortamda 100 mM galaktozdan 5'er µL sıralı katımı ile elde edilen amperometrik cevaplar ve buna ilişkin çizilen standart grafiği.....	67
Şekil 36. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün biyosensör yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda galaktoz damlatılması yoluyla elde edilen sabit hal (karıştırmaz) amperometrik cevapları. 0 -10 mM galaktoz konsantrasyonlarına ilişkin cevaplar	68
Şekil 37. Serbest galaktoz biyosensörünün damlatma yöntemi yöntemiyle elde edilmiş standart grafiği.....	69
Şekil 38. Tekrar üretilebilirlik çalışmasına ilişkin çizilen standart grafikleri.....	70
Şekil 39. Biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin amperometri sonuçları. Her bir substratın konsantrasyonu 1 mM'dır.....	72
Şekil 40. Geliştirilen biyosensörün çeşitli substratlara cevabına ilişkin sütun grafiği	73
Şekil 41. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün girişim etkisi denemesine ilişkin amperometrik cevaplar. Galaktoz: 10 mM; Laktoz: 10 mM; Gal-1-P: 10 mM; Glukoz: 5 mM; Urik asit: 0,5 mM; Kreatin: 100 mM; Kreatinin : 5 mM; Askorbik asit: 0,2 mM.	73

Şekil 42. Sağlıklı ve galaktozemili hasta plazma galaktoz düzeylerini gösteren örneklerden damlatma yöntemi ile elde edilmiş amperometrik cevapları	76
Şekil 43. Yöntem karşılaştırılmasına ilişkin çizilen korelasyon grafiği	76
Şekil 44. Serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular	77
Şekil 45. Total galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin 0,1 M KCl içeren 5,0 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} ‘de alınmış döngüsel voltammogramlar (50 mV/s).....	79
Şekil 46. Total galaktoz biyosensörünün Gal-1-P’ye verdiği cevaba ilişkin döngüsel voltammogramlar. Ölçümler pH:8,0 Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl ₂ içeren) tamponunda alınmıştır. Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık: 30	80
Şekil 47. Total galaktoz biyosensörünün Gal-1-P’ye verdiği cevaba ilişkin -0,1 V’ta alınmış amperometrik ölçümler. Ölçümler pH:8,0 Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl ₂ içeren) tamponunda alınmıştır	81
Şekil 48. Total galaktoz biyosensörünün amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular. Ölçümler pH:8,0 Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl ₂ içeren) tamponunda 1 mM Gal-1-P için alınmıştır.....	82
Şekil 49. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında Gal-1-P konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı ALP konsantrasyonları ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarını karşılaştırır.	84
Şekil 50. Total galaktoz biyosensörünün pH optimizasyonuna ilişkin bulgular. 1 mM Gal-1-P için gerçekleştirilen ölçümler 3 tekrarlıdır.	85
Şekil 51. Total galaktoz biyosensörünün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular. 1 mM Gal-1-P için gerçekleştirilen ölçümler 3 tekrarlıdır.....	85
Şekil 52. Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesine yönelik amperometri sonuçları. A) 0,1-0,5 mM ; B) 0,1-10 mM arası Gal-1-P konsantrasyonlarına ilişkin amperometrik cevaplar.....	87

Şekil 53. Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin standart grafiği.	88
Şekil 54. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün karıştırmalı ortamda 25 mM Gal-1-P'in sıralı katımı ile elde edilen amperometrik cevaplar ve buna ilişkin çizilen standart grafiği	89
Şekil 55. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün biyosensör yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda Gal-1-P damlatılması yoluyla elde edilen sabit hal (karıştırmasız) amperometrik cevapları. 0 -10 mM Gal-1-P konsantrasyonlarına ilişkin cevaplar ...	90
Şekil 56. Total galaktoz biyosensörünün damlatma yöntemiyle elde edilmiş standart grafiği	91
Şekil 57. Total galaktoz biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmasına ilişkin standart grafikleri	93
Şekil 58. Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğine ilişkin amperometrik cevaplar. Her bir substratın konsantrasyonu 1 mM'dır.....	94
Şekil 59. Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliği denemesine ilişkin sütun grafiği	95
Şekil 60. Sağlıklı ve galaktozemi hastaların eritrosit total galaktoz seviyelerini yansıtan örneklerle ilişkin damlatma yöntemiyle elde edilmiş amperometrik cevaplar	97
Şekil 61. Total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular	99

Kısaltma Listesi

GALK	: Galaktokinaz
GALT	: Galaktozil Uridil transferaz
GALE	: Üridin difosfat (UDP)-galaktoz 4-epimeraz
SPE	: Screen Printed Elektrotlar
ALP	: Alkalen Fosfataz
GaOX	: Galaktoz Oksidaz
CV	: Döngüsel voltametri
Gal-1-P	: Galaktoz-1-Fosfat
PB	: Prussian Blue
SPCE	: Screen printed karbon elektrot
GCE	: Camımsı karbon elektrot
NAF	: Nafyon
CHIT	: Kitosan
PBS	: Potasyum Fosfat Tamponu
Tris-HCl	: Trizma-HCl Tamponu
GNP	: Altın nanopartikül
E	: Enzim

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Galaktozemi galaktoz metabolizmasındaki bazı enzimlerin (GALT, GALK, GALE) az veya hiç sentezlenememesi sonucu ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. Özellikle yenidoğanlarda erken tanı konulamaması ağır klinik, hatta ölümcül sonuçlar doğurabilir. Teşhis konduktan sonra da galaktozun diyetten çıkarılması gerekir. Galaktoz tayini için önceki yöntemler arasında kolorimetri, ince tabaka kromatografisi, kütle spektrometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler maliyetli, zaman alıcıdır ve yüksek girişim etkisi ile (özellikle kolorimetrik yöntem için) yeterince spesifik değildir, bu nedenle bu sorunların üstesinden gelmek için galaktoz tayini için yapılan biyosensörler diğer analitler için olduğu gibi galaktoz tayini için de büyük ilgi çekmektedir. Bu nedenle galaktoz ve galaktoz-1-fosfat düzeylerinin hızlı, pratik ve ucuz bir şekilde tayini büyük önem arz etmektedir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Literatür verilerinde çok sayıda galaktoz biyosensörüne rastlanılmakla birlikte, galaktoz-1-fosfat tayini için geliştirilmiş bir biyosensöre rastlanılmamıştır. Oysa galaktozemi tanısı konabilmesi için galaktozun yanı sıra eritrosit galaktoz-1-fosfat düzeyleri ve Galaktokinaz (GALK), Galaktozil Uridil transferaz (GALT) enzim aktiviteleri de gereklidir. Enzim aktiviteleri de galaktoz ve galaktoz-1-fosfat ölçümü üzerinden hesaplanabilmektedir. Bu bağlamda bu araştırmanın sorularını şunlar oluşturmaktadır:

- Geliştirilecek olan biyosensörün tayin aralığı galaktozemi tanı ve takibi için gerekli olan galaktoz ve galaktoz-1-fosfat düzeylerini kapsıyor mu ve yüksek doğrulukla ölçülebiliyor mu?
- Biyosensöre diğer analitlerin girişimi ihmal edilebilir düzeyde çıkacak mı?
- Biyosensörün gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği kabul edilebilir düzeylerde çıkacak mı?

- Biyosensörle bulunan sonuçlar ticari kit yöntemiyle bulunan sonuçlar ile korele çıkacak mı?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmanın iki hipotezi vardır.

Birincisi: Plazmadaki galaktozemi tanısı ve tedavisinin izlenmesi için serbest galaktoz düzeylerinin tespitini yapabilen biyosensör temelli yöntemler geliştirilebilir.

İkincisi: Eritrosit hemolizatında total galaktoz (galaktoz + gal-1-P) düzeylerini ölçebilen biyosensör temelli yöntemler geliştirilebilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Bu çalışma da ticari olarak satın alınan Screen Printed Elektrotlar (SPE) kullanılacaktır. Bazen bu elektrotların temel akım değerleri aynı olmayabilmektedir. Bu da tekrarlanabilirliği olumsuz yönde etkileyebilir. Bu olumsuzluğu azaltmak için öncelikle elektrotlarla ferri ferro çözeltisinde döngüsel voltametri (CV) alınacak olup birbirine yakın temel akım değerlerine sahip elektrotlarla çalışılacaktır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın sınırlılıklarından ilki, Screen Printed Elektrotların (SPE) fabrikasyondan kaynaklanan hatalarının tekrar üretilebilirliği ve elektrotlar arası tekrarlanabilirliği düşürmesidir. Bunun üstesinden gelebilmek için örnek analizinin gerçekleştirileceği elektrotla kalibrasyon grafiğinin çizilmesi gerekir. Bir diğer sınırlılık, galaktoz-1-fosfat (Gal-1-P) tayini için geliştirilen alkalen fosfataz (ALP)-galaktoz oksidaz (GaOX) enzim çiftinin optimum pH'larının farklı olmasıdır. ALP aktivitesini değeri 9-10 gibi yüksek pH'larda en iyi gösterirken, GaOX aktivitesi için optimum pH 7,5-8 dir. Bu durum Gal-1-P biyosensörünün tayin limitini sınırlamaktadır. Araştırmanın önemli sınırlılıklarından biri de elektrokimyasal yöntemlerde elektroaktif doğalarından dolayı girişim etkisi yapabilen askorbik asit, ürik asit gibi türlerin varlığıdır. Hem serbest galaktoz biyosensöründe hem de total galaktoz biyosensöründe ölçümler -0,05 V; -0,1 V gibi düşük bir potansiyelde gerçekleştiğinden bu etki minimize edilmiştir. Yine de askorbik asit, ürik asit gibi

elektroaktif türlerin daha az olmakla birlikte potansiyel girişim etkisi olabilir. Fakat bu türlerin kolay okside olmaları onları kararsız türler haline getirmektedir. Plazmanın havayla teması veya uzun süre bekletilmesi bu türlerin kendi kendine oksitlenmesine neden olmakta ve beklenen girişim etkisi oldukça azalmaktadır. Nitekim örnek analizi, yöntem karşılaştırma ve geri elde deneylerinde elde edilen yüksek doğrulukta sonuçlar bunu doğrulamaktadır.

1.6. Araştırmanın Amacı

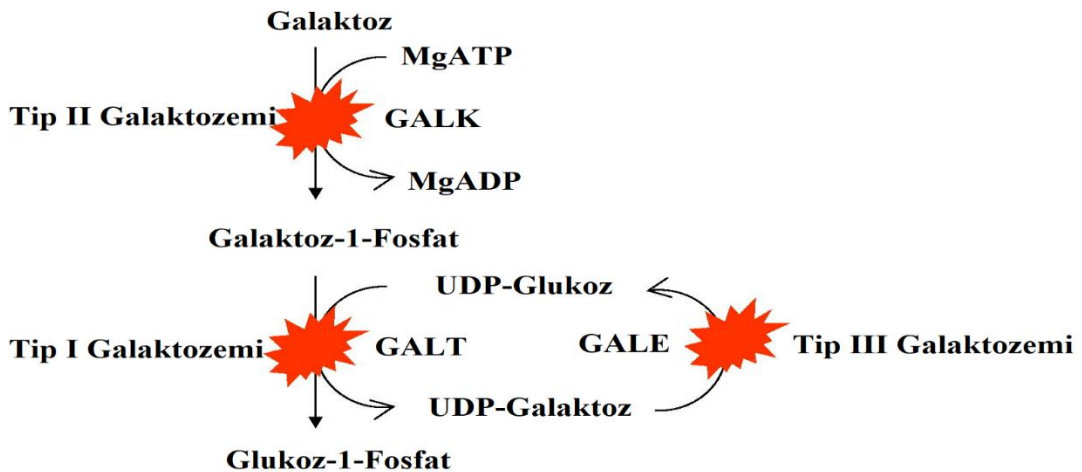
Galaktoz seviyesinin ölçümü, galaktozemi ve galaktoz intoleransı açısından klinik önem taşır. Galaktozemi galaktoz metabolizmasındaki bazı enzimlerin (GALT, GALK, GALE) az veya hiç sentezlenememesi sonucu ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. Özellikle yenidoğanlarda erken tanı konulamaması ağır klinik hatta ölümcül sonuçlar doğurabilir. Teşhis konduktan sonra da galaktozun diyetten çıkarılması gerekir. Dolayısıyla bu parametrelerin kanda tayini büyük önem taşır.

Bu projenin amacını plazmada serbest galaktoz düzeyleri ve eritrosit hemolizatında total Gal-1-P düzeylerinin ölçümü için hızlı, spesifik, ucuz elektrokimyasal bir biyosensör sistemi geliştirilmesi oluşturmaktadır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Galaktozemi

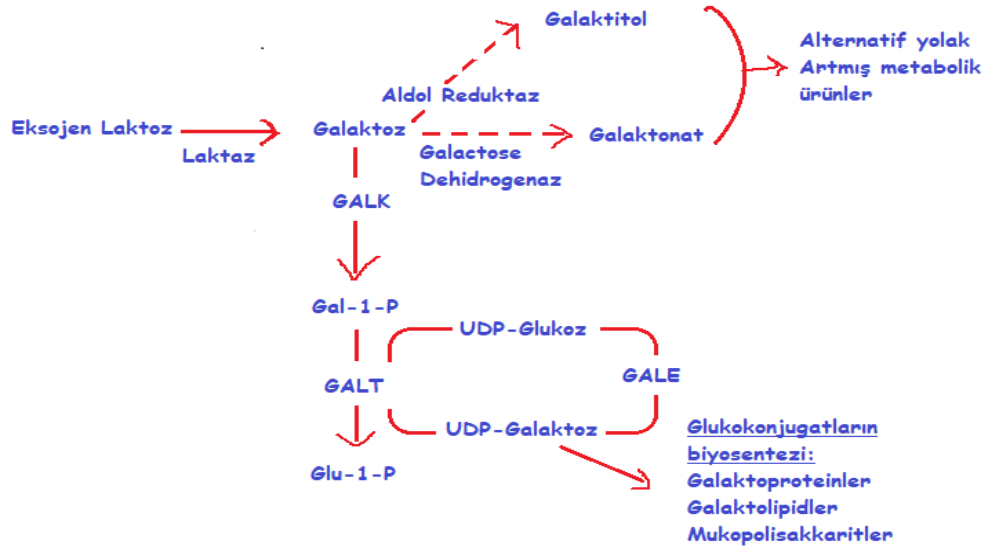
İlk olarak 1900'lerin başında Von Reuss tarafından tanımlanmış olan (Cerone et al., 2019) Galaktozemi, her 62.000 canlı doğumda 1, küresel sıklıkta görülen, yaşamı tehdit eden otozomal resesif bir hastalıktır (Pyhtila et al., 2015). Galaktoz katabolizmasını ortaya çıkaran Louis Leloir bu buluşu ile 1970 yılında Kimya dalından Nobel ödülü almıştır (Berry et al., 2006; Novelli & Reichardt, 2000). Bu nedenle galaktoz katabolizması aynı zamanda Leloir yolağı olarak da bilinir (Şekil 1). Leloir yolağında galaktozu katabolize eden üç enzim vardır: galaktokinaz (GALK), galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz (GALT) ve üridin difosfat (UDP)-galaktoz 4-epimeraz (GALE). Söz konusu enzimlerden birinin eksik olması durumunda galaktoz birikir ve bunun sonucunda galaktozemi gelişir. Şekil 1 galaktoz metabolizmasını göstermektedir. İlk adımda, galaktoz mutarotaz, yoldaki aktif form olduğu için β -D-galaktozun α -D-galaktoza dönüşümünü kolaylaştırır. Daha sonra, α -D-galaktoz, GALK tarafından galaktoz 1-fosfata fosforile edilir. Üçüncü adımda, GALT, üridin difosfat kaynağı olarak UDP-glukoz kullanarak galaktoz 1-fosfatı UDP-galaktoza dönüştürür. Son olarak, UDP-galaktoz 4-epimeraz, transferaz reaksiyonu için UDP-galaktozu UDP-glukoza geri dönüştürür. Ek olarak, fosfoglukomutaz, D-glukoz 1-fosfatı D-glukoz 6-fosfata dönüştürür.



Şekil 1. Leloir yolağı

Klasik galaktozemide, Gal-1-P ana toksik metabolittir ve hem etkilenen hastaları tanımlamak için birincil belirteç olarak hem de tedavilerinde terapötik bir rehber olarak hizmet eder (Berry et al., 2006). Ne yazık ki, Gal-1-P konsantrasyonu ile uzun vadeli sonuçlar arasında çok az korelasyon vardır. Galaktoz alımının kısıtlanması Gal-1-P düzeyinde hızlı bir düşüşle sonuçlansa da, yetişkinlere kıyasla özellikle bebeklerde ve çocuklarda artan bir süreçle endojen olarak üretilen galaktoz nedeniyle seviyeler kontrollerle karşılaştırıldığında yüksek kalır. Enzim aktivitesinin miktarına bağlı olarak, GALT eksikliği 3 kategoriye ayrılabilir. En şiddetli form, eritrositler ve karaciğer dokusunda enzim aktivitesinin olmadığı veya zorlukla saptanabildiği ($\leq$ %1 enzim aktivitesi) klasik galaktozemidir (Timson, 2016; Welling et al., 2017). İkincisi, tipik olarak %1 - %10 enzim aktivitesi sergileyen klinik varyant galaktozemidir. Klinik varyant, diğer organlarda, yani beyin, karaciğer ve bağırsaklarda yüksek enzim seviyelerinin varlığı ile klasik galaktozemiden farklıdır (Timson, 2016; van Erven et al., 2017). Sonuncusu, %15 - %35 enzim aktivitesini muhafaza etmesiyle ayırt edilen, Duarte galaktozemi olarak adlandırılan biyokimyasal varyanttır. Duarte galaktozemi yaklaşık 1:4000 yeni doğan bebeği etkiler, bu da onu klasik ve klinik varyant galaktozemiden çok daha yaygın hale getirir. Bir çocuk Duarte aleli için heterozigot olan bir ebeveyninden doğduğunda ve diğer ebeveyn klasik galaktozemi için heterozigot olduğunda ortaya çıkar. Klasik, klinik ve biyokimyasal GALT eksikliği arasındaki değişkenlik, kalıntı enzim aktivitesini yansıtır (Demirbas et al., 2018).

GALK eksikliği, galaktitol ve galaktonatın toksik birikimi ile alternatif yollar yoluyla üretilen galaktoz metabolitleriyle sonuçlanır (Cerone & Rios, 2019) (Şekil 2). Galaktitol, gözleri ve beyin hedef alarak katarakt oluşumuna ve daha az sıklıkla beyin ödemine yol açar. Galaktozun erken diyet kısıtlaması bu komplikasyonları önler. GALE eksikliği, sadece enzim aktivitesine değil, aynı zamanda eksikliğin eritrositlere izole edilip edilmediğine veya doku ve organları etkilemede daha yaygın olmasına bağlı olarak klinik olarak hafif ile şiddetli arasında değişir. Şiddetli GALE eksikliği, yenidoğan döneminde benzer klinik belirtilerle ortaya çıkan klasik galaktozemiye taklit eder.



Şekil 2. Galaktoz metabolizması yolağı

Galaktozemi genellikle yenidoğan tarama programları aracılığıyla tanımlanır (Vats & Packman, 2014). Yenidoğan tarama programlarının çoğu, eritrositlerdeki GALT aktivitesini ölçerek başlar, ardından GALT seviyeleri düşük olduğunda galaktoz seviyeleri tayini takip eder. Yenidoğan tarama sonuçlarının çıkması 7 güne kadar sürebileceğinden, klinik olarak galaktozemiden şüpheleniliyorsa tarama hızlandırılır. Kesin tanı galaktoz-1-fosfat düzeyleri ve GALT enzim aktivitesi ölçülerek ve moleküler genetik testler ile konur (Berry, 2012; Berry et al., 2000; Welling et al., 2017).

Galaktozemi tüm dünyada görülmekle birlikte, insidansı coğrafyaya göre büyük ölçüde değişir: Gerek ABD’de, gerekse Avrupa’da bu oran yaklaşık 1:40.000 ile 1:60.000 iken; İrlanda rapor edilen en yüksek insidansa (1:20.000) ve Japonya en düşük insidansa (1:1.000.000) sahiptir (Kotb et al., 2019; Vats & Packman, 2014).

Klasik tip galaktozemi (GALT) (Berry et al., 2016): Teşhis eritrosit Gal-1-P düzeyleri ve enzim aktivitesi ile konulur. Sağlıklılarda eritrosit hemolizati Gal-1-P düzeyi <0,038 mM’dır. Diyet kısıtlaması olmayan yeni doğanlarda eritrosit Gal-1-P düzeyleri 4,6 mM seviyelerine kadar çıkabilir. Genelde 0,38 mM’ın üstündedir.

Hastalarda plazma serbest galaktoz ise çoğunlukla $>0,55$ mM'ın üstündedir. 5-20 mM seviyelerine kadar çıkabilir. Sağlıklılarda 0,11 mM'ın altındadır.

Tip 2 galaktozemi (GALK)(Vats & Packman, 2014) : Diyet kısıtlaması olmazsa plazma serbest galaktoz düzeyleri 5-20 mM seviyelerine çıksa da diyet kısıtlaması ile normal değerlere döner. Tanı GALK aktivitesi ölçümü ile konur. Plazma galaktoz seviyeleri normal olsa da kan ve idrar galaktitol düzeyleri yüksektir.

Tip 3 galaktozemi (GALE) : GALT enzim aktivitesi normal olduğu halde plazma galaktoz ve eritrosit Gal-1-P düzeyleri yüksek ise düşünülür. Tanı GALE aktivitesi ölçümü ile konur.

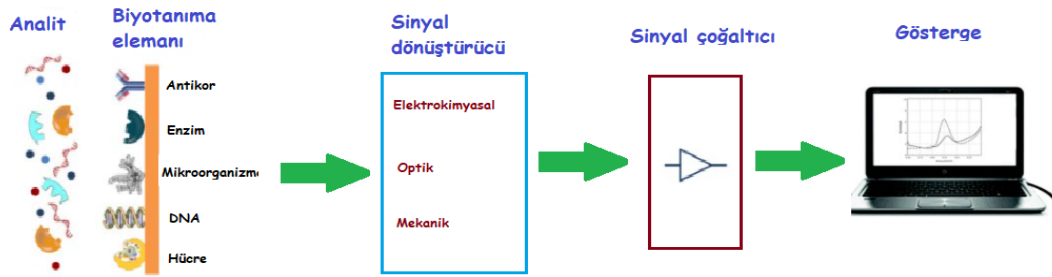
Her üç galaktozemi tipinin karşılaştırmalı özellikleri Tablo 1'de verilmiştir (Cerone & Rios, 2019).

Tablo 1. Galaktozeminin anahatları

Galaktozemi tipi	GALK	GALT	GALE
Enzim eksikliği	Galaktokinaz	Galaktoz-1-fosfat uridiltransferaz	Uridin difosfat-galaktoz-4-epimeraz
Kalıtım	Otozomal resesif	Otozomal resesif	Otozomal resesif
İnsidans	1:100 000 - 1 000 000	1:40 000 - 1:60 000	Hafif form : 1:6200 – 1:64000 Şiddetli form : 1:23000
Krozomal lokasyon	17q24	9p13	1p36
Yeni doğan tarama	↑ Galaktoz Normal GALT	↑ Galaktoz ↓ GALT	↑ Galaktoz Normal GALT
Laboratuvar testi	↑↑ Plazma galaktoz ↑↑ Plazma galaktitol ↑↑Plazma galaktonat ↑↑ İdrar galaktitol, galaktoz, galaktonat Normal eritrosit Gal-1-P	↑↑ Plazma galaktoz ↑ Plazma galaktitol ↑ İdrar galaktitol, galaktoz, galaktonat ↑↑ Eritrosit Gal-1-P	↑ Plazma galaktoz ↑ Plazma galaktitol ↑ İdrar galaktitol, galaktoz, galaktonat ↑ Eritrosit Gal-1-P
Yaygın mutasyonlar	P28T	Klasik : Q188R, K285N, L195P Klinik varyant: S135L Biyokimyasal (Duarte): N314D/Q188R	Şiddetli form: V94M, K257R, R335H, L183P Hafif form: L313M, D103G
Semptom	Bilateral katarakt	Erken dönem belirtileri: Beslenme bozukluğu, sarılık, gelişim geriliği, uyusukluk Geç dönem belirtileri: Karaciğer yetmezliği, koagülopati, böbrek fonksiyon bozukluğu, katarakt, Escherichia coli sepsisi ve ölüm	Asemptomatik olabilir veya öğrenme zorluğu, gelişme geriliği, nörolojik bulgular gibi klasik tip galaktozemi ile benzer belirtiler görülebilir.
Prognoz	Erken dönem teşhisi ile diyet uygulanırsa katarakt tamamen engellenebilir.	Hızlı teşhis edilip diyet kısıtlamasına gidilirse hayatı tehdit eden ciddi belirtiler önlenebilir. Fakat uzun dönemde erken yumurtalık yetmezliği, bozulmuş nörogelişim, konuşma sorunları, ekstrapiramidal anormallikler ve azalmış kemik mineral yoğunluğu riskleri vardır.	Uzun dönem prognozu yoktur.

2.2. Amperometrik enzim biyosensörleri

Biyosensör evrensel olarak “biyolojik öneme sahip bir analitin tespiti için biyolojik bir bileşeni fizikokimyasal bir cihazla birleştiren bağımsız bir analitik cihaz” olarak tanımlanır (Hasan et al., 2014). Hedef molekül ile spesifik olarak etkileşime girebilen bir biyolojik tanıma elemanından ve bu etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştürebilen bir dönüştürücüden oluşur (bkz. Şekil 3).

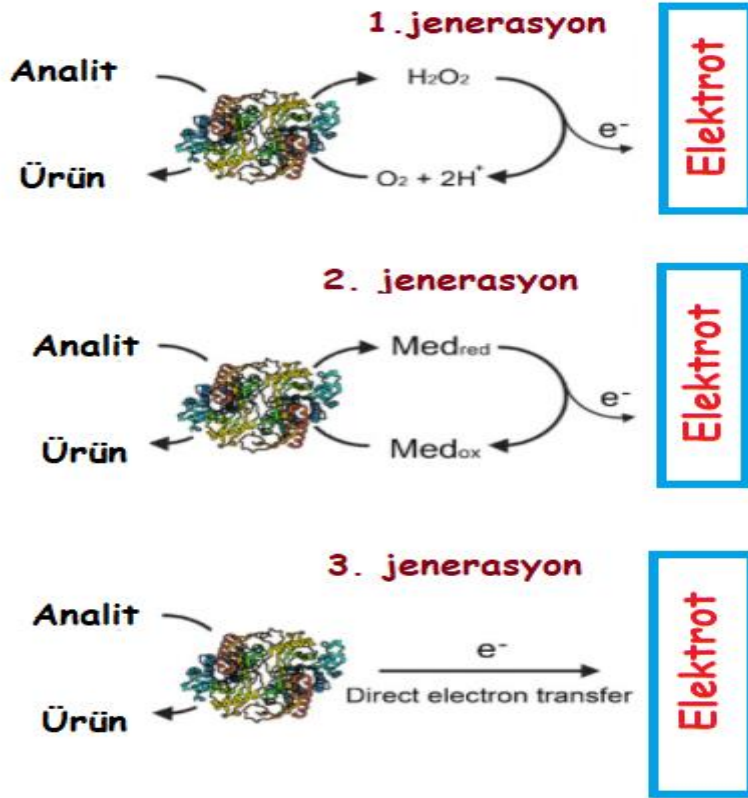


Şekil 3. Bir biyosensörün şematik gösterimi

Enzimatik bir biyosensör, ölçülen maddenin konsantrasyonunu uygun bir fiziksel ve kimyasal dönüştürücü ve sinyal yükseltici cihaz aracılığıyla dijital bir sinyale dönüştüren bir algılama aracıdır (Rocchitta et al., 2016). Temeli enzimlerin duyarlı bileşenler olarak kullanıldığı biyomoleküler tanıma dayanır. Genel olarak amperometri sabit potansiyel altında akımdaki değişikliklerini ölçen bir tekniktir. Akımdaki değişiklik analit konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Enzimatik biyosensörlerin temel performans göstergeleri hassasiyeti, seçiciliği, tayin limitini ve lineer aralığı içerir. Bir enzimin doğal özgüllüğü nedeniyle, enzimatik biyosensörler, pratik uygulamalarda genellikle hedefe mükemmel seçicilik gösterir. Bu biyosensörler, mükemmel özellikleri, yani yüksek hassasiyetleri, kısa cevap süreleri, yerinde kullanıma uygun olmaları ve düşük maliyetleri nedeniyle gıda güvenliği, tarımsal kirlilik, ilaç üretimi, fermantasyon ve çevresel izleme dahil olmak üzere çeşitli alanlarda giderek artan bir şekilde insanların ilgisini çekmiştir (Borah et al., 2018; Dzyadevych et al., 2008; Jayan et al., 2020). Bununla birlikte, algılama için yalnızca enzimin aktif merkezinden gelen redoks yeteneğine güvenildiğinde,

sensörün doğruluğunu büyük ölçüde etkileyen, yeterince güçlü bir yanıt sinyali üretmek için yeterli elektron aktarılmaz. Bu nedenle, biyoalgılama performansını artırmak, enzimatik sinyali büyütmek için genellikle bir elektrot malzemesi kullanılır. Nanobilimin hızlı gelişimi ile daha yüksek elektrokatalitik aktivite, yüzey alanı ve iletkenlik elde etmek için artan sayıda nanomalzeme tasarlanmıştır (Hira et al., 2021; Suvarnaphaet & Pechprasarn, 2017; G. Yang et al., 2014). Bugüne kadar, enzimatik biyosensörlerin gelişimi, enzim tarafından üretilen elektronların enzim ve elektrot yüzeyi arasında transfer edilme şekline göre üç nesle ayrılabilir (Şekil 4).

Birinci nesil biyosensörler, elektronları transfer etmek için çözeltide oksijen veya H_2O_2 'in katılımına dayanan klasik enzimatik biyosensördür. Çözünmüş oksijenin değişen konsantrasyonu nedeniyle stabilitesi zayıf olmasına rağmen, enzimatik biyosensör geliştirilmesinin en erken ve en kolay yoludur. İkinci nesil, enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında bir köprü olarak enzimatik elektrota sıklıkla yapay bir elektron aracısı soğan mediyatör (aracı) tabanlı enzimatik biyosensördür. Bu tür malzemelerin kullanılması, redoks yeteneği sayesinde algılama sinyalini büyük ölçüde büyütür ve hızlandırır. Bununla birlikte, yapay mediyatörler genellikle zayıf etkileşimler veya afiniteler nedeniyle elektrot yüzeyinden düşebilirler, bu da hazırlanan biyosensörlerin kısa ömürlerine sahip olmasına neden olur. Üçüncü nesil, elektronları herhangi bir yapay aracı olmadan doğrudan enzim merkezi ile elektrot arasında aktaran aracısız enzimatik biyosensördür. Bu durumda, enzim tabakası ve elektrot yüzeyi arasındaki ara yüzün kararlılığı, çok daha hızlı elektron transfer hızı ile birlikte önemli ölçüde geliştirilecektir. Aracı olmamasının bir sonucu olarak, enzimatik reaksiyonun elektrokatalizi tatmin edici değildir, bu da düşük hassasiyete yol açar. Enzimatik biyosensörün gelişim geçmişine, elektronlar için sürekli olarak daha kararlı ve daha kısa bir transfer yolunun elde edildiği elektrot malzemelerinin geliştirilmesindeki ilerleme eşlik etmektedir. Bu şekilde, yüksek biyoalgılama performansı üreten enzimatik reaksiyondan türetilen elektrik sinyalinin dikkate değer bir şekilde yükseltilmesi beklenir.



Şekil 4. Enzimatik biyosensörlerin ölçüm prensibine göre sınıflandırılması

Nanomalzemeler, tıbbi, farmasötik, kimyasal ve biyolojik alanlar dahil olmak üzere birçok alanda başarıyla kullanılmaktadır. Nanomalzemeler elektrokimyasal algılamada önemli roller oynar: (1) Yüksek elektron transfer hızı. Nanomalzemelerin düşük transfer direnci, iletken olmayan proteinin elektrot yüzeyindeki tepkisini iyileştirebilir. (2) Elektrokimyasal sinyallerin amplifikasyonu. Nanomalzemeler mükemmel katalitik aktiviteye sahiptir ve elektrokimyasal tepki sinyalini genişletmek için elektrokatalizörler olarak yaygın olarak kullanılır. (3) Nanotaşıyıcı enzimler. Nanomalzemeler iyi bir biyouyumluluğa sahiptir ve protein moleküllerini elektrostatik etkileşimler, hidrofobik veya π - π istifleme etkileşimleri yoluyla hareketsiz hale getirebilir (Teymourian et al., 2020; Wen et al., 2017; Xu et al., 2020). Nanomalzemelerin çeşitli avantajlara sahip olduğu doğrulanmış olsa da, en düşük entalpiye ulaşırken doğal agregasyon davranışları nedeniyle hassas nanoyapının kontrolü her zaman bir zorluktur. Düzensiz nanomalzemelerle karşılaştırıldığında, düzenli nanoyapılara sahip malzemeler daha aktif bölgelere sahiptir ve gelişmiş katalitik kapasite göstermiştir. Aynı zamanda, normal nanoyapılı

nanomalzemenin düzgün dağılımı, daha geniş bir spesifik yüzey alanına sahip olmasını sağlayarak enzim yüklemesinde bir artışa yol açar ve bu da sinyal yoğunluğunu arttırır. Ayrıca normal nanomalzemelerin sentez yöntemi kontrol edilebilir olduğundan ilgili biyosensörlerin tekrarlanabilirliği ve stabilitesi yüksektir (Lü et al., 2014; Ma et al., 2016; Mi et al., 2019). Bu nedenle, artan sayıda araştırmacı, elektrotlar üzerinde düzgün bir dağılıma sahip, iyi tanımlanmış düzenli bir geometrik morfolojiye sahip gelişmiş nanomalzemelerle ilgilenmektedir. Son on yılda, nanoküpler (NC'ler), nanoteller (NW'ler), nanotüpler (NT'ler) ve nanoçiçekler (NF'ler) gibi çeşitli düzenli nanoyapılarla birlikte, çeşitli nanomalzemeler sürekli olarak onlardan türetilen avantajları doğrulamak için geliştirildi. (Chu et al., 2017a; D. S. Kim et al., 2020; Ma et al., 2016; P. Yang et al., 2017).

2.3. Alkalen fosfataz

Alkalen fosfataz (ALP) (EC 3.1.3.1), birçok hastalığın teşhisi ve takibi için sıklıkla kullanılan enzimlerden biridir. Bir yandan ALP, kemik, böbrek, karaciğer, plasenta ve bağırsaklar gibi çeşitli insan dokularında bulunur. Anormal seviyesinin meme ve prostat kanseri, tümörler, kemik hastalığı, tiroid bozuklukları, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve diyabet gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Stokol et al., 2015; Yamazoe et al., 2016). Ayrıca ALP konsantrasyonunun izlenmesi kronik yaraların tedavisi için önemlidir. Çünkü bakteriyel biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynar (Nsabimana et al., 2019). Öte yandan, ALP, yüksek stabilitesi, yüksek devir sayısı, düşük maliyeti ve geniş substrat özgüllüğü nedeniyle biyo-tahlillerde etiketleme enzimi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Bhimji et al., 2013; Hussaini & Farrington, 2007; C. M. Li et al., 2013; J. Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2006). Buna dayanarak peptitler, proteinler, nükleik asitler vb. farklı hedef analitler tespit edilebilir ve bu da spesifik hastalıkların başarılı teşhisini sağlayabilir.

Biyokimyanın önemli bir aracısı olarak ALP, metabolizma, sinyal iletimi, molekül taşınması ve genetik bilginin ifadesine kadar pek çok biyolojik sürece aktif olarak katılır. ALP yapısal olarak beş sistein kalıntısı, iki çinko atomu ve ona katalitik bir işlev kazandıran bir magnezyum atomu içeren iki benzer monomerden oluşur (Coleman, 1992; E. E. Kim & Wyckoff, 1991; Millán, 2006a). Adından da anlaşılacağı gibi, ALP esas olarak biyolojik defosforilasyon için bir katalizör işlevi

görür ve alkali ortamlarda optimal olarak aktif hale gelir (Coleman, 1992; E. E. Kim & Wyckoff, 1991; Millán, 2006a). ALP'nin fizyolojik rolü canlı organizma için hayati önem taşıdığından, ALP hem prokaryotlarda hem ökaryotlarda bulunabilir. ALP, fosfat monoesterlerinin hidrolizini katalize eder ve ayrıca yüksek konsantrasyonlarda fosfat alıcılarının varlığında bir transfosforilasyon reaksiyonunu katalize eder. Katalitik mekanizmanın ana özellikleri memeli ve bakteri ALP'leri karşılaştırıldığında korunurken, memeli ALP'ları daha yüksek spesifik aktiviteye ve Km değerlerine sahiptir; daha alkali bir pH optimumuna sahiptir; daha düşük ısı kararlılığı gösterir; membrana bağlıdır ve L-amino asitler ve peptitler tarafından rekabetçi olmayan bir mekanizma yoluyla inhibe edilirler (Millán, 2006a).

Memeli ALP'leri geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir ve çok çeşitli fosfatlı bileşikler in vitro olarak hidrolize edebilir veya transfosforile edebilir. ALP'ların nükleotidlerin metabolizmasına da dahil olduğu görülmüştür. Say ve arkadaşları, ALP'nin geniş substrat özgüllüğü gösterdiğini ve ATP, ADP, AMP, PPi, glukoz-1-fosfat, glukoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat gibi şeker fosfatları ve β -gliserofosfat, hidrolize edebildiğini bildirmiştir. (JC Say, 1991). Kaynağına göre değişmekle birlikte optimum pH aralığı 6-12 ve optimum sıcaklık aralığı 15-95 °C arasındadır. Sığır barsaklarından izole edilen ALP için çalışma pH aralığı 7.4-10.4 arası bulunurken, çalışma sıcaklık aralığı ise 20-45 °C arasında bulunmuştur (*Information on EC 3.1.3.1 - Alkaline Phosphatase - BRENDA Enzyme Database*, n.d.).

2.4. Nafion

Nafion 1960'ların sonunda Dupont firmasından Walther Grot tarafından keşfedilen sülfonatlı politetrafloroetilen (PTFE) kimyasal yapısına sahip bir floropolimer-kopolimerdir (Church, 2006). Nafion, Chemours şirketinin bir markasıdır. Nafion, hem toz reçine hem de kopolimer olarak üretilir. Çeşitli kimyasal konfigürasyonlara ve dolayısıyla IUPAC sisteminde birkaç kimyasal isme sahiptir. Nafionun moleküler ağırlığı, işleme ve çözelti morfolojisindeki farklılıklar nedeniyle belirsizdir (Heitner-Wirguin, 1996; Mauritz & Moore, 2004). Şekil 5'te görülen bir Nafion biriminin yapısı, malzemenin değişkenliğini gösterir; örneğin, en temel monomer, eter grupları (z alt simgesi) arasındaki zincir varyasyonunu içerir. Bunun yerine, ticari olarak mevcut membranların çoğunu tanımlamak için eşdeğer ağırlık

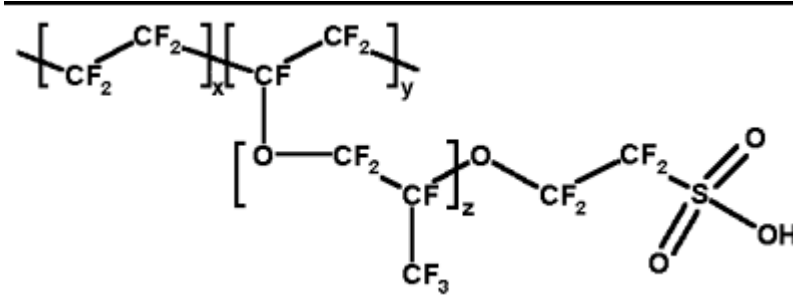
(EW) ve malzeme kalınlığı kullanılır. EW, malzeme asit formundayken sülfonik asit gruplarının molü başına kuru Nafion gram sayısıdır (Mauritz & Moore, 2004). Nafion membranlar genellikle EW ve kalınlıklarına göre sınıflandırılır (Kusoglu & Weber, 2017). Örneğin, Nafion 117, 1100 g/mol EW ve 0,007 inç (7 bin) kalınlığa sahip bir ekstrüzyon döküm membranı belirtir.

Asidik sülfonik gruplarla stabil PTFE omurgasının kombinasyonu Nafion'a şu özellikleri kazandırır:

- Katyonlara karşı oldukça iletkenidir, bu da onu birçok membran uygulaması için uygun hale getirir (Kusoglu & Weber, 2017)
- Kimyasal saldırılara karşı dayanıklıdır. Chemours'a göre, yalnızca alkali metaller (özellikle sodyum) Nafion'u normal sıcaklık ve basınçlarda bozabilir.
- İyonik sülfonat gruplarıyla iç içe geçen PTFE omurgası, Nafion'a yüksek bir çalışma sıcaklığında bile dayanıklılık sağlar.
- Seçicidir ve suya karşı geçirgenliği yüksektir.
- Sıcaklığa, hidrasyon durumuna, termal geçmişe ve işleme koşullarına bağlı olarak 0,2 S/cm'ye kadar proton iletkenliği vardır (Kusoglu & Weber, 2017)
- Nafion'daki perfloroalkil omurgalarının mevcudiyeti yapıya yüksek hidrofobiklik kazandırır, bu da onu sulu bir çözelti içinde grafen, karbon nanotüp, iyonik katı gibi bileşenleri dağıtmak için etkili bir matris haline getirir (Baghbaderani & Noorbakhsh, 2019; Luong et al., 2005; Sone et al., 1996).
- Ek olarak, Nafion, mükemmel film oluşturma kabiliyeti nedeniyle grafen ile modifiye edilmiş elektrotların stabilitesini arttırmaya yardımcı olur. Bir katyon değişim polimeri olarak Nafion, anyonik türlerin elektrot yüzeyine ulaşmasını engellemeye yardımcı olur ve katyon iletiminin geçmesine izin vererek iyi bir seçiciliğe yol açar (Alim et al., 2019).
- İlginç bir şekilde, Nafion filmindeki hidrofilik negatif yüklü sülfonat grubu, pozitif yüklü biyomoleküllerin elektrostatik etkileşim yoluyla seçici olarak

zenginleştirilmesini sağlarken, polimerin hidrofobik florokarbon ağı, molekülün hidrofobik kısmı için bir seçicilik sağlar (Alim et al., 2019).

İyonomerler olarak adlandırılan iyonik özelliklere sahip bir sentetik polimer sınıfının ilkidir. Nafion'un üstün iletken özelliklerinin kimyasal temeli, kapsamlı araştırmaların odak noktası olmaya devam etmektedir.



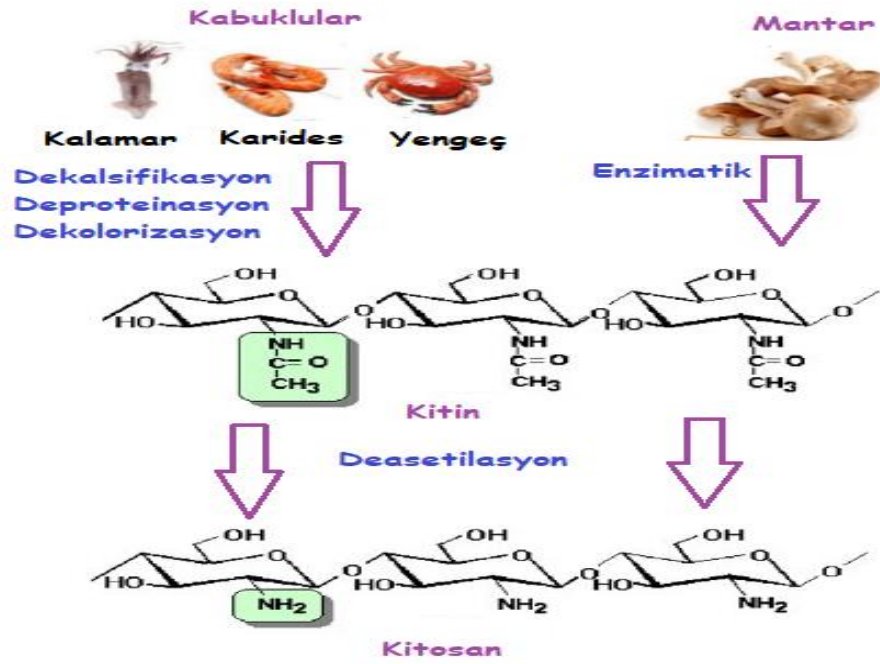
Şekil 5. Nafion'un kimyasal yapısı

2.5. Kitosan

Doğal ve lineer bir polisakkarit olan kitosan(CHIT), en önemli kitin türevlerinden biri olarak kabul edilir ve selülozdan sonra en bol bulunan ikinci doğal polisakkarittir (Petrucchi, Pasquali, et al., 2021). Kitin, eklem bacaklıların ve karideslerin dış iskeletlerinden ve kafadanbacaklıların gagalarından elde edilmiştir. Öte yandan kitosan, mantarlar gibi bazı mikroorganizmalarda da bulunur. Asidik bir ortamda nötr veya negatif yüklü olan diğer doğal polisakkaritlerin aksine, kitosan polikationik bir polimer gibi görünür (Hench, 1998). Bu, etkili bir elektrostatik etkileşim yoluyla diğer polimerlerle kompozitler veya çok katmanlı yapılar oluşturmalarını sağlar.

CHIT, Şekil 6'da şematik olarak gösterildiği gibi, alkali bir ortamda bir N-deasetilasyon işlemi yoluyla kitinden hazırlanır ve deasetilasyon derecesi, kitosanın özelliklerini modüle eder ve moleküler ağırlığını etkiler (Peter, 1995; Shahid-Ul-Islam et al., 2013; Zeng et al., 2012). Kimyasal bir bakış açısından, CHIT, bir β-1,4 glikosidik bağla birleştirilen D-glukozamin ve N-asetil D-glukozamin kopolimerlerinden oluşur . Farklı deasetilasyon derecelerine göre, kitosan yüksek

(>~500 kDa), orta (~50–500 kDa) ve düşük (<~50 kDa) moleküler ağırlıklı olarak üç kategoriye ayrılabilir (Jiang & Wu, 2019).



Şekil 6. Kitin ve kitosanın değişik kaynaklardan ekstraksiyonu (Petrucchi, Di Matteo, et al., 2021)

CHIT koşullara bağlı olarak farklı vizkozite ve çözünürlük değerlerine sahiptir. CHIT'nın sulu çözeltilerdeki çözünürlüğü, pH değeri (genellikle pH 6,5'in altında çözünürdür), iyonik kuvvet ve deasetilasyon derecesi değiştirilerek ayarlanabilir. Bunlara ek olarak CHIT'ın lineer yapısındaki reaktif amino ve hidroksil grupları onu biyo/kimyasal modifikasyonlar için uygun hale getirir (Petrucchi, Pasquali, et al., 2021; Shukla et al., 2013). Sonuç olarak, CHIT'ın yapısal ve işlevsel özellikleri, polimerin kolayca modifiye edilmesine izin vererek, belirli işlevler ve yetenekler sunar. Biyolojik/kimyasal bağlanma için uygun fonksiyonel grupların varlığı, yüksek mekanik stabilitesi gibi nedenlerle CHIT biyosensör dizaynında sıklıkla kullanılan bir biyopolimerdir. Yaygın doğal polimerler arasında kitosan, iyi mekanik mukavemet, hidrofilik, kolay işlenebilirlik ve biyouyumluluğun kimyasal avantajları, biyo-çevrede stabilite ve kimyasal modifikasyon yeteneği gibi fiziksel avantajlara sahiptir.

2.6. Prussian Blue

Amperometrik enzim biyosensörlerinin geliştirilmesi için en çok kullanılan konfigürasyon, bir oksidaz enziminin kullanımını içeren konfigürasyondur. Bu enzim sınıfı, substratı oksitler ve daha sonra elektronları moleküler oksijene aktardıktan sonra orijinal aktif durumlarına geri dönerek hareket eder, böylece bu enzimatik reaksiyonun son ürünleri, substratın oksitlenmiş formu ve bir yan ürün olarak hidrojen peroksit olur. Oksijen tüketimi (Mulchandani, 1998) veya peroksit (Guilbault & Lubrano, 1973; Updike & Hicks, 1967) oluşumu izlenerek substratın konsantrasyonu bulunabilir. Son yıllarda hidrojen peroksit ölçümüne dayalı yöntemler, oksijenin indirgenmesine dayalı yöntemlere göre büyük ölçüde tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bu yaklaşımdaki büyük bir dezavantaj, genellikle mevcut olan birçok elektroaktif maddenin (yani askorbik asit, ürik asit, vb.) gerçek örneklerde, girişim sinyalleri vermek için oksitlenebilmesidir.

Bu sorunun üstesinden gelmenin en yaygın yollarından biri, H_2O_2 'in indirgenmesini katalize eden prototipik bir hemeprotein peroksidaz olan yaban turpu peroksidaz (HRP) adlı başka bir enzimin kullanılması olmuştur (Lindgren et al., 2000; Ruzgas et al., 1996). HRP, aktif bölgesi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektron transferine izin verir. Bu yaklaşım, iyi bir hassasiyet ve doğruluk sergilemesine rağmen, yüksek maliyet, düşük stabilite ve HRP'nin katı yüzeylere sınırlı bağlanması gibi bazı önemli eksikliklerden muzdariptir.

Bu nedenle, son 30 yılda hidrojen peroksitin oksidasyonunu veya indirgenmesini katalize eden elektrokimyasal inorganik mediatörler (Chaubey & Malhotra, 2002; Newman et al., 1995) (Chaubey ve Malhorta, 2002, Zen ve diğerleri, 2003a, Newman ve diğerleri, 1995) HRP'ye tercih edilmiş ve oksidaz bazlı biyosensörlerin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Bu, uygulanan potansiyelin düşmesine ve bunun sonucunda birçok elektrokimyasal girişimin önlenmesine neden olur. Bu perspektifte, hekzasiyanoferratlar ve özellikle Prussian Blue (PB) (ferrik hekzasiyanoferrat—PB) geniş bir kullanım alanı bulmuştur.

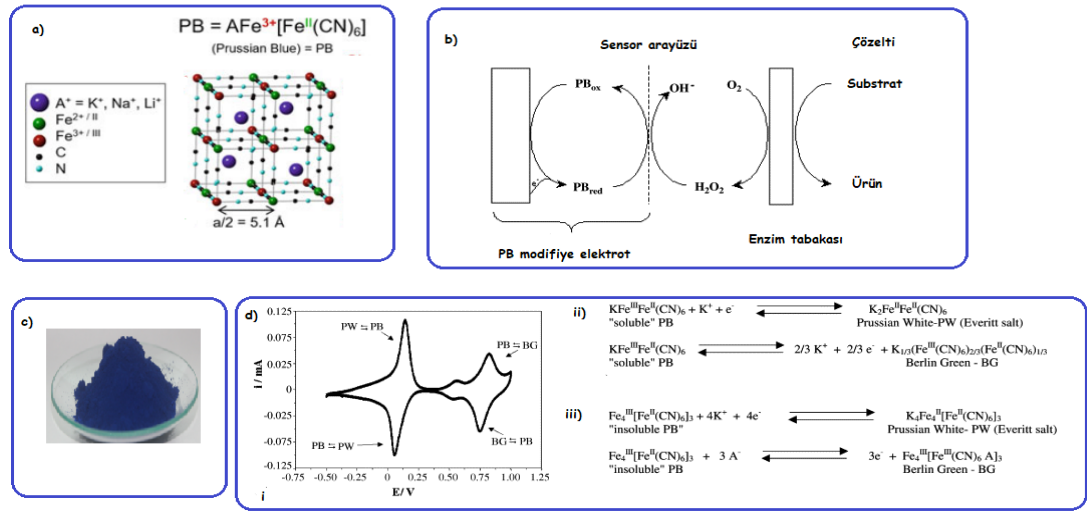
Tipik bir hekzasiyanoferrat koordinasyon bileşiği olan Prusya mavisi (PB), benzersiz özellikleri nedeniyle çeşitli bilimsel alanlarda büyük ilgi görmüştür (Şekil 7) (Ferreira et al., 2004; Karyakin et al., 1995). Prusya mavisi ilk olarak 1704'te Alman

boya üreticisi Diesbach tarafından koyu mavi pigment olarak kullanılmak üzere sentezlendi (Şekil 7c) (Holtzman, 1945). Bu malzeme, birim hücrenin yüz merkezli kübik bir yapısına sahiptir (Şekil 5 a), hücre kafesinin ideal kenar uzunluğu 10.143 Å'dir ve sadece üç elementten oluşur: demir, karbon ve azot (Herren et al., 1980; Itaya et al., 1986).

İlginç bir şekilde, PB'deki her komşu demirin, CN grubuyla iskeleti oluşturmak için Fe(II) ve Fe(III) olmak üzere iki farklı değeri vardır. Birim hücrenin her bitişik on iki Fe-CN-Fe kenarı, iletkenliği artırmak için Na^+ ve K^+ gibi alkali metal iyonlarının girişine izin veren büyük bir boşluk oluşturabilir (De Mattos et al., 2000; F. Ricci & Palleschi, 2005a). Standart formülü $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ olan PB'de Fe (II) CN grubuyla hegzagonal kompleks bağlarıyla bağlanır ve bu komplekste Fe (III) grubuyla bağlıdır. Toksik olmamasına ve biyoyumluluğuna ek olarak, PB, düşük enerji boşluğu nedeniyle katalitik işlevini indüklemek için kolayca uyarılabilir (Yamamoto et al., 2009). Yukarıdaki özelliklerin tümü, 1978'den beri elektrot malzemesi olarak yaygın olarak kullanılan PB'nin elektrokatalitik işlevini sağlar (Neff, 1978; F. Ricci & Palleschi, 2005a).

PB'nin elektrokimyasal özellikleri esas olarak demir elementlerinden elde edilir. Birim hücresindeki iki farklı demir valansından dolayı, PB, dış potansiyel tarafından kolay oksidasyon veya indirgeme için elektron hareketi üretebilir. Farklı valanslara sahip üç yaygın PB formu vardır: tüm Fe(II)'nin Fe(III)'e daha fazla oksidasyonu Berlin Green (BG) olarak adlandırılır; Fe(II) ve Fe(III)'ün karışık birlikteliği PB'dir; tüm Fe(III)'ün Fe(II)'ye dönüşümü Prusya White (PW) üretebilir (Şekil 7d) (Sgobbi et al., 2016; C. Shen et al., 2016). Bu tepkimeler döngüsel voltammogram (CV) ile açıklanabilir (Şekil 7 d). Şekil 7d'deki 1 ve 4 nolu redoks pikleri PB ile PW arasındaki döngüyü, 2 ve 3ncü pikler ise PB ile BG arasındaki döngüyü göstermektedir. Normalde, PB'nin sentez kaynakları K^+ veya Na^+ gibi alkali metal iyonları içerdiğinden, kafesinde iyonları olan hazırlanan PB zayıf çözünürlük gösterebilir (Doumic et al., 2016; Manivannan et al., 2016). PW'den PB'ye dönüşüme eşlik edebilen H_2O_2 bu döngüde transfer edilen elektronlarla hızlı bir şekilde OH^- 'e indirgenir ve PB'de uygun potansiyelde tekrar PW'ye indirgenir (Qiu et al., 2007). Bu süreçte PB, elektronları elektrot yüzeyinden H_2O_2 'e taşımak için elektron taşıyıcısı görevi görür.

4–6 nmol cm⁻² 'lık alana sahip PB filmi için elektrokimyasal hız sabiti 0.01cm s⁻¹'i aşmaktadır (Karyakin et al., 1998). H₂O₂ için katalitik etkiye sahip olan platin elektrotlarda hız sabiti ise 7×10⁻⁶ cm s⁻¹ 'dir (Y. Zhang & Wilson, 1993). Bu PB'nin platin elektroda göre neredeyse 1000 kat daha fazla bir katalitik etkinliğe sahip olduğunu gösterir. Platin elektrotlar üzerindeki hidrojen peroksit indirgeme akımı, oksijen indirgeme akımına kıyasla 10 kat daha düşüktür. Bu, oksijen varlığında düşük potansiyeller için H₂O₂'in saptanmasını pratik olarak imkansız hale getirir. Buna göre, platin üzerinde mümkün olan tek tespit prensibi, oldukça yüksek anodik potansiyelde H₂O₂ oksidasyonudur, ancak bu, çeşitli kolayca oksitlenebilir bileşiklerin oksidasyonu nedeniyle parazitik sinyalin ortaya çıkmasına neden olur (Karyakin, 2017).

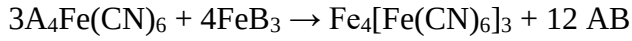


Şekil 7. a) PB'nin birim hücre yapısı (Piernas Muñoz & Castillo Martínez, 2018) ; b) PB temelli biyosensörlerin çalışma prensibi (F. Ricci & Palleschi, 2005b); c) Toz halinde PB; d) PB modifiye elektrodun döngüsel voltammogramı (Francesco Ricci et al., 2003) (i), çözünür PB'nin redoks tepkimesi (Ellis et al., 1981)(ii), çözünür olmayan PB'nin redoks tepkimesi (Itaya et al., 1986)

PB'nin elektrot yüzeyinde kullanımı modifiye edilmiş bir filmin oluşmasını gerektirir. Sıklıkla kullanılan iki yöntem vardır. Biri adezyona dayalı kimyasal reaksiyon yöntemi, diğeri ise elektrokimyasal depozisyon yöntemidir.

2.6.1. Kimyasal reaksiyon yöntemi

PB film sentezi için kimyasal reaksiyon yöntemi temel olarak [Fe(CN)₆]⁴⁻ ve Fe³⁺ iyonları arasındaki reaksiyona bağlıdır ve reaksiyon denklemi şu şekildedir:



Burada A, alkali metal iyonunu temsil eder ve B, eşleşen anyondur (Chu et al., 2017b). Ricci ve arkadaşları (Francesco Ricci et al., 2003) Screen Printed elektrodu (SPE) asit ortamında konsantrasyon oranı 1/1 olan çözeltiye daldırmış ve 1 saat bekletmiştir ve sonrasında 100 °C’de kurutmuştur. Bu PB filmi, pH=9'luk zayıf alkali koşullara karşı mükemmel pH toleransına sahiptir (normalde PB yalnızca asit ve nötr bir ortamda bulunabilir). PB filmlerinin kimyasal sentezi ile ilgili diğer çalışmalar, bu yöntemle benzerdir ve PB filminin performansını iyileştirmek için immobilizasyon yönteminde bir değişiklik ve film üzerinde çapraz bağlayıcıların kullanılması gibi bazı modifikasyon ve geliştirmeler gereklidir (Chadha et al., 2022; X. Shen et al., 2009). Şu anda, biyosensör uygulamalarında PB filmleri hazırlamak için kimyasal reaksiyon yöntemini benimseyen sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu yöntem hızlı bir şekilde büyük miktarda PB üretebilse de, sentezlenen PB'nin nano yapısını tatmin edici tekrarlanabilirlikle kontrol etmez. Ayrıca, ex-situ hazırlama genellikle elektron transferinin verimliliğini azaltmak için arayüz direncini artıran yapışkan çapraz bağlayıcıların yardımını gerektirir.

2.6.2. Elektrokimyasal depozisyon yöntemi

Elektrokimyasal biriktirme, PB film hazırlama için en sık kullanılan teknolojidir. Film oluşumu için çalışma elektrodu üzerindeki elektroaktif hedefin indirgenmesini veya oksidasyonunu sağlamak için elektrot üzerindeki belirli döngü potansiyellerini kullanarak çalışır. Literatürde elektrokimyasal biriktirme temel olarak üç stratejiden oluşur: sabit akım, sabit potansiyel ve CV tarama (Chu et al., 2017b).

PB film hazırlama için bu yaklaşımın ilk benimsenmesi 1978'dedir. Neff ((Neff, 1978), eşit miktarda 0,01 M FeCl₃ ve K₄[Fe(CN)₆] içeren 1 M HCl kullanılarak hazırlanan reaktif bir çözeltiye daldırılan platin folyoya 1 saat 1 mA sabit akım uygulamıştır. Bu elektrot, ilk elektro-birikimli PB filmiydi ve bu çalışmadan ilham alınarak çok sayıda modifiye edilmiş elektrokimyasal biriktirme yaklaşımı geliştirilmiştir. Daha sonra, Itaya ve ark. (Itaya et al., 1986), PB film hazırlama için katodik olarak polarize bir elektrotu bir ferrik ferrisiyanür çözeltisi karışımına daldırdı. Çalışma elektrot malzemesinin, elektrodpozisyon üzerinde büyük bir etkisi olduğunu öne sürdü. Organik substratlar, PB filminin oksidasyonu sırasında çok

zayıf adezyon ile elektrot yüzeyinde PB'nin hızlı bir şekilde kaplanması nedeniyle elektrokimyasal biriktirmede kullanılamaz. Karyakin ve ark. (Karyakin et al., 1999), bir PB filminin hazırlanması için sabit bir potansiyel (0,4 V) kullanmış ve 60 s biriktirmeden sonra oldukça hassas bir PB biyosensörü elde etmiştir. Bu çalışma, PB'nin nötr destekleyici elektrolit çözeltileri ile negatif potansiyel altında kararlılığını koruyabildiğini göstermiştir. Aynı grup belli potansiyel arası (-0,1&0,5 V arası) CV taraması ile camımsı karbon elektrot yüzeyinde PB biriktirmiştir (Karyakin et al., 2007). Bildirildiği gibi, destekleyici elektrolit seçimi, elektrodpozisyon davranışını güçlü bir şekilde etkileyebilir (Abbaspour & Kamyabi, 2005). Çeşitli metal tuzları ((KCl, K₂SO₄, KNO₃, KF, KClO₄, K₂CO₃ NH₄NO₃, CsNO₃ and RbNO₃) depozisyon çözeltisinde denenmiştir. Sonuçlar, KCl'ün CV taraması kullanarak çok düşük bir potansiyel aralığı altında biriktirme verimliliğini desteklediğini gösterdi.

Bugüne kadar, elektrokimyasal biriktirme, PB filmlerinin yerinde hazırlanması için hala oldukça verimli bir yöntemdir.

2.7. Screen Printed Elektrotlar

Screen printed elektrotlar (SPE'ler), serigrafi teknolojisine dayalı tek kullanımlık sensörlerdir. Farklı seramik veya plastik yüzeylere çeşitli mürekkep türleri basılarak oluşturulurlar. Polyester ekranlar genellikle baskı için kullanılır; Bu ekranların analitik uygulamasına dayalı olarak, analist bu ekranların farklı modellerini tasarlayabilir. Analitik prosedür için gereken hem seçicilik hem de hassasiyet esas olarak baskı için kullanılan mürekkeplerin bileşimi ile belirlenir. Ayrıca, bu tür cihazların geniş bir yelpazesi ticari olarak mevcuttur. SPE'lerin yüzeyleri çeşitli analitler için modifiye edilebilir. Çok amaçlı SPE'ler üretmek için iki ana strateji vardır: I) polimerler, metaller, kompleks oluşturucu maddeler ve enzimler gibi çeşitli maddeler ekleyerek baskı mürekkeplerinin bileşimini değiştirmek ve II) metal filmler, enzimler ve polimerler gibi elektrot yüzeylerine çeşitli maddeler immobilize ederek elektrotları modifiye etmek (Honeychurch & Hart, 2003).



Şekil 8. SPE elektrodun bileşenleri

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan gereçler ve kimyasallar

Galaktoz oksidaz (kaynak: Dactylium dendroide, $\geq 3,000$ units/g solid), alkalen fosfataz (Kaynak: Sığır bağırsak mukozası, ≥ 10 DEA units/mg solid), kitosan (orta moleküler ağırlıklı), nafion-117, potasyum hekzasiyanoferrat (III), potasyum hekzasiyanoferrat (II), potasyum klorür, sodyum klorür, hidroklorik asit, potasyum fosfat dibazik, potasyum fosfat monobazik, galaktoz , galaktoz-1-fosfat, Altın nanopartikül solüsyonu (5 nm çapında) ve diğer kimyasallar Sigma -Aldrich (U.S.A)’den temin edilmiştir.

Tablo 2. Tez projesi kapsamında kullanılan gereçlerin adları, marka ve modelleri

Gereç		Marka-Model
Otomatik Pipetler	100-100 µl	Brand
	10-100 µl	Gilson
	1-5 ml	Lab Mate
Buzdolabı (+4 °C)		Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)		Arçelik
Analitik Terazı		Scaltec SBC31
Santrifüj		Nüve
Vorteks		IKA MSI Minishaker
Etüv		Memmert
Ultrasonik Banyo		Georg Pauldrach-Endosonic Med
Potansiyostat		Emstat 3 (Palm Sens)
Elektrotlar		Screen printed karbon elektrot (C110) (Dropsens)
Ölçüm Hücresi		DR-CELL-PEEK CELL (Dropsens)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Potasyum fosfat çözeltisinin (PBS) hazırlanması : 50 mM pH:7,5 PBS suda hazırlanır. Bunun için 6,8045 g KH_2PO_4 tartılır ve 1 L distile su içinde çözülür. pH ayarlaması 0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH ile yapılır.

Tris-HCl tamponunun hazırlanması : 50 mM pH:8 Tris-HCl tamponu ultra saf su ile hazırlanır. Bunun için 6,05 gram Tris bazı tartılır ve 1 L distile su içinde çözülür. pH ayarlaması 0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH ile yapılır.

Galaktoz oksidaz karışımının hazırlanması: 40 mg galaktoz oksidaz tartılır. 0,5 mL ultra saf su içinde çözülür. 15 μL 'lik porsiyonlara ayrılarak -40°C 'de saklanır.

Alkalen fosfataz karışımının hazırlanması: 40 mg alkalen fosfataz 1 mL Tris-HCl (1 mM MgCl_2 içeren) içinde çözülür. 15 μL 'lik porsiyonlara ayrılarak -40°C 'de saklanır.

Stok galaktoz çözeltisinin hazırlanması (1M) : 1,80 g galaktoz 10 mL yapay serum içerisinde çözünür.

Stok galaktoz-1-fosfat çözeltisinin hazırlanması (0,1 M): 0,26 g Gal-1-P 10 mL yapay serum içerisinde çözünür.

PB elektrobiriktirme çözeltisinin hazırlanması: 2,0 mM FeCl_3 , 2,0 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,1 M KCl ve 20 mM HCl içeren karışım distile su içinde hazırlanır.

Kitosan çözeltisinin hazırlanması (%1): 1 g kitosan tartılır ve 100 mL %1'lik asetik asit içinde çözülür. Seyreltmeler gene %1'lik asetik asit içerisinde yapılır.

Nafyon çözeltisinin hazırlanması: %5'lik Nafyon çözeltisinden 200 μL üzerine 800 μL distile su eklenir.

%2,5'luk glutaraldehit çözeltisinin hazırlanması: %25'lik glutaraldehit çözeltisinden 100 μL alınır ve üzerine 900 μL PBS eklenir.

5 mM Ferri/ferro prob çözeltisinin hazırlanması: 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS içinde hazırlanır.

Yapay serum hazırlanması: 111 mM NaCl, 2,9 mM NaHCO₃, 2,2 mM K₂HPO₄, 0,8 mM MgCl₂, 2,5 mM üre, 5 mM KCl karıştırılır ve pH'ı 7,4'e ayarlanır (Q. Wang et al., 2021).

3.2.2. Örneklerin toplanması

Galaktozemili ve sağlıklı kontrol kanlarının toplanması için gereken izin Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 20-7T/36 numaralı karar ile onaylanmıştır. Galaktozemi tanısı için gereken plazma galaktoz ve eritrosit Gal-1-P düzeyleri yeni doğan döneminde çok yüksek olmakla birlikte diyetle birlikte sağlıklıların seviyeleri kadar olmasa da düşmektedir. Galaktozemili bir hastayı yenidoğan döneminde yakalamak çok zor olduğu için sağlıklı ve hasta plazma galaktoz ve eritrosit total galaktoz düzeyleri sağlıklılardan elde edilen plazma ve eritrosit hemolizatlarına rastgele standart katmalar yoluyla elde edilmiştir. Yalnızca 1 galaktozemili hastaya ait örnek yenidoğan döneminde elde edilmiştir. Sağlıklılardan elde edilen plazma ve eritrosit hemolizatları 10'u sağlıklı, 10'u hasta düzeylerini içerecek şekilde porsiyonlara ayrılmıştır.

EDTAlı tüpte alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üst faz (plazma) bir ependorfa aktarılır ve çalışılncaya kadar -40 °C'de saklanır. Alt faza tüpün üst çizgisine gelecek kadar serum fizyolojik eklenerek eritrosit pelleti yıkanır . Bu işlem 2 defa daha tekrarlandıktan sonra eritrosit pelletinden 200 µL üzerine 800 µL soğuk su eklenerek eritrosit hemolizati hazırlanmış olur (Akçay et al., 2012). Elde edilen hemolizat çalışılncaya kadar -40 °C'de saklanır.

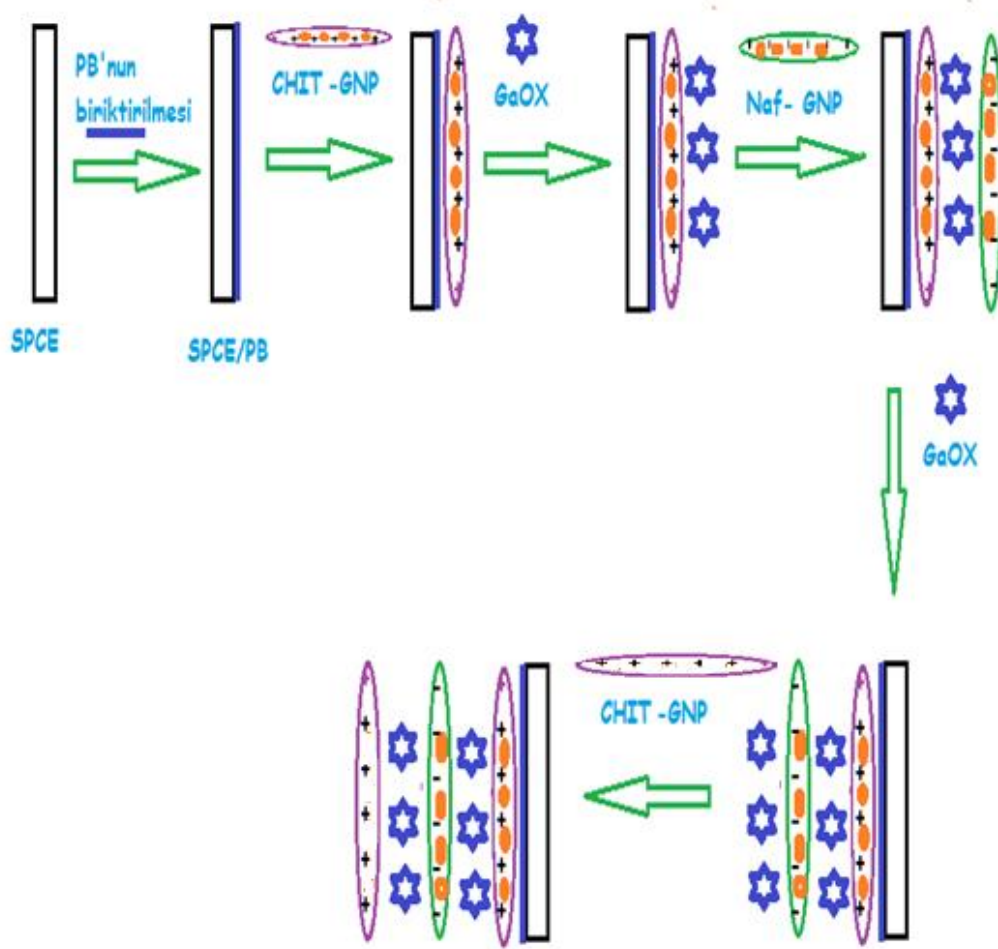
3.2.3. Serbest galaktoz biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar

3.2.3.1. Serbest galaktoz biyosensörünün hazırlanması

Bu çalışmada screen printed karbon elektrot (SPCE) yüzeyi modifiye edilerek serbest galaktoz biyosensörü oluşturulmuştur. Biyosensör yapımının şematik gösterimi Şekil 9'da verilmiştir. Optimize edilmiş biyosensör hazırlama aşamaları şu şekildedir:

- **SPCE/PB oluşturulması** (Khumngern et al., 2021) : SPCE doygun Na₂CO₃ çözeltisine daldırılır ve 1,20 V'da 300 saniye amperometrik olarak taranarak elektrot yüzeyinin kirlilikten arındırılması sağlanır. SPCE 2,0 mM FeCl₃, 2,0

mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,1 M KCl ve 20 mM HCl içeren karışıma daldırılır. -0,2V&1,0 V arası döngüsel voltametri ile taranarak 20 döngü alınır. Ardından sabit voltammogramlar elde edilene kadar 0,1 M KCl ve 20 mM HCl içeren çözeltiye daldırılır ve -0,2&1,0 V arası taranır. Stabilizasyon için PB biriktirilmiş SPCE etüve konulur ve 100 °C’de 30 dakika kurutulur



Şekil 9. Serbest galaktoz biyosensörünün hazırlanması aşamaları

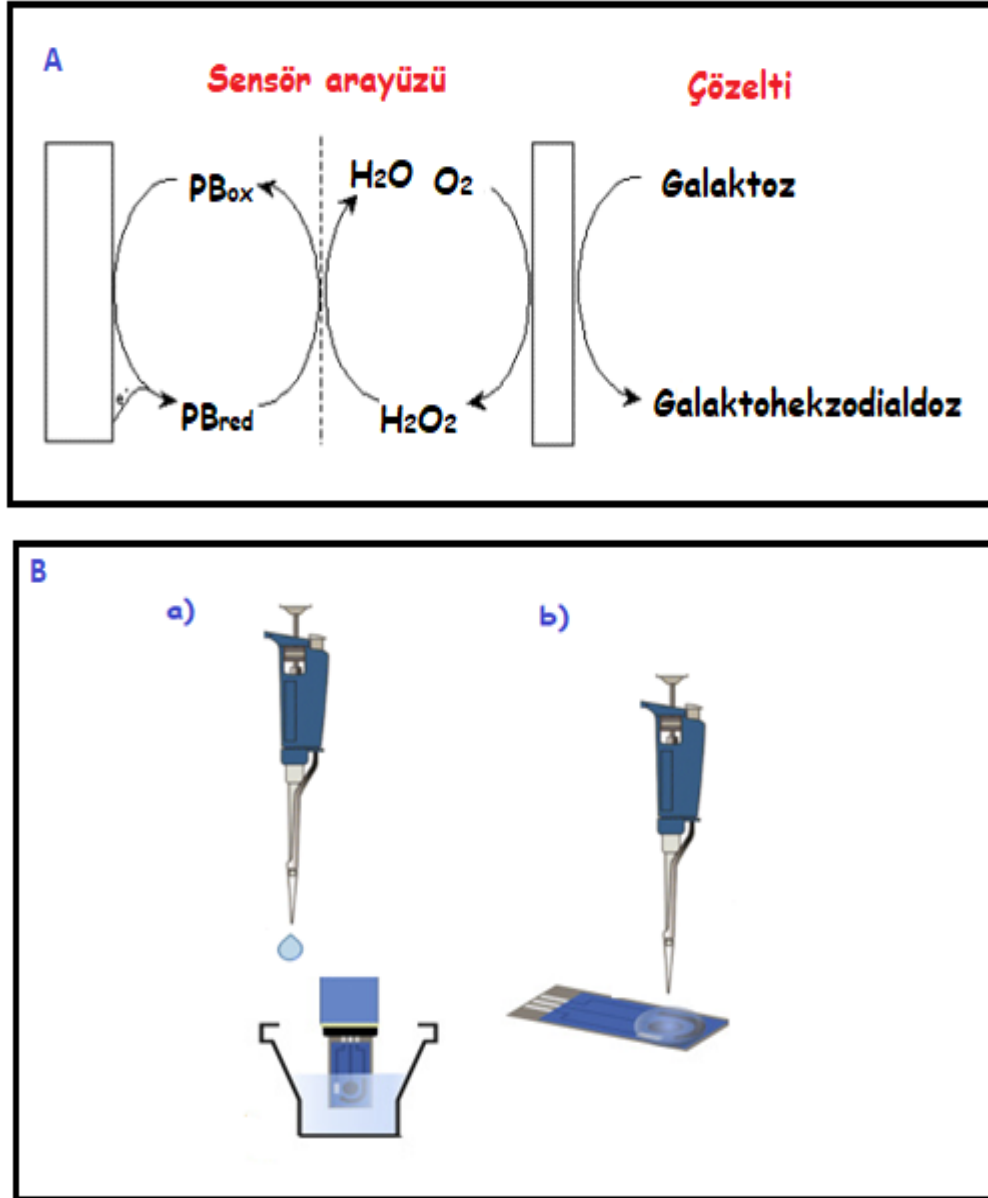
- **SPCE/PB/CHIT-GNP oluşturulması:** %1’lik asetik asit içinde hazırlanmış %0,1’lik kitosan çözeltisinden ve altın nanopartikül (GNP) süspansiyonundan 5’er μ L elektrot yüzeyine damlatılır ve oda sıcaklığında kuruması beklenir.

- **SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX oluşturulması:** 10 mg/mL’lik galaktoz oksidaz (GaOX) süspansiyonundan 5 µL elektrot yüzeyine damlatılır ve +4 °C’de kuruması beklenir.
- **SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/Naf-GNP oluşturulması:** SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX modifiye elektrot yüzeyine %0,1’lik Nafyon çözeltisinden 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Kuruyan elektroda 5 µL GNP damaltılır ve elektrodun kuruması için beklenir.
- **SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/Naf-GNP/GaOX oluşturulması:** 10 mg/mL’lik galaktoz oksidaz (GaOX) süspansiyonundan 5 µL elektrot yüzeyine damlatılır ve +4 °C’de kuruması beklenir.
- **SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/Naf-GNP/GaOX/CHIT oluşturulması:** SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/Naf-GNP/GaOX modifiye elektrot yüzeyine 5 uL CHIT çözeltisinden eklenir ve +4 °C’de kuruması beklenir. Son olarak elektrot yüzeyine %2,5’luk glutaraldehit çözeltisinden 50 µL eklenir ve 20 dakika bekletilir. Beklemeden sonra elektrot yüzeyi bidistile su ile yıkanır.
- İmmobilizasyondaki temel mekanizma katyonik kitosan ve polianyonik bir matriks olan nafyon arasında oluşan elektrostatik çekim vasıtasıyla enzimin elektrot yüzeyine tutunmasıdır. Burada GNP’nin kullanılma amacı hem iletkenliği arttırmak hem de sağladığı geniş yüzey alanı ile daha fazla enzimi adsorbe etmektir.

3.2.3.2. Serbest galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi şematik olarak şekil 10’da gösterilmiştir. Galaktoz oksidaz aktivitesi sonucu açığa çıkan ve elektroaktif bir bileşik olan H₂O₂’in elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi birçok galaktoz oksidaz biyosensörünün çalışma prensibini oluşturmaktadır. Ne var ki elektroaktif bir bileşik olan H₂O₂’in yükseltgenme potansiyeli yüksektir ve askorbik asit, ürik asit gibi birçok elektroaktif türün girişimine açıktır. Bu nedenle bu çalışmada H₂O₂’i indirgeyerek daha düşük potansiyellerde çalışma imkanı verecek bir molekül olan PB elektrot yüzeyinde kullanılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmalarında serbest galaktoz biyosensör cevabı için en yüksek akım farklarının -0,05 V’ta olduğu

bulunmuştur. Bu nedenle biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları bu çalışma potansiyelinde yürütülmüştür. Çalışmalar pH:7,5 50 mM PBS (0,1 M KCl içeren) tamponunda amperometrik olarak yapılmıştır. Amperometrik ölçümler karıştırırmalı ve damlatırmalı olarak iki şekilde yapılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. A) Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi. B) a) Karıştırırmalı yöntem
b) Damlatırmalı yöntem

Karıştırılmalı yöntem : Yapay serumda hazırlanmış galaktoz standartlarından 500 µL 4,5 mL tampon içeren ölçüm kabına eklenmiştir. Ölçüm sırasında çözelti manyetik karıştırıcı ile 2000 rpm hızında karıştırılmaktadır (Şekil 10B-a).

Damlatılmalı yöntem: Yapay serumda hazırlanmış galaktoz standartlarından 25 µL ve tampon çözeltisinden 25 uL bir ependorfta karıştırılır. Son karışımdan 50 µL çözelti elektrot yüzeyine damlatılır ve -0,05 V'ta ölçüm alınır (Şekil 10B-b).

3.2.3.3. İmmobilizasyon konfigürasyonunun belirlenmesi

Bu tez çalışmasında immobilizasyondaki temel prensip kitosan ve nafyon arasındaki elektrostatik çekimlerle enzimin elektrot yüzeyine tutunmasının sağlanmasıdır. Bu amaçla denenen immobilizasyon konfigürasyonları şu şekildedir:

- **SPCE/PB/Naf/GaOX/CHIT** : Önce %0,1'lik nafyon çözeltisinden 5 µL elektrot yüzeyine damlatılır ve kuruması beklenir. Sonra 20 mg/mL enzim süspansiyonundan 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Son olarak %0,1'lik kitosan çözeltisinden 5 µL eklenir ve kuruması beklenir.
- **SPCE/PB/CHIT/GaOX/Naf** : Önce %0,1'lik kitosan çözeltisinden 5 µL elektrot yüzeyine damlatılır ve kuruması beklenir. Ardından 20 mg/mL enzim süspansiyonundan 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Son olarak %0,1'lik nafyon çözeltisinden 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir.
- **SPCE/PB/Naf/GaOX/CHIT/GaOX/Naf**: Önce %0,1'lik nafyon çözeltisinden 5 µL elektrot yüzeyine damlatılır ve kuruması beklenir. Sonra 10 mg/mL enzim süspansiyonundan 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Ardından %0,1'lik kitosan çözeltisinden 5 uL eklenir ve kuruması beklenir. Tekrar 10 mg/mL enzim süspansiyonundan 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Son olarak %0,1'lik nafyon çözeltisinden 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir.
- **SPCE/PB/CHIT/GaOX/Naf/GaOX/CHIT**: Önce %0,1'lik kitosan çözeltisinden 5 µL elektrot yüzeyine damlatılır ve kuruması beklenir. Ardından 10 mg/mL enzim süspansiyonundan 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Sonra %0,1'lik nafyon çözeltisinden 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir.

beklenir. Tekrar 10 mg/mL enzim süspansiyonundan 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir. Son olarak %0,1'lik kitosan çözeltisinden 5 µL damlatılır ve kuruması beklenir.

Her konfigürasyon için elektrot yüzeyine 100 µg enzim tutundurulmuştur. Böylelikle enzim miktarından kaynaklanabilecek farklanmanın önüne geçilmiştir. Ölçümler 0,2-10 mM arası galaktoz standartları ile her nokta 5 tekrarlı olmak üzere çalışılmıştır.

3.2.3.4. Kitosan konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Kitosan konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla enzim (10 mg/mL) ve nafyon (%0,1) miktarı sabit olmak üzere altı farklı konsantrasyonda kitosan içeren (%0,05; %0,1; %0,25; %0,5; %0,75 ve % 1) biyosensörler hazırlandı. Galaktozun değişen (0,2-10 mM arası) derişimleri ile akım farkları arasında grafikler çizilerek en hassas ve kesin biyosensör yanıtının elde edildiği kitosan konsantrasyonu bulunmuştur. Sonraki adımlarda bu konsantrasyonda kitosan kullanılarak biyosensörler hazırlanmıştır.

3.2.3.5. Nafyon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Nafyon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla enzim (10 mg/mL) ve kitosan (%0,1) miktarı sabit olmak üzere altı farklı konsantrasyonda nafyon içeren (%0,05; %0,1; %0,25; %0,5; %0,75 ve % 1) biyosensörler hazırlandı. Galaktozun değişen (0,2-10 mM arası) derişimleri ile akım farkları arasında grafikler çizilerek en hassas ve kesin biyosensör yanıtının elde edildiği nafyon konsantrasyonu bulunmuştur. Sonraki adımlarda bu konsantrasyonda nafyon kullanılarak biyosensörler hazırlanmıştır.

3.2.3.6. Damlatma hacminin biyosensör cevabına etkisi

İmmobilizasyon bileşenlerinin elektrot yüzeyine damlatma miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla 2,5-5-7,5-10 µL olmak üzere 4 farklı hacim denenmiştir. Galaktozun değişen (0,2-10 mM arası) derişimleri ile akım farkları arasında grafikler çizilerek en hassas ve kesin biyosensör yanıtının elde edildiği damlatma hacmi bulunmuştur.

3.2.3.7. Altın nano partikül kullanılmasının biyosensör cevabına etkisi

Altın nanopartikül kullanılmasının biyosensörün cevabına etkisinin incelenmesi amacıyla altın nanopartiküllü ve altın nanopartikülsüz elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen cevaplar hassaiyet ve tekrarlanabilirlik açısından kıyaslanmıştır.

3.2.3.8. Galaktoz oksidaz miktarının biyosensör cevabına etkisi

Enzim konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla nafyon (%0,1) ve kitosan (%0,1) miktarı sabit olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda enzim içeren (2,5-5-10-20-40 mg/mL) biyosensörler hazırlandı. Galaktozun değişen (0,2-10 mM arası) derişimleri ile akım farkları arasında grafikler çizilerek en hassas ve kesin biyosensör yanıtının elde edildiği enzim miktarı bulunmuştur.

3.2.3.9. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün optimum pH'ının belirlenmesi

Bu bölümde geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün optimum pH'ını belirlemek için her biri 50 mM olan tamponlar kullanılmıştır. pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 için sodyum sitrat tamponları kullanılırken ve pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 için potasyum fosfat ve pH 8,5 ve 9,0 için Tris HCl tamponları kullanılarak 1 mM galaktoz için akım farkı belirlenmiştir. Akım farklarından % biyosensör cevapları hesaplanarak optimum pH grafikleri oluşturulmuştur. En yüksek akım farklarının alındığı pH değeri ile hazırlanan tampon çözeltisi tüm çalışmalarda ölçüm tamponu olarak kullanılmıştır.

3.2.3.10. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesi

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmek için 20–45°C arasındaki sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ile % biyosensör yanıtına ilişkin optimum sıcaklık grafikleri yardımıyla optimum sıcaklık bulunmuştur.

3.2.3.11. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Çalışma koşulları, elektrot yüzeyi ve enzim miktarı optimizasyonu yapılan serbest galaktoz biyosensörü ile yapay serumda galaktoz tayini gerçekleştirilmiştir. Son derişimleri 0,001-10 mM arasında olacak şekilde galaktoz çözeltileri çalışma tamponuna eklenmiş ve derişime karşı akım farkı ile grafik çizilmiştir. Doğrusal tayin aralığı hem karıştırmalı yöntem için hem de damlatmalı yöntem için belirlenmiş ve grafiğı çizilmiştir.

3.2.3.12. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği

Tekrarlanabilirlik denemesi düşük (0,1 mM), orta (1 mM) ve yüksek (10 mM) galaktoz derişimlerinde olmak üzere 3 seviyede 6 tekrarlı olarak hem gün içi hem de günler arası olarak gerçekleştirilmiş, ortalama değeri ($\bar{x}$), standart sapma (S.S. $\pm$) ve % varyasyon katsayısı (% V.K.) değeri hesaplanmıştır.

Tekrar üretilebilirlik için 6 farklı elektrotla oluşturulan biyosensörlerle tayin aralığında çalışılmış standart grafiğı çizilmiş, grafiğın denklemi oluşturulmuş ve eğimlerinden %V.K. değeri hesaplanmıştır.

3.2.3.13. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı ve girişim etkisinin belirlenmesi

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğının belirlenmesi amacı ile denemelerde galaktoz yerine tampon içinde son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde glukoz, fruktoz, maltoz, sakkaroz ve laktoz substratları kullanılmıştır. Galaktoza yönelik biyosensör cevabı % 100 kabul edilmiş, diğer substratlar için bulunan biyosensör cevapları ile kıyaslanmıştır. Veriler % biyosensör cevabına karşı substrat çeşidi olarak sütun grafiğı çizilmiştir.

Girişim etkisi denemesinde ise glukoz (5 mM), askorbik asit (250 uM), ürik asit (0,5 mM), kreatinin (5 mM) ve kreatin (100 mM) 10 mM galaktoz içeren örneğeye ayrı ayrı

eklenmiştir (Q. Wang et al., 2021). Tek başına galaktoz yanıtı % 100 kabul edilmiş, diğer substratlar + galaktoz cevapları ile kıyaslanıp ve grafiğe geçirilmiştir.

3.2.3.14. Örnek uygulaması denemesi

Sağlıklı ve hasta düzeylerini içerecek şekilde hazırlanan 10 sağlıklı, 11 galaktozemili (10 örnek plazma havuzundan 1 örnek ise gerçek galaktozemili hastadan elde edilmiştir) plazma örneklerinde geliştirilen serbest galaktoz biyosensörü ve kolorimetrik galaktoz kitiyle (Sigma, MAK012) galaktoz tayini yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda sağlıklı kişilerden alınan plazma örneklerine standart katma yapılarak düşük (0,1 mM), orta (1 mM) ve yüksek (10 mM) olmak üzere üç seviye için % geri elde hesaplanmıştır.

Ticari kit (Sigma, MAK012) ile galaktoz ölçüm protokolü

Ürün tanıtımı: Galaktoz oksidaz aktivitesi sonucu galaktoz galaktoheksodialdoza dönüşürken açığa çıkan H_2O_2 renk probu ile Trup Peroksidazı tarafından renk veren bir ürüne katalizlenir. Oluşan renk kolorimetrik (570 nm)/florometrik (ekstinksiyon dalga boyu: 535 nm/emisyon dalga boyu:587 nm) olarak 570 nm’de ölçülür. Oluşan ürün galaktoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu kit serum, plazma, diğer vücut sıvıları gibi birçok matriks için uygundur. Kitin doğrusal tayin aralığı kolorimetrik yöntem için 0,04-0,2 mM arasında florometrik yöntem için ise 0,004-0,020 mM arasındadır.

Kolorimetrik Yöntem Protokolü: 100 mM 10 µL galaktoz standart çözeltisi 990 µL galaktoz çalışma tamponu ile 1 mM’a seyreltilir. Bu çözeltiden sırasıyla 0-2-4-6-8 ve 10 µL standart kuyucuklara eklenir. Her bir kuyucuğa galaktoz çalışma tamponu eklenerek her kuyucukta 50 µL olması sağlanır.

Örnek hazırlama: Sıvı örneklerden 50 µL direk kuyucuğa eklenir.

Kolorimetrik master reaksiyon karışımı oranı: Her bir kuyucukta 44 µL çalışma tamponu, 2’şer µL galaktoz probu, galaktoz enzim karışımı ve HRP olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanır.

Bu karışımdan 50 µL her bir kuyucuğa eklenir, iyice karıştırılır ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyon karanlıkta gerçekleştirilir. 570 nm’de absorbansı ölçülür. Standart graafiginden örnekteki galaktoz konsantrasyonu hesaplanır.

3.2.3.15. Serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığı

Depo kararlılığının belirlenmesi için geliştirilen serbest galaktoz biyosensörü 12 hafta boyunca 1 mM galaktoz derişimi için test edilmiştir. Ölçümler haftada bir yapılmıştır. Bu sürede ölçüm dışında biyosensör oda sıcaklığı ve +4 °C’de saklanmıştır.

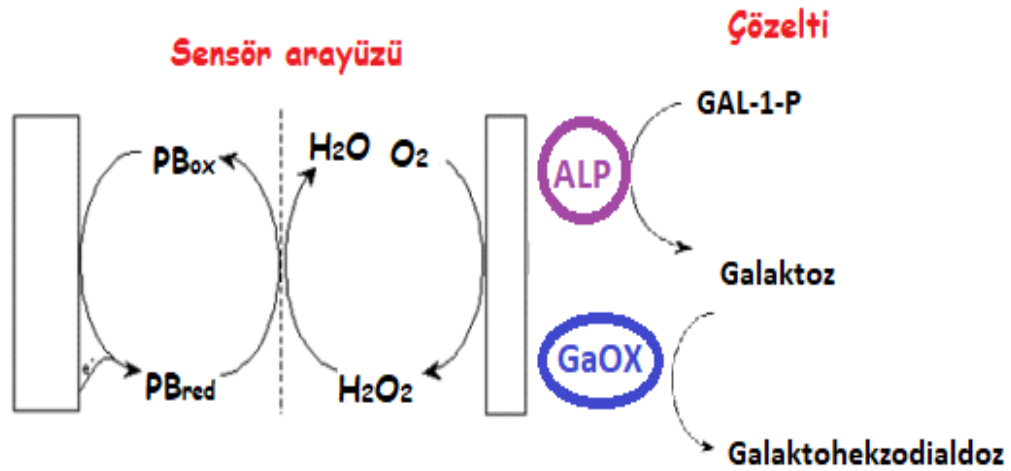
3.2.4. Total galaktoz biyosensörünün geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar

3.2.4.1. Total galaktoz biyosensörünün hazırlanması

Total galaktoz biyosensörünün hazırlanması aşamaları serbest galaktoz biyosensörü ile hemen hemen aynıdır. Tek fark enzim süspansiyonunun alkalen fosfatazı da içermesidir. Bu aşamada 10 mg/mL GaOX ve 5 mg/mL ALP içeren enzim süspansiyonu bölüm 3.2.3.1’de gösterilen şekilde ve zamanda elektrot yüzeyine eklenir.

3.2.4.2. Total galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi

Total galaktoz biyosensöründe temel amaç Gal-1-P’ı da ölçebilmektir. Serbest galaktoz biyosensörü ile yapılan çalışmalar GaOX’un Gal-1-P’ı da oksitleyebildiğini göstermiştir fakat ölçüm hassasiyeti yeteri kadar iyi değildir. Bu nedenle biyosensör hassasiyetinin artırılması için ALP enzimi elektrot yüzeyine immobilize edilerek iki enzimli biyosensör sistemi kullanılmıştır. ALP Gal-1-P’yi galaktoza hidrolizlerken açığa çıkan galaktoz GaOX tarafından oksitlenir. Bu tepkimede oluşan H₂O₂ ise PB tarafından elektrot yüzeyinde indirgenir. Optimizasyon çalışmalarında total galaktoz biyosensör yanıtının amperometrik olarak en iyi -0,1 V’ta olduğu bulunmuştur. Bu nedenle optimizasyon ve karakterizasyon ile ilgili çalışmalar bu çalışma potansiyelinde yapılmıştır. Denemeler pH:8 50 mM Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl₂ içeren) tamponunda amperometrik olarak yapılmıştır. Amperometrik ölçümler karıştırmalı ve damlatmalı olarak iki şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 11. Total galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi

3.2.4.3. Alkalen fosfataz miktarının biyosensör cevabına etkisi

ALP konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla nasyon (%0,1), kitosan (%0,1) ve GaOX (10 mg/mL) miktarı sabit olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda ALP içeren (2,5-5-10-15-20 mg/mL) biyosensörler hazırlandı. Gal-1-P'in değişen (0,2-10 mM arası) derişimleri ile akım farkı arasında grafikler çizilmiştir. En hassas ve kesin biyosensör yanıtının elde edildiği ALP miktarı bulunmuştur.

3.2.4.4. Geliştirilen total galaktoz biyosensörün optimum pH'ının belirlenmesi

Bu bölümde geliştirilen total galaktoz biyosensörünün optimum pH'ını belirlemek için her biri 50 mM olan tamponlar kullanılmıştır. pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 için Tris-HCl tamponları kullanılırken, pH 9,5; 10,0 ve 10,5 için Glisin tamponları kullanılarak 1 mM galaktoz için akım farkı belirlenmiştir. Akım farklarından % biyosensör cevapları hesaplanarak optimum pH grafikleri oluşturulmuştur. En yüksek akım farklarının alındığı pH değeri ile hazırlanan tampon çözeltisi tüm çalışmalarda ölçüm tamponu olarak kullanılmıştır.

3.2.4.5. Geliştirilen total galaktoz biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi

Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 1 mM Gal-1-P için 20–45 °C arasındaki sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ile % biyosensör yanıtına ilişkin optimum sıcaklık grafikleri yardımıyla optimum sıcaklık bulunmuştur.

3.2.4.6. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Çalışma koşulları, elektrot yüzeyi ve enzim miktarı optimize edilen total galaktoz biyosensörü ile yapay serumda Gal-1-P tayini gerçekleştirildi. Son konsantrasyonları 0,001-10 mM arasında olacak şekilde Gal-1-P çözeltileri çalışma tamponuna eklenmiş derişime bağlı akım farkları ile grafik çizilmiştir. Doğrusal tayin aralığı hem karıştırmalı yöntem için hem de damlatmalı yöntem için belirlenmiş ve grafiğı çizilmiştir.

3.2.4.7. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği

Tekrarlanabilirlik denemesi düşük (0,25 mM), orta (1 mM) ve yüksek (10 mM) Gal-1-P derişimlerinde 3 seviyede 6 tekrarlı hem gün içi hem de günler arası olarak gerçekleştirilmiştir. Ortalama değeri ($\bar{x}$), standart sapma (S.S. $\pm$) ve % varyasyon katsayısı (% V.K.) değeri hesaplanmıştır.

Tekrar üretilebilirlik için 6 farklı elektrotla oluşturulan biyosensörlerle tayin aralığında çalışılmış standart grafiğı çizilmiş, grafiğın denklemi oluşturulmuş ve eğimlerinden %CV değeri hesaplanmıştır.

3.2.4.8. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğının belirlenmesi amacı ile denemelerde Gal-1-P yerine tampon içinde son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde glukoz, galaktoz, glukoz-6-fosfat, UDP-galaktoz, UDP-glukoz substratları kullanıldı. Gal-1-P'a yönelik biyosensör yanıtı % 100 kabul edilmiştir.

Diğer substratlar için bulunan biyosensör yanıtları ile karşılaştırılmış ve % biyosensör yanıtına karşı substrat çeşiti olarak grafiğe geçirilmiştir.

3.2.4.9. Total galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması denemesi

Sağlıklı ve hasta düzeylerini içerecek şekilde hazırlanan 10 sağlıklı, 11 galaktozemili (10 örnek eritrosit hemolizatı havuzundan 1 örnek ise gerçek galaktozemili hastadan elde edilmiştir) eritrosit hemolizatında Gal-1-P tayini yapılmıştır. Aynı zamanda sağlıklı kişilerden alınan kanlardan elde edilen eritrosit hemolizat örneklerine standart katma yapılarak düşük (0,25 mM), orta (1 mM) ve yüksek (10 mM) olmak üzere üç seviye için % geri elde hesaplanmıştır.

3.2.4.10. Total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığı

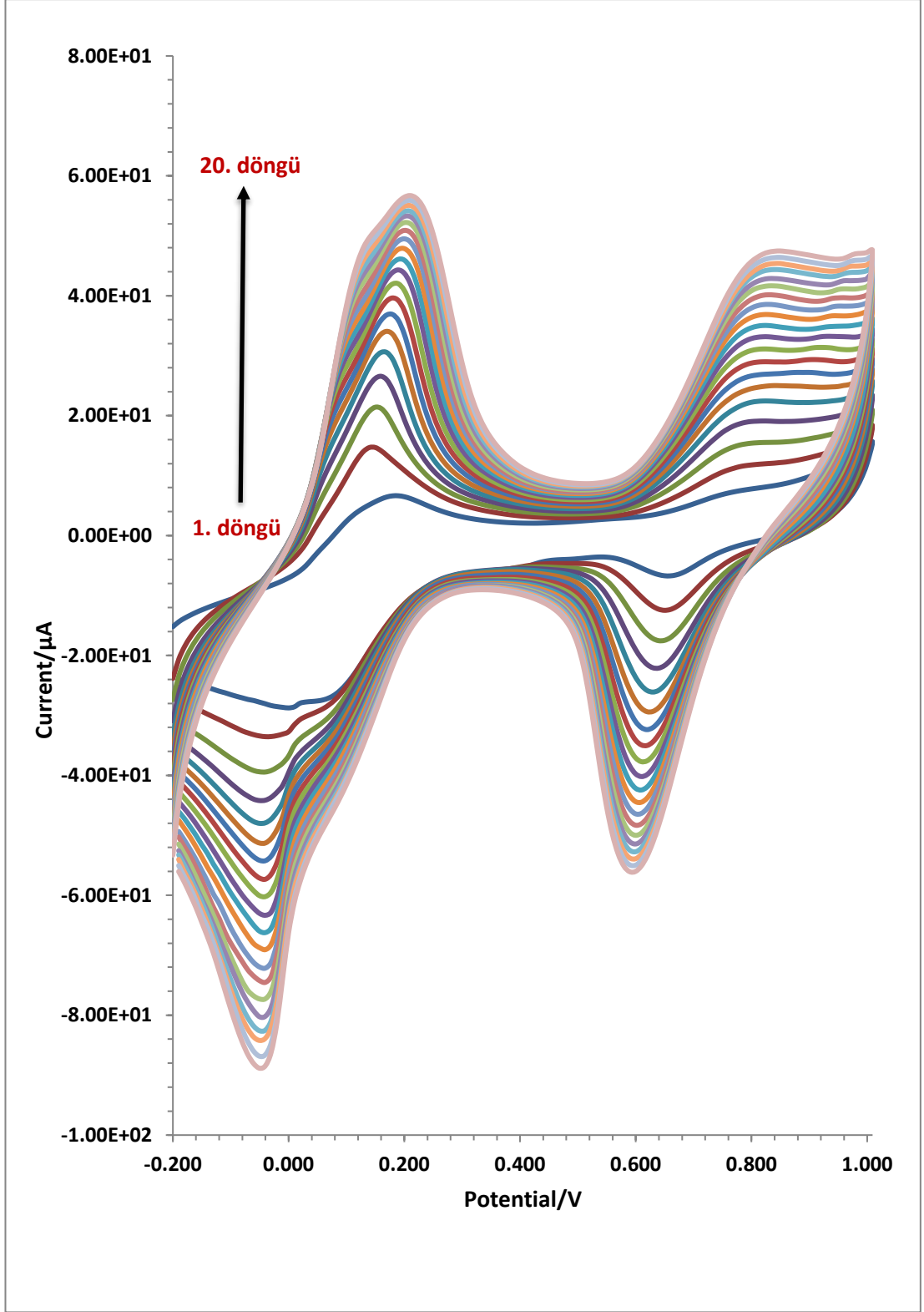
Depo kararlılığının belirlenmesi için geliştirilen total galaktoz biyosensörü 12 hafta boyunca 1 mM galaktoz derişimi için test edilmiştir. Ölçümler haftada bir yapılmıştır. Bu sürede ölçüm dışında biyosensör oda sıcaklığı ve +4 °C'de tutulmuştur.

4. Bulgular

4.1. Serbest Galaktoz Biyosensörüne İlişkin Bulgular

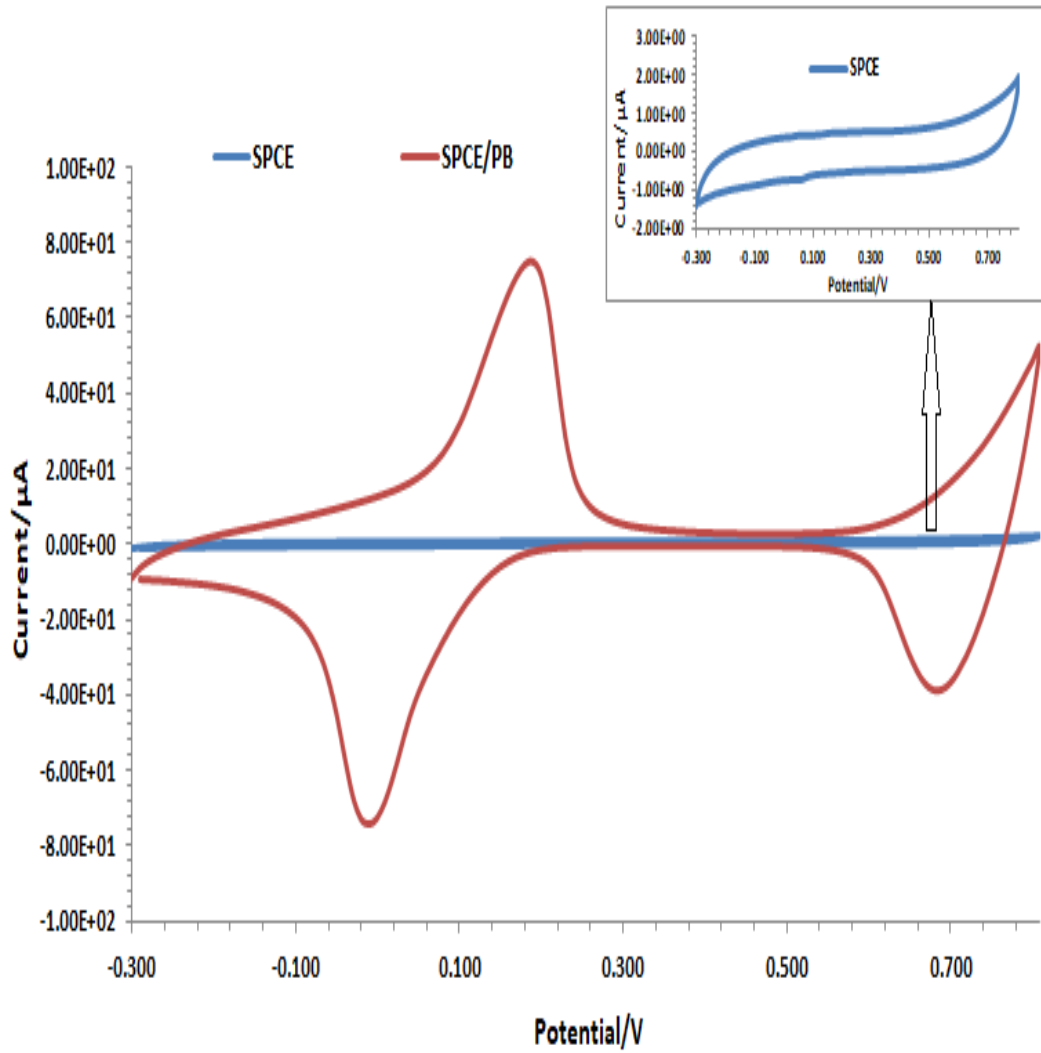
4.1.1. Modifiye elektrotların elektrokimyasal davranışına ilişkin bulgular

Bu çalışmada geliştirilmek istenen serbest galaktoz biyosensörünün yapımında oksidaz türü bir enzim kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 'in düşük potansiyelde belirlenmesi için de elektrot yüzeyinde PB'nun biriktirilmesi planlanmıştır. Bu nedenle biyosensör yapımının ilk aşamasını PB'nun SPCE yüzeyinde başarılı bir şekilde biriktirilmesi oluşturmaktadır. Şekil 12'de PB'nun elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak biriktirilmesine ilişkin döngüsel voltammogramlar yer almaktadır. İlk döngüden itibaren PB'nun karakteristik piki artan bir şekilde belirgin hale gelmektedir. Son 4 döngüde ise biriktirilme tamamlandığından aynı döngüler elde edilmiştir. Elde edilen elektrodpozisyon CV'leri literatürle uyumludur.



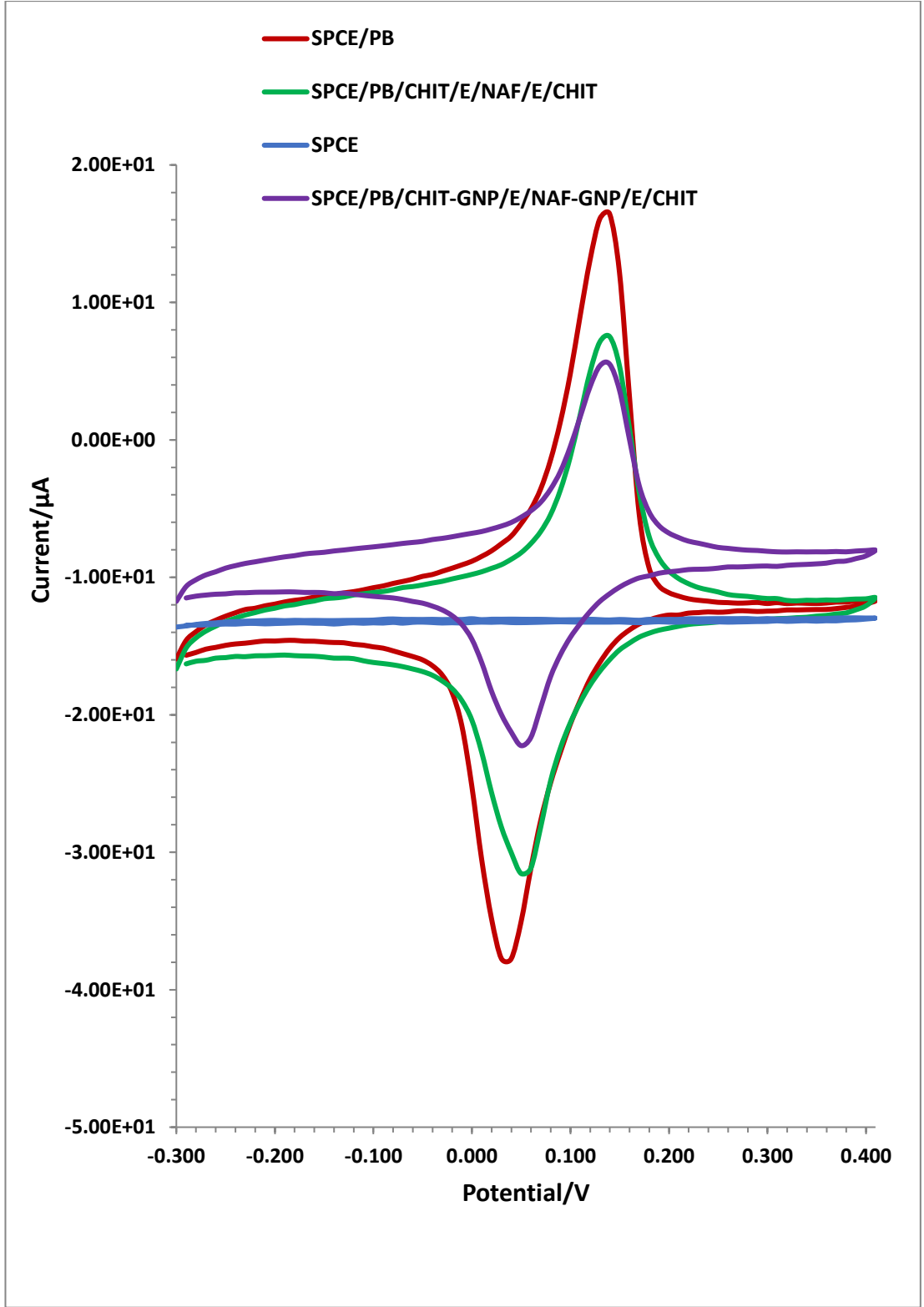
Şekil 12. PB'nın elektrodpozisyonuna ilişkin -0,2V&1,0 V (tarama hızı 50 mV/s) arasında alınmış döngüsel voltammogramları. Ölçümler 2,0 mM FeCl₃, 2,0 mM K₃Fe(CN)₆, 0,1 M KCl ve 20 mM HCl içeren karışımda alınmıştır.

PB'nun elektrot yüzeyinde başarılı bir şekilde biriktirildiğini göstermek amacıyla hem yalın elektrot (SPCE) hem de PB biriktirilmiş elektrot ile (SPCE/PB) 50 mM PBS'de -0,3&1,0 V arası ölçümler alınmış ve sonuçlar Şekil 13'de gösterilmiştir. Şekil 13 incelendiğinde yalın elektrot ile alınan CV'de herhangi bir pik gözlenmezken , SPCE/PB elektrot ile alınan CV'de PB'nun karakteristik pikleri gözlenmiştir. Bu da PB'nun SPCE yüzeyinde başarılı bir şekilde biriktirildiğini göstermektedir.



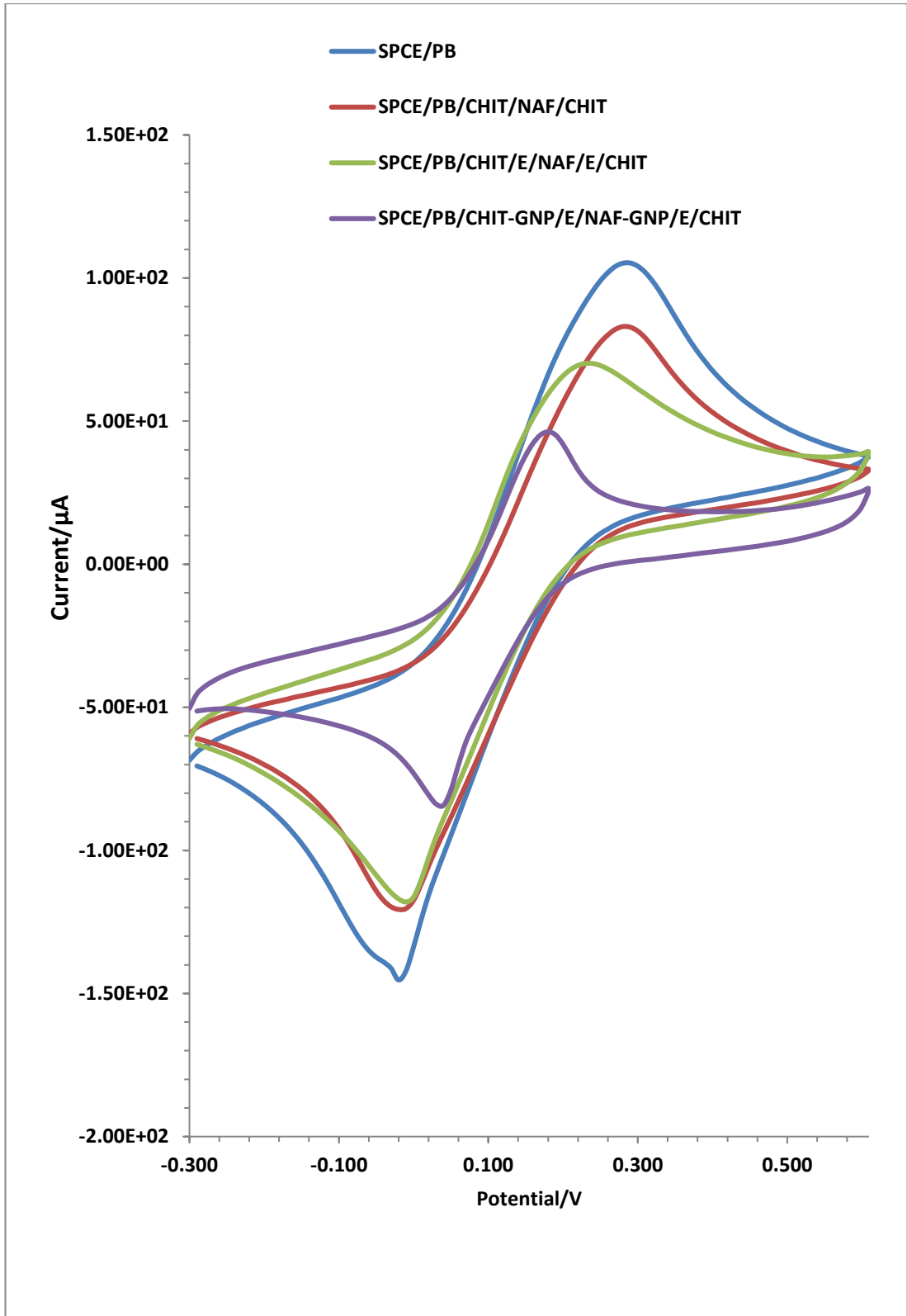
Şekil 13. SPCE ve SPCE/PB elektrotlar ile 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,0 PBS'de alınmış döngüsel voltammogramlar

Şekil 14'te biyosensör yapımında ki immobilizasyon aşamalarını gösteren ve -0,3&0,4 V arası 50 mM PBS'de alınmış CV'ler gösterilmektedir. SPCE ve SPCE/PB arasındaki fark bir üst paragrafta açıklanmıştır. Enzimin elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile anodik ve katodik pik akımları azalmış bu azalma altın nano partikül (GNP) ilavesi ile daha da fazla olmuştur. Bunun nedeni GNP'nin adsorpsiyon yoluyla daha fazla enzimi elektrot yüzeyinde tutundurmasıdır. Enzimin yalıtkan doğası bu düşüşü açıklarken enzimin elektrot yüzeyine immobilize olduğunu göstermektedir.



Şekil 14. İmmobilizasyon aşamalarına ilişkin modifiye elektrotlar ile 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,0 PBS’de alınmış -0,3&0,4 arası döngüsel voltammogramlar (tarama hızı 50 mV/s).

Şekil 15'te ise immobilizasyon aşamalarına ilişkin bulgular ferri/ferro çözeltisinde alınmış CV'ler yoluyla gösterilmiştir. Elektrot yüzeyine kitosan ve nafyon ilavesi (kırmızı CV) ferri ferronun pik akımlarını düşürmüştür. Çünkü elektrot yüzeyinde bir difüzyon tabakası oluşturulmuştur. Enzimin bu yapıya katılması (yeşil ve mor CV) ile pik akımları daha da düşmüştür. GNP'li elektrottaki düşüş daha fazladır. Bu da elektrot yüzeyinde daha fazla enzimin immobilize olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 15. Serbest galaktoz biyosensörünün İmmobilizasyon aşamalarına ilişkin 0,1 M KCl içeren 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{3-/4-}’de alınmış döngüsel voltammogramlar (50 mV/s).

GNP'nin sağladığı yüzey alanının etkisinin belirlenmesi amacıyla enzimsiz hazırlanan SPCE/PB/CHIT/NAF/CHIT ve SPCE/PB/CHIT-GNP/NAF-GNP/CHIT elektrotları ile ferri ferro çözeltisinde CV'ler alınmış ve sonuçlar Şekil 16'da gösterilmiştir. Elektrot yüzey alanı Randles–Sevcik eşitliği ile hesaplanmıştır:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C$$

I_p : Pik akımı

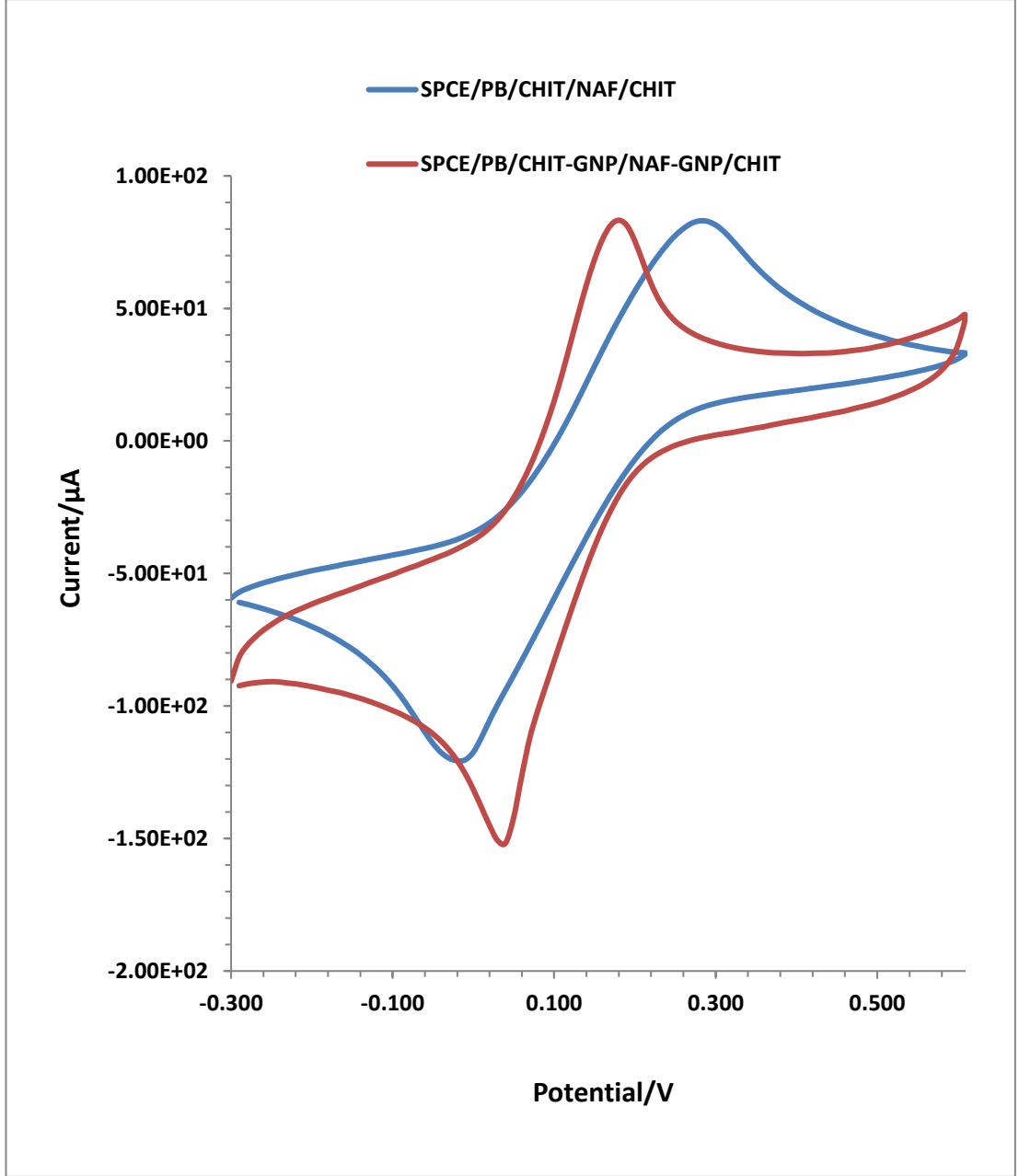
n : transfer edilen elektron sayısı ($n=1$)

D : Ferrisiyanür için difüzyon katsayısı ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)

V : tarama hızı (V/s)

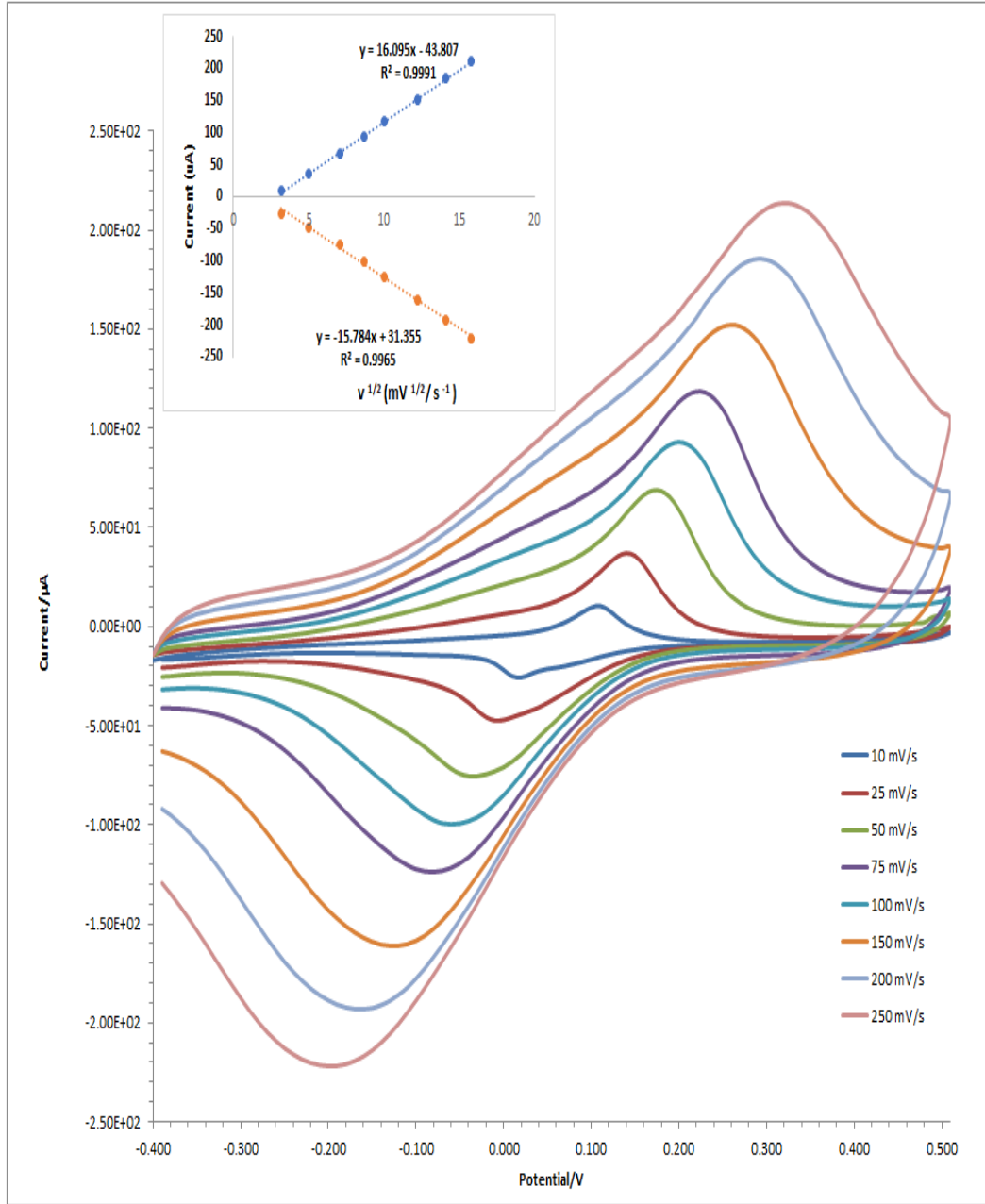
C : Ferrisiyanür konsantrasyonu ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol/ cm}^3$)

Bu eşitliğe göre GNP'li elektrot için yüzey alanı $0,183 \text{ cm}^2$ olarak bulunurken GNP'siz elektrotla yüzey alanı $0,145 \text{ cm}^2$ olarak bulunmuştur. Bu bulgu da GNP'nin yüzey alanını %26 oranında arttırdığını göstermektedir.



Şekil 16. GNP'nin sağladığı yüzey alanının belirlenmesine amacıyla alınmış 0,1 M KCl içeren 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{3-/4-} 'de alınmış döngüsel voltammogramlar (50 mV/s).

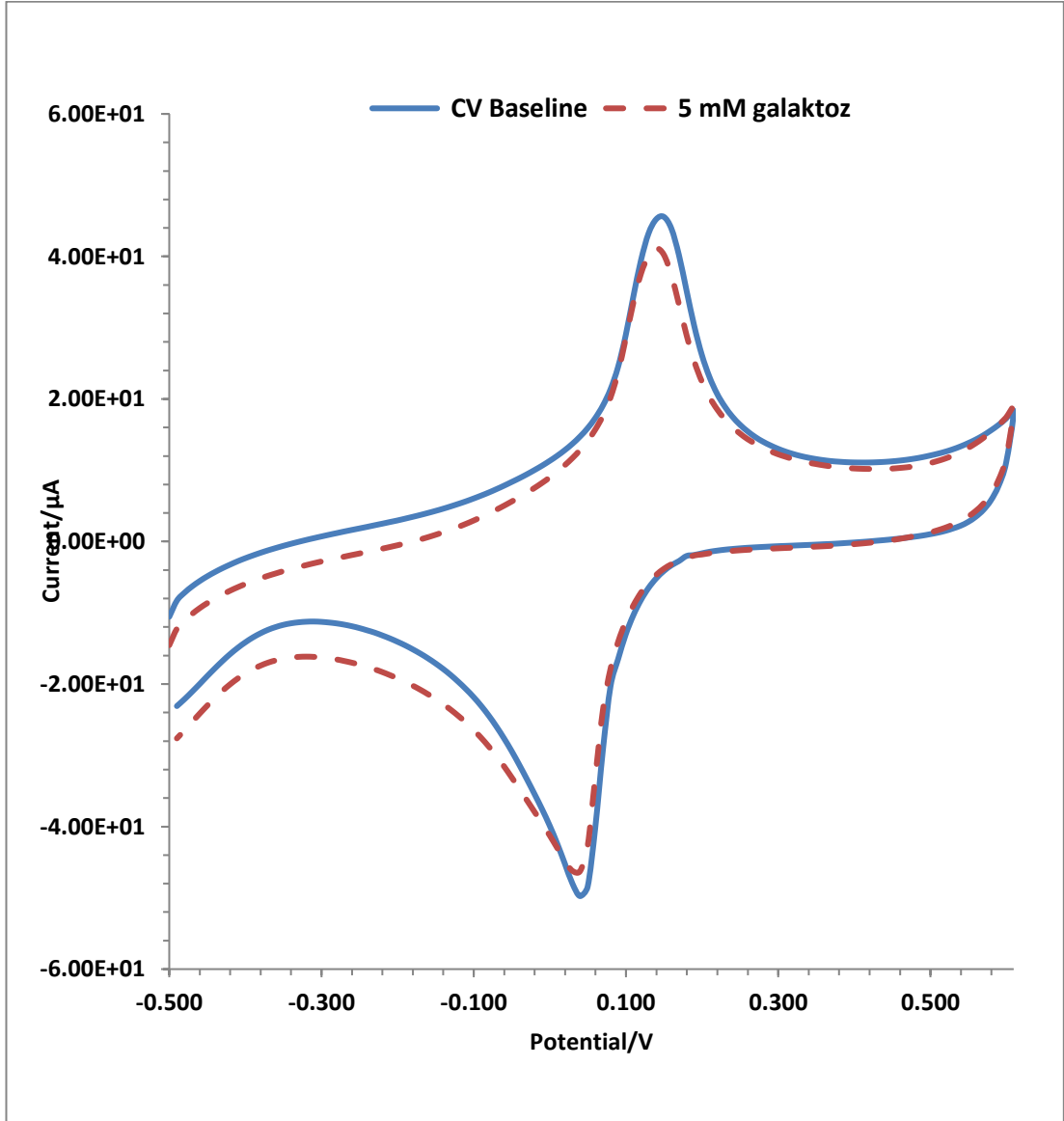
SPCE/PB/CHIT-GNP/E/NAF-GNP/E/CHIT elektrodunun elektrokimyasal davranışı ayrıca 10-250 mV/s tarama hızı aralığında da araştırılmıştır. Şekil 17'de değişen tarama hızlarında modifiye elektrodun CV'leri gösterilmektedir. PB'nun redoks pikleri tarama hızı arttıkça artmıştır. Anodik ve katodik pik akımları ile tarama hızının karekökü arasındaki doğrusal ilişki bize difüzyon kontrollü bir proses olduğunu gösterir.



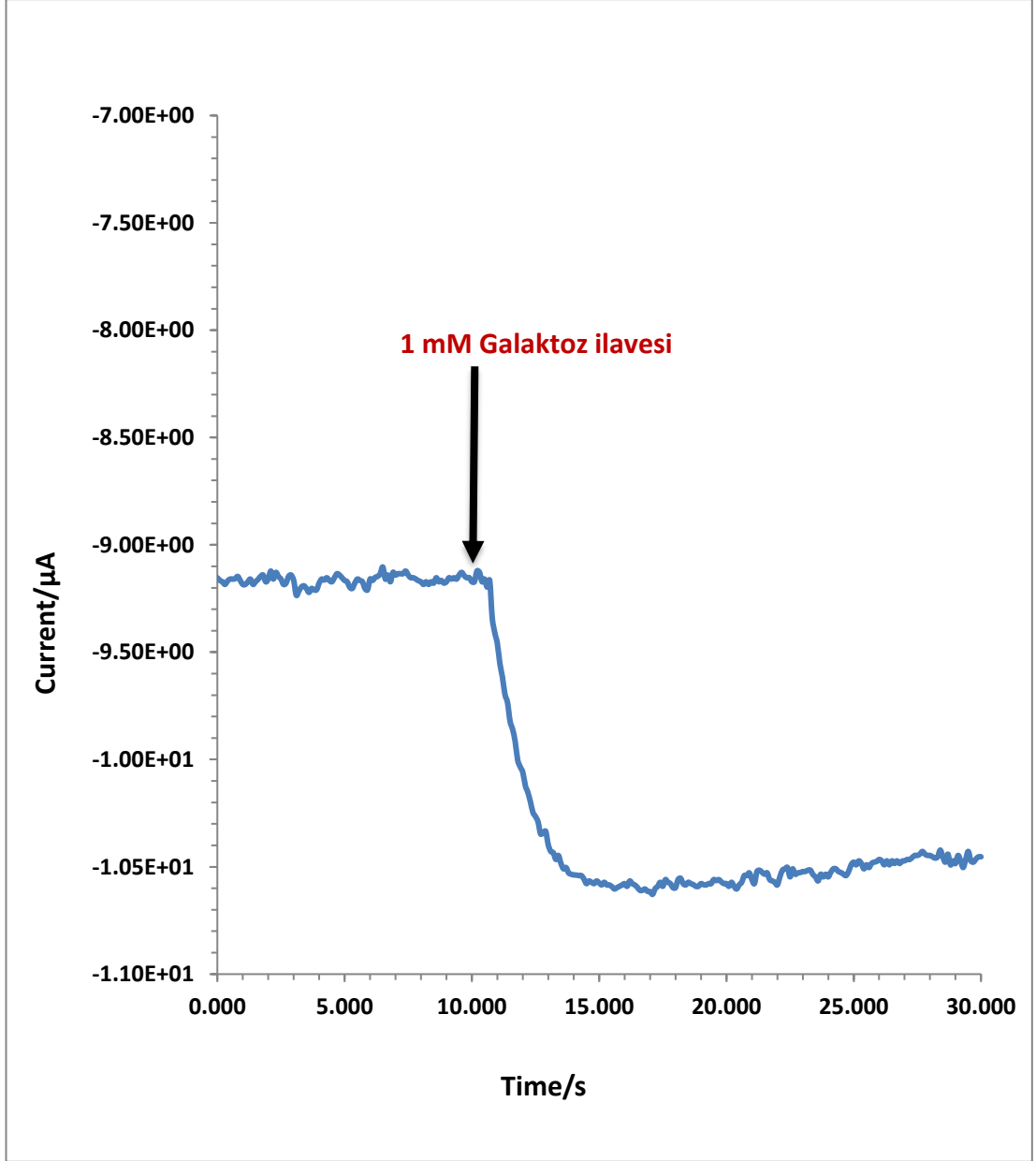
Şekil 17. Geliştirilen biyosensörün (SPCE/PB/CHIT-GNP/E/NAF-GNP/E/CHIT) değişik tarama hızlarında 0,1 M KCl ve 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{3-/4-} ‘de içeren pH:7,5 PBS’de alınmış döngüsel voltammogramları.

Geliştirilen ve yüzeyi karakterize edilen biyosensörün galaktoz cevabına ilişkin bulgular Şekil 18 ve 19’de gösterilmiştir. Şekil 18’de 0 ve 5 mM galaktoz varlığında biyosensörün CV cevabına ilişkin bulgular gösterilmekteyken, Şekil 19 da 1 mM galaktoz ilavesine ilişkin -0,05 V’ta alınmış amperometrik cevaplar ve Şekil 20’de optimizasyon çalışmalarının yapıldığı 0,2-10 mM arası galaktoz konsantrasyonlarına

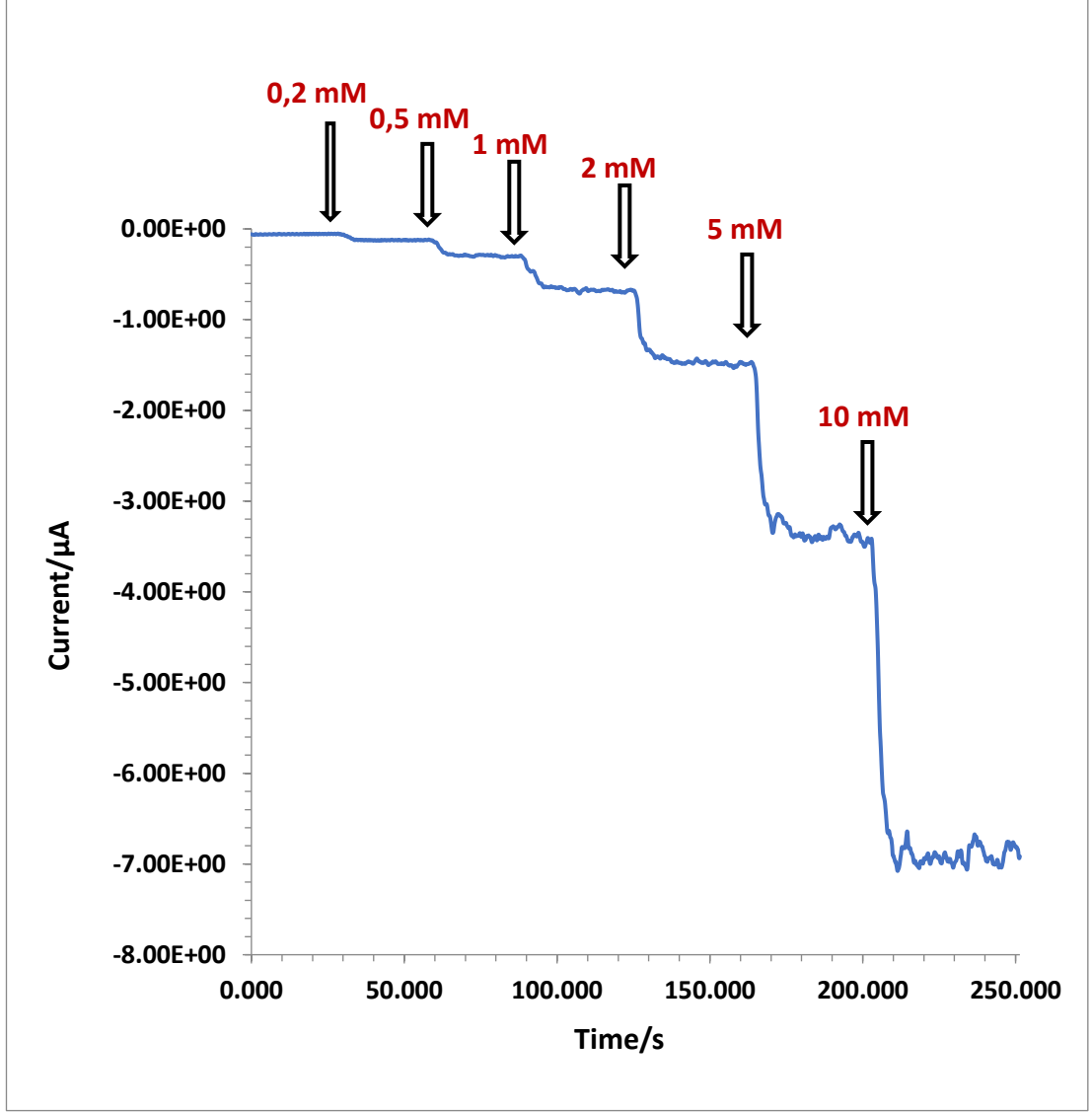
ilişkin amperometrik sıralı katımlar gösterilmektedir. Geliştirilen biyosensörün çalışma prensibini enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 'i katalizleyen PB'nun elektrot yüzeyinde indirgenmesi oluşturmaktadır. Bu nedenle PB'nun katodik pikinde farklanma ve bu katodik pik baz alınarak gerçekleştirilen amperometrik ölçümde de galaktoz ilavesiyle akımın azalması beklenmektedir. Nitekim Şekil 18 ve 19'da galaktoz varlığında katodik pik azalmış ve galaktoz ilavesiyle anlık akım farklanması ile galaktoza cevap oluşturmuştur.



Şekil 18. Serbest galaktoz biyosensörünün (SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT) 0 ve 5 mM galaktoz içeren 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS'de cevabına ilişkin döngüsel voltammogramlar.



Şekil 19. Serbest galaktoz biyosensörünün (SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT) 1 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometri sonuçları. Ölçümler 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS’de alınmıştır. Amperometrik ölçümler -0,05 V’ta alınmıştır.

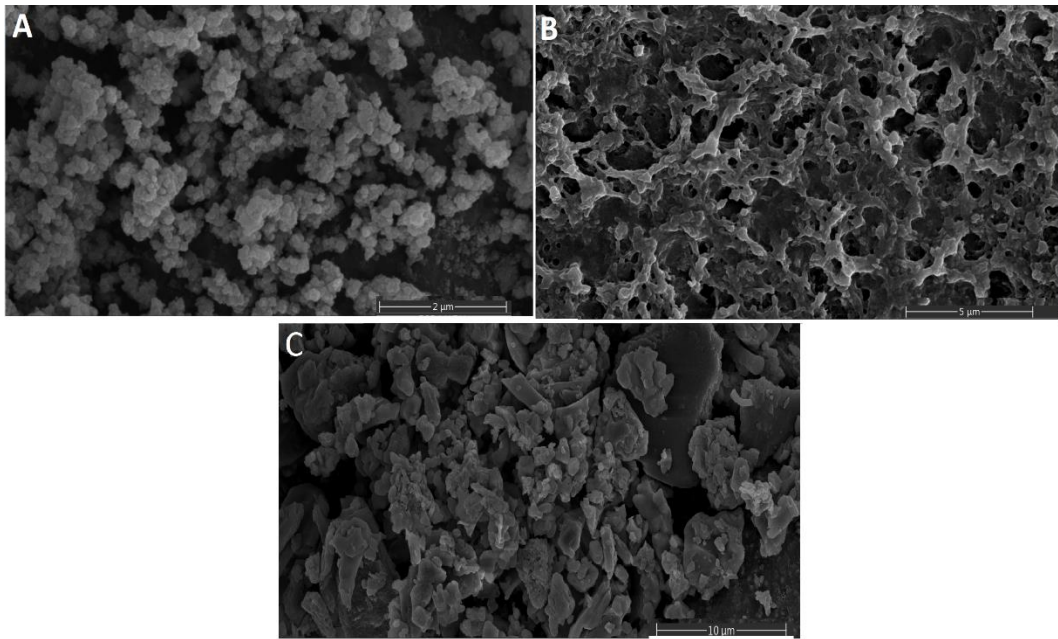


Şekil 20. Optimizasyon çalışmalarında çalışan konsantrasyon aralığına ilişkin amperometri cevapları. Serbest galaktoz biyosensörünün (SPCE/PB/CHIT /GaOX/NAF /GaOX/CHIT) 0,2-10 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometri sonuçları. Ölçümler 0,1 M KCl içeren 50 mM pH:7,5 PBS’de alınmıştır. Amperometrik ölçümler -0,05 V’ta alınmıştır.

4.1.2. Modifiye elektrodun yüzey morfolojisine ilişkin bulgular

Modifiye elektrotların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu amaçla SPCE/PB, SPCE/PB/CHIT-GNP/NAF-GNP/CHIT ve SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT elektrotların SEM görüntüleri alınmış ve bulgular Şekil 19’da gösterilmiştir. Şekil 21 (A)’da PB elektrodpozisyonundan sonra, SPCE elektrot

yüzeyinde toplanmış küresel PB parçacıkları gözlenmektedir. Bu görüntü literatürle uyumlu olmakla birlikte PB'nun elektrot yüzeyinde biriktirildiğinin bir diğer kanıtıdır. Şekil 20 (B) enzimsiz elektroda ilişkin görüntüyü göstermektedir. Kütle aktarım hızını ve enzim immobilizasyonu için uygun alanı artıracak oldukça makro gözenekli ağ yapısı kitosan ve nafyon matriksinden kaynaklanmaktadır. Söz konusu gözenekli yapı enzim immobilizasyonundan sonra kapanmış ve katmanlar kalınlaşmıştır ki bu da enzimin elektrot yüzeyine immobilize olduğunu göstermektedir.

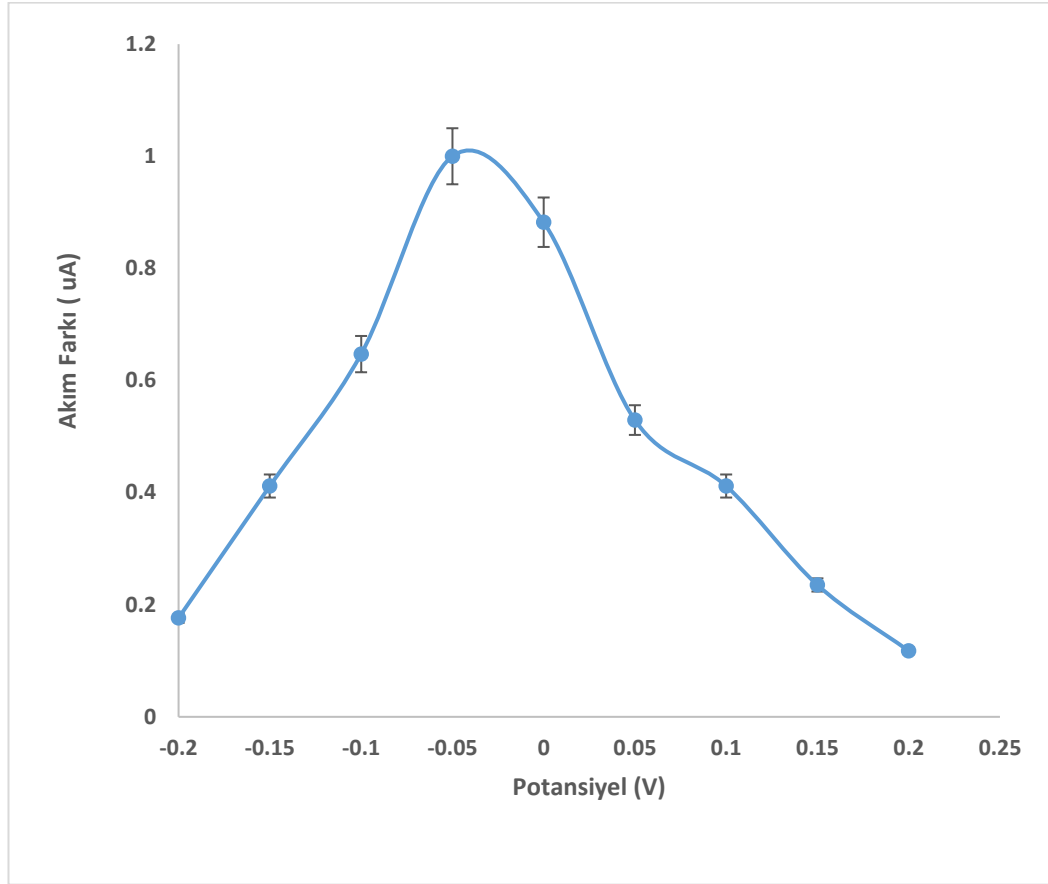


Şekil 21. Modifiye elektrotların taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile alınmış görüntüleri. SPCE/PB (50000 x büyütme) (A); SPCE/PB/CHIT-GNP/NAF-GNP/CHIT (20000 x büyütme) (B); SPCE/PB/ CHIT-GNP/ E/ NAF-GNP/E/CHIT (10000 x büyütme) (C).

4.1.3. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular

Şekil 18'den görüleceği üzere PB'nun katodik piki 0,2 V & -0,2 V arasındadır. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla 0,05 V aralıklarla amperometrik ölçümler alınmış ve sonuçlar Şekil 22'de gösterilmiştir. Buna göre 0,0 V ve -0,05 V alınan cevaplar birbirine çok yakın olmakla ve diğerlerine göre daha yüksek olmakla birlikte amperometrik çalışma potansiyeli -0,05 V olarak

belirlenmiştir. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları bu potansiyel baz alınarak yapılmıştır.



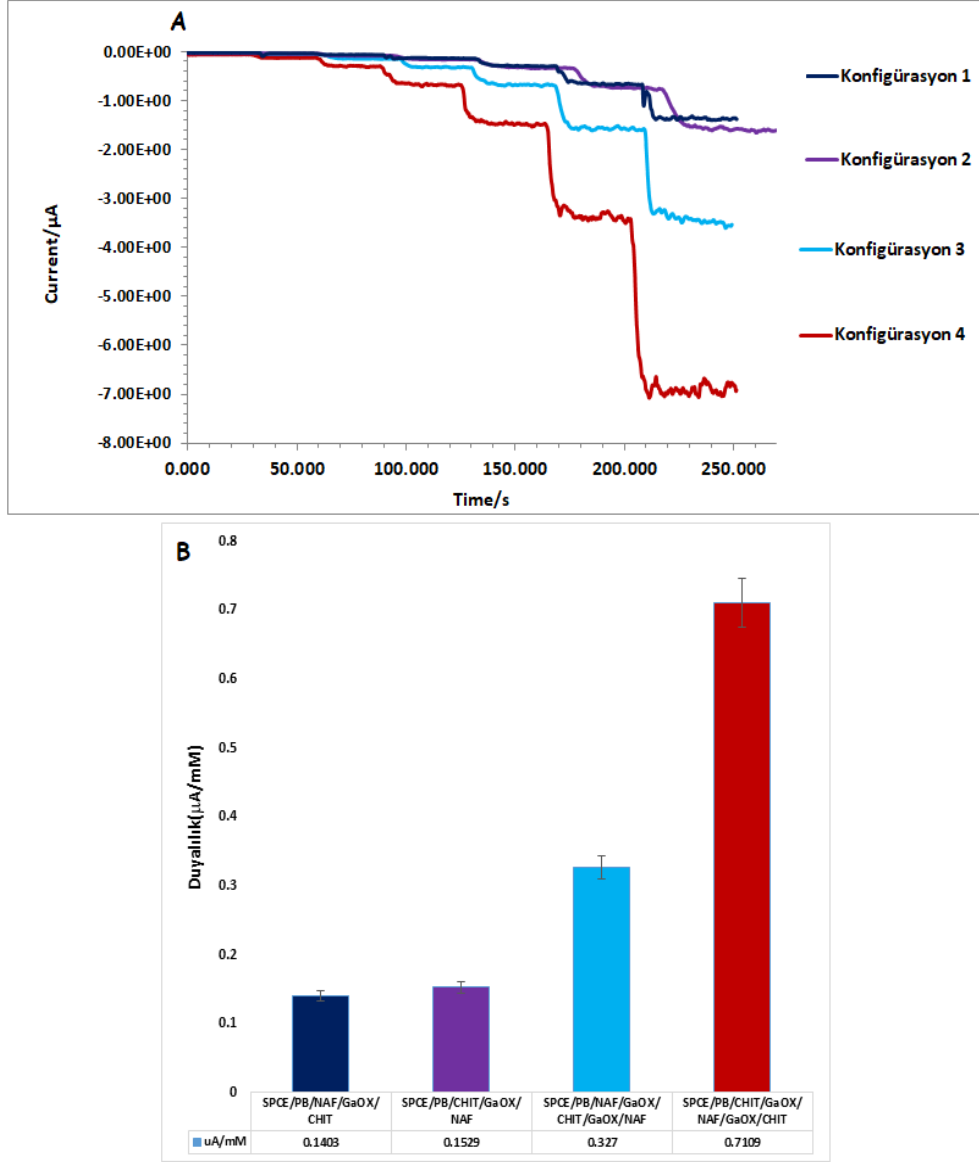
Şekil 22. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular. Cevaplar 1 mM galaktoza (çözelti içerisinde) ilişkindir.

4.1.4. İmmobilizasyon konfigürasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgular

Bu tez çalışmasında immobilizasyon yönteminin temelini polikasyonik bir bileşen olan kitosan ile polianyonik bir bileşen olan nafyon arasındaki elektrostatik çekim kuvvetleri yoluyla enzimi elektrot yüzeyinde tutuklamak oluşturmaktadır. Yani aslında oluşturulmak istenen tabakalı kaplama (layer by layer) yöntemiyle enzimi immobilize etmektir. Bu açıdan bakıldığında immobilizasyon yöntemiyle ilgili ilk araştırılması gereken nokta elektrot konfigürasyonudur. Bu amaçla tek enzim katmanlı SPCE/PB/NAF/GaOX/CHIT, SPCE/PB/CHIT/GaOX/NAF ve iki enzim katmanlı SPCE/PB/NAF/GaOX/CHIT/GaOX/NAF, SPCE/PB/CHIT/GaOX/NAF/GaOX/CHIT elektrotları hazırlanmış ve 0,2-10 mM

galaktoz konsantrasyonları arasında çalışılmıştır. Modifiye elektrotlar duyarlılık açısından karşılaştırılmış ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 23). Üç katmanlı model de denense de elektrot yapısı bozulduğundan ölçüm alınamamış bu nedenle karşılaştırılmaya dahil edilmemiştir. Ölçümler 5 tekrarlı olacak şekilde sıralı katım amperometik ölçümler yoluyla gerçekleştirilmiştir. 1 mM konsantrasyon için % CV değerleri sırasıyla şöyledir: 7,54; 15,21; 6,51; 2,36.

Şekil 23'den de açık bir şekilde anlaşılacağı üzere 2 katmanlı elektrotların duyarlılıkları tek katmanlılara göre anlamlı şekilde daha yüksektir. 2 katmanlı modellerde ise en yüksek biyosensör cevapları kitosanının ana immobilizasyon bileşeni olduğu SPCE/PB/CHIT/GaOX/NAF/GaOX/CHIT modifiye elektrodu ile elde edilmiştir. Kitosanın gözenek yapısı nafyona göre daha küçük olmakla birlikte kitosanın son tabaka olduğu elektrotlarda glutaraldehit ile çapraz bağlama biyosensörün tekrarlanabilirliğini de arttırmaktadır. Nafyonun son tabaka olduğu elektrotlarda daha düşük biyosensör cevapları ve yüksek varyasyon katsayıları bize enzimin elektrodun yıkanması sırasında elektrot yüzeyinde düşmüş olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak hem daha duyarlı hem de daha stabil cevaplardan dolayı immobilizasyon konfigürasyonu SPCE/PB/CHIT/GaOX/NAF/GaOX/CHIT olarak belirlenmiştir.



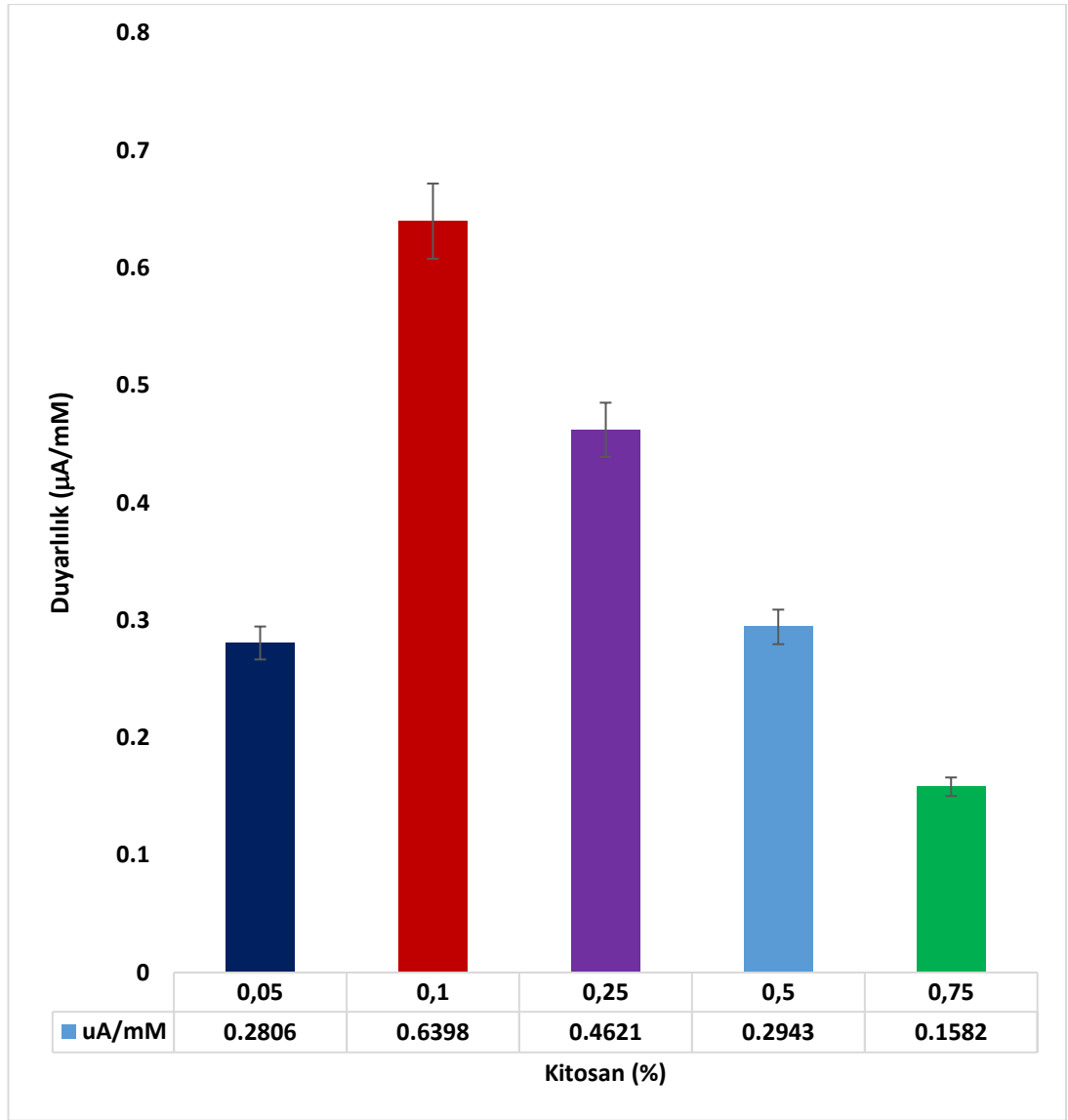
Şekil 23. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı modifiye edilmiş SPCE'ler ile alınmış amperometrik cevaplar (A) ve buna ilişkin çizilmiş sütun grafiğini (B) göstermektedir.

4.1.5. Kitosan miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Tez çalışmasının bu bölümünde diğer bileşenler sabit tutularak kitosan miktarının biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 24 ve Tablo 3'te gösterilmiştir. Buna göre en hassas (0,6398 uA/mM) ve en kesin (% CV=2,02) biyosensör cevapları %0,1'lik kitosan çözeltinin kullanıldığı elektrotlarla alınmıştır. Bu nedenle çalışmanın geri kalanında kitosan %0,1 olarak kullanılmıştır.

Tablo 3. Kitosan miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin veriler.

Kitosan Miktarı (%)	Grafiğin denklemi	R²	%VK
0,05	$y=0,2806x + 0,087$	0,991	2,54
0,1	$y=0,6398x + 0,322$	0,992	2,02
0,25	$y=0,4621x+0,233$	0,990	2,47
0,5	$y=0,2943x - 0,0851$	0,981	5,62
0,75	$y=0,1582x - 0,0216$	0,970	12,54



Şekil 24. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı **kitosan miktarları** ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarını karşılaştırır.

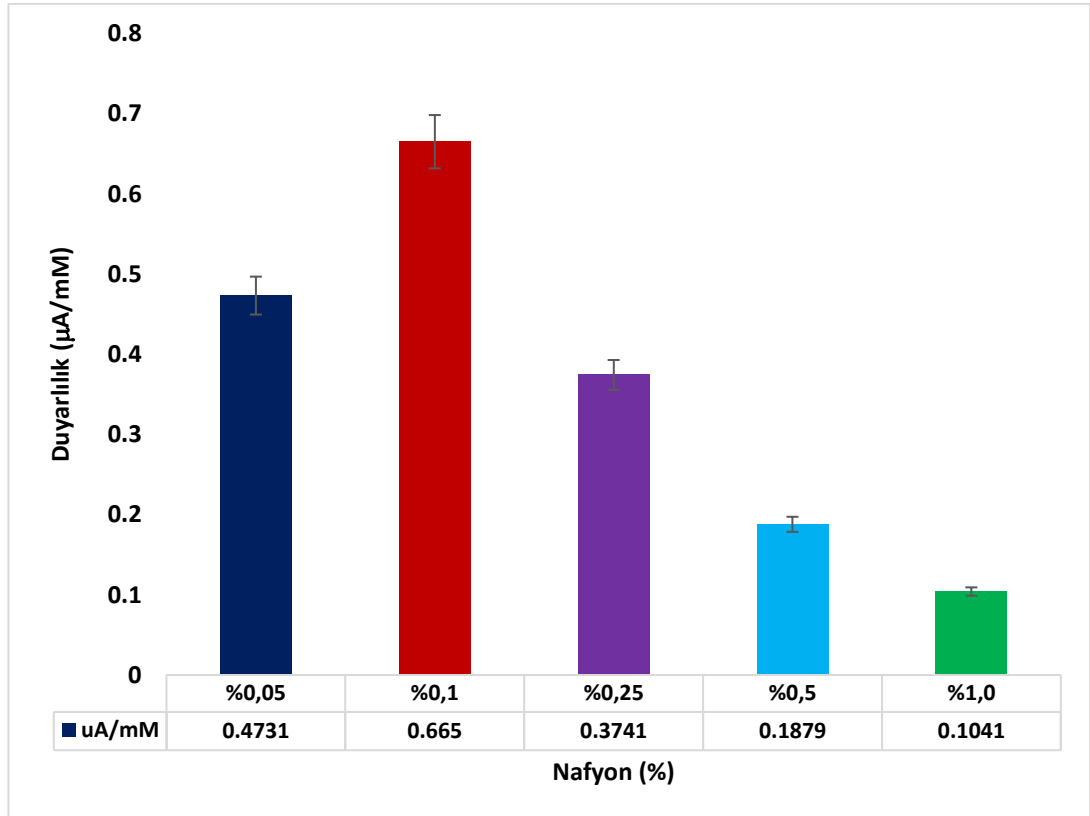
4.1.6. Nafyon miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Bu tez çalışmasında kullanılan bir diğer immobilizasyon bileşeni nafyondur. Diğer bileşenler sabit tutulurken nafyon miktarı %0,05 ile %0,75 arasında değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 25'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Nafyon miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin veriler

Nafyon Miktarı (%)	Grafiğin denklemi	R ²	%VK
0,05	$y=0,4731x + 0,1426$	0,995	3,05
0,1	$y=0,6665x - 0,0865$	0,998	2,74
0,25	$y=0,3741x+0,4218$	0,995	3,51
0,5	$y=0,1879x + 0,1015$	0,9794	9,58
0,75	$y=0,1041x + 0,2829$	0,9303	13,52

Buna göre en hassas (0,665 $\mu\text{A}/\text{mM}$) ve en kesin (%CV=2,74) biyosensör cevapları nafyonun %0,1 olarak kullanıldığı biyosensörle elde edilmiştir.



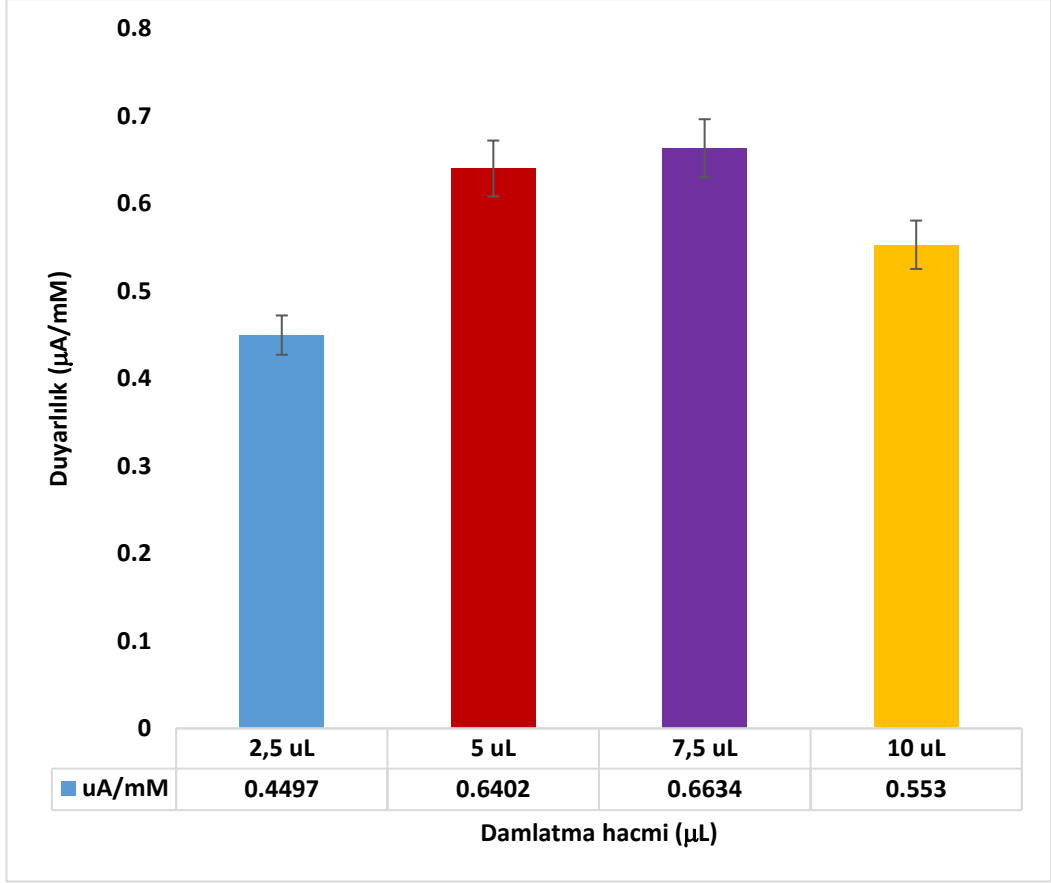
Şekil 25. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı **nafyon miktarları** ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarını karşılaştırır.

4.1.7. Damlatma hacminin optimizasyonuna ilişkin bulgular

İmmobilizasyon bileşenlerinin ve enzimin elektrot yüzeyine damlatılma hacmi biyosensör cevabını etkileyebilmektedir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında optimum damlatma hacminin bulunması için 2,5-5-7,5-10 µL hacimler denenmiştir. Sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 26'de gösterilmiştir. Denenen bütün damlatma hacimlerinde tekrarlanabilirlik kabul edilebilir ve iyi değerlerde bulunurken en hassas biyosensör cevapları 5 ve 7,5 µL damlatma hacimlerinde elde edilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmayan bu iki damlatma hacminden 5 µL optimum damlatma hacmi olarak seçilmiştir.

Tablo 5. Damlatma hacminin optimizasyonuna ilişkin bulgular

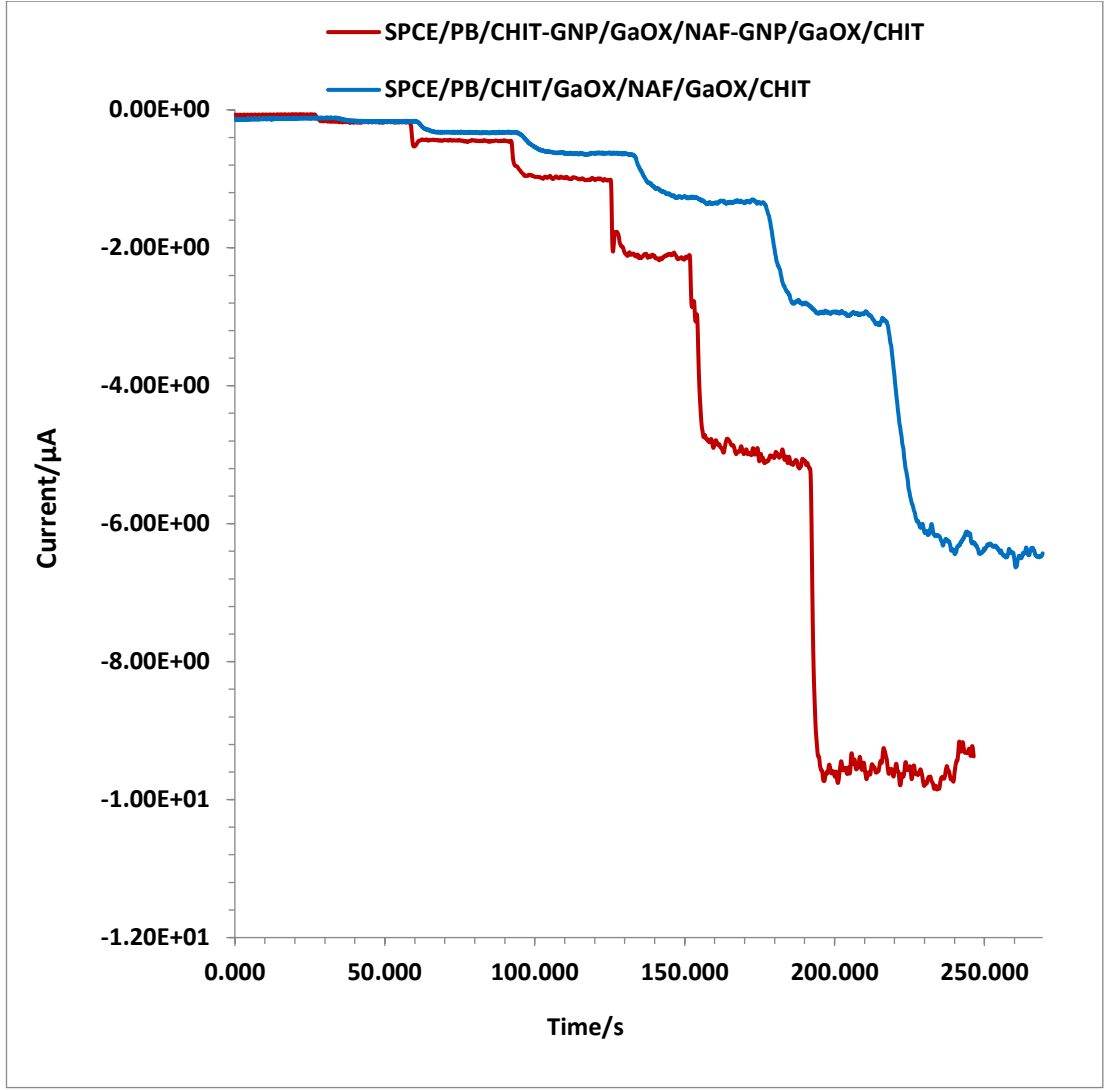
Damlatma hacmi (µL)	Grafiğin denklemi	R ²	%VK
2,5	$y=0,4497x + 0,7131$	0,983	6,08
5	$y=0,6402x + 0,7948$	0,990	4,74
7,5	$y=0,6634x+0,6715$	0,986	4,52
10	$y=0,5533x + 0,7057$	0,985	5,42



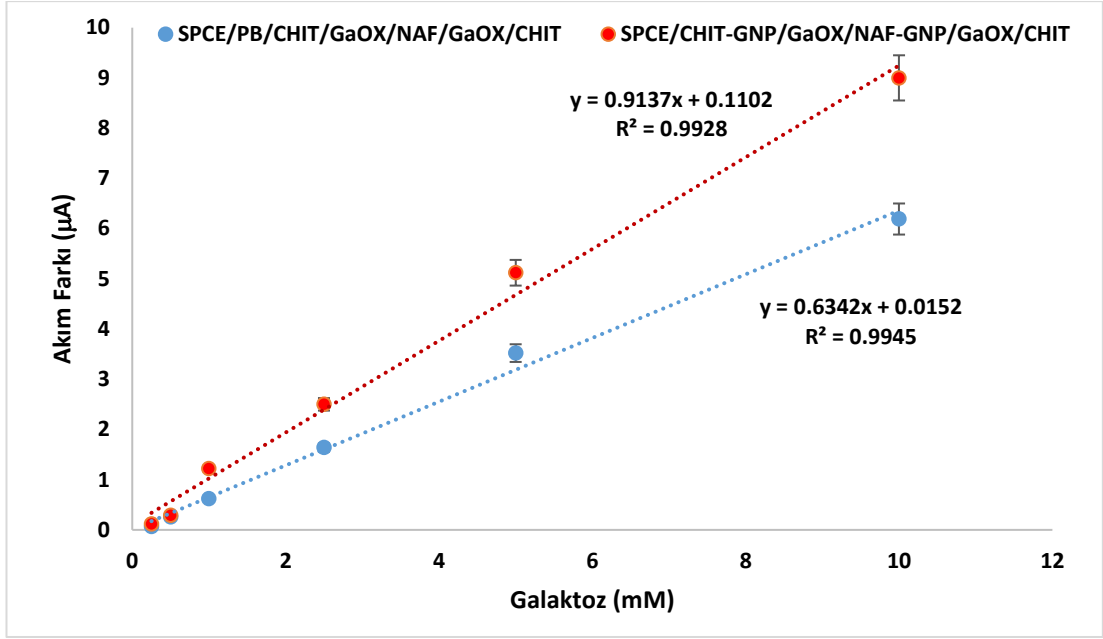
Şekil 26. 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı damlatma hacimleri ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarının karşılaştırılması

4.1.8. GNP'nin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

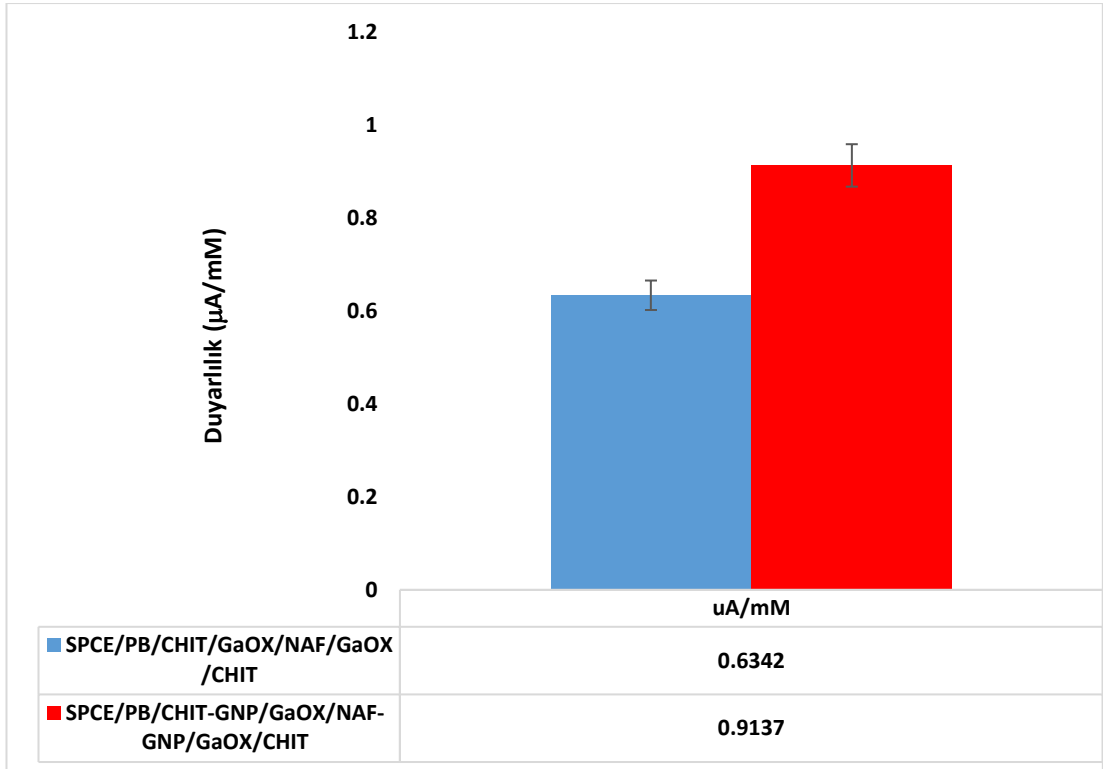
Altın nanopartikül (GNP) yüksek adsorbsiyon ve iletkenlik özellikleriyle biyosensörlerin oluşturulmasında sıklıkla kullanılan bir bileşendir. GNP'nin biyosensör oluşturulmasında kullanılmasının biyosensör cevabına etkisinin incelenmesi amacıyla GNP'li ve GNP'siz olmak üzere iki elektrot hazırlanmıştır. Sonuçlar Şekil 27, 28 ve 29'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre biyosensör yapımında GNP'nin kullanılması biyosensör cevabını yaklaşık 1,5 kat arttırmıştır (GNP'li elektrot duyarlılığı=0,9137 $\mu\text{A}/\text{mM}$; GNP'siz elektrot duyarlılığı=0,6342 $\mu\text{A}/\text{mM}$). Bu nedenle GNP'nin immobilizasyon bileşeni olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 27. Biyosensör cevabına GNP'nin etkisi. SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT ve SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT elektrotların 0,2-10 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometri sonuçları.



Şekil 28. SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/E/CHIT ve SPCE/PB/CHIT-GNP/GaOX/NAF-GNP/GaOX/CHIT elektrotların 0,2-10 mM arası galaktoz cevabına ilişkin kalibrasyon grafiği



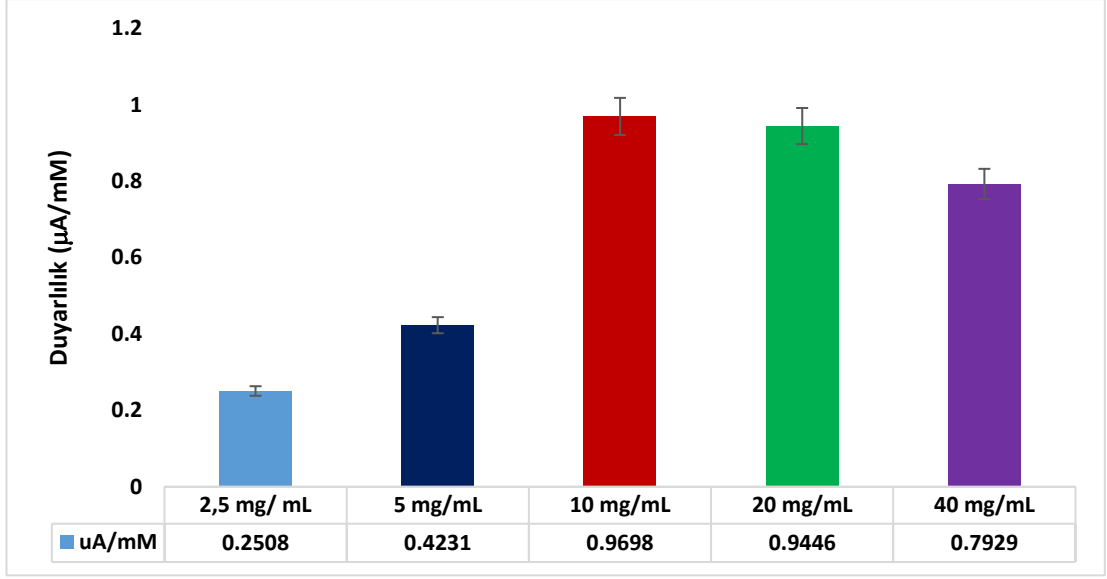
Şekil 29. 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı GNP ile modifiye edilmiş ve edilmemiş SPCE'lerin duyarlılıklarının karşılaştırılması.

4.1.9. Galaktoz oksidaz konsantrasyonunun optimizasyonuna ilişkin bulgular

Optimum GaOX miktarının bulunması için yapılan denemelerde 2,5-5-10-20-40 mg/mL konsantrasyonlarda enzim süspansiyonlarının biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 30'da incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde görülecektir ki başlangıçta enzim miktarı arttıkça biyosensör cevabı da dramatik olarak artmıştır. 10 ve 20 mg/mL GaOX kullanılan biyosensörlerde en hassas biyosensör cevapları elde edilirken iki konsantrasyon ile elde edilen cevaplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. 40 mg/mL enzim konsantrasyonunda ise biyosensör cevabında düşme olmuştur. Bu nedenlerle optimum biyosensör cevabı 10 mg/mL olarak seçilmiştir.

Tablo 6. GaOX miktarı optimizasyonuna ilişkin bulgular

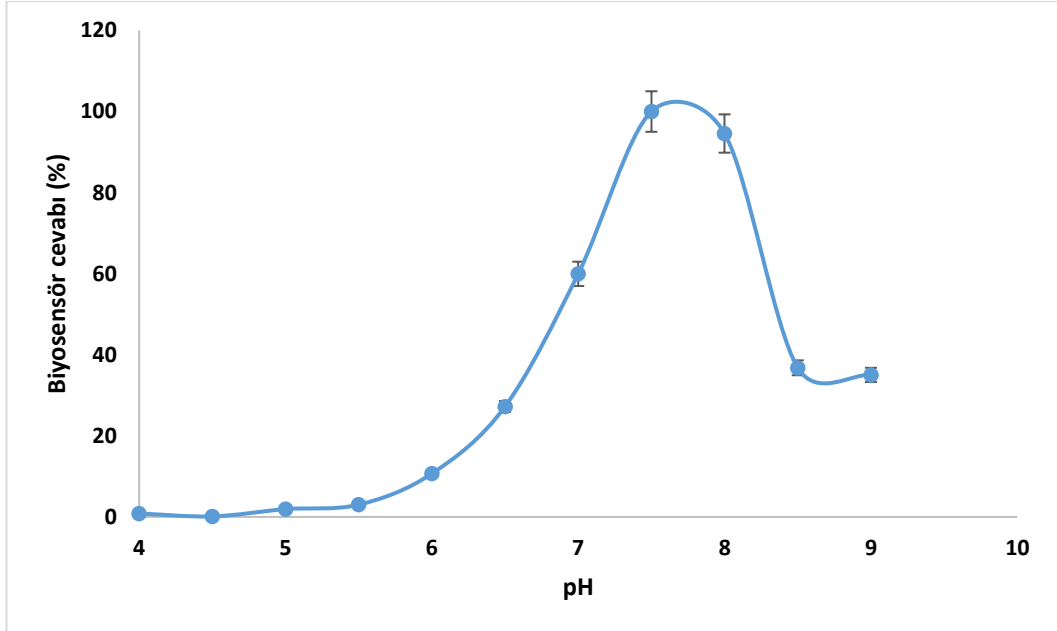
GaOX konsantrasyonu (mg/mL)	Grafiğin denklemi	R²	%VK
2,5	$y=0,2508x - 0,0446$	0,982	7,47
5	$y=0,4231x + 0,2401$	0,992	4,33
10	$y=0,9698x + 0,0145$	0,995	2,71
20	$y=0,9446x + 0,1062$	0,997	1,97
40	$y=0,7929x - 0,1052$	0,983	6,54



Şekil 30. 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında galaktoz konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı **GaOX konsantrasyonları** ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarının karşılaştırılması

4.1.10. Serbest galaktoz biyosensörünün pH optimizasyonuna ilişkin bulgular

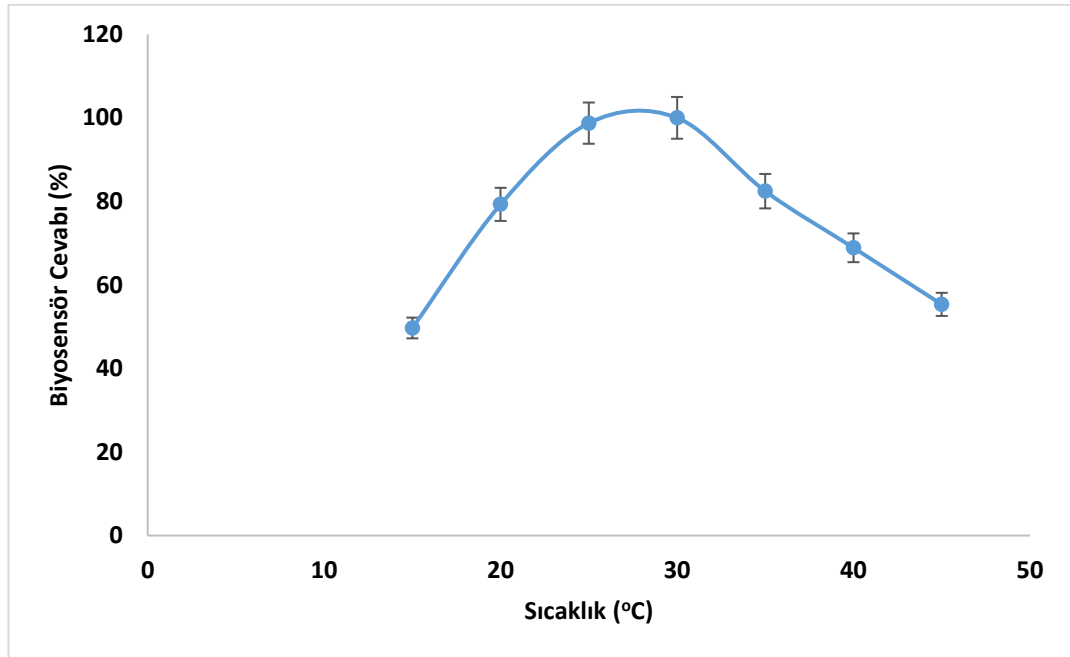
Çalışma tampon pH'ının biyosensör cevabına etkisini incelemek ve optimum pH'ı bulmak için yapılan denemelerde pH 4-9 arasında çalışılmıştır. Sonuçlar Şekil 31'de verilmiştir. Buna göre biyosensörün optimum pH'ı 7,5 olarak saptanmıştır.



Şekil 31. Biyosensörün pH optimizasyonuna ilişkin sonuçlar. 1 mM galaktoz konsantrasyonu için 3 tekrarlı ölçümler alınmıştır.

4.1.11. Serbest galaktoz biyosensörünün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular

Biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde 15-45 °C arası çalışılmıştır. Yapılan ölçümlerde söz konusu aralıkta genel olarak yüksek cevaplar (%50 ve üzeri) elde edilmekle birlikte en iyi biyosensör cevapları 25 ve 30 °C’de elde edilmiştir (Şekil 32). Daha pratik ölçümlere olanak tanınması ve biyosensörün işlem kararlılığını artırması açısından optimum sıcaklık 25 °C olarak seçilmiştir.

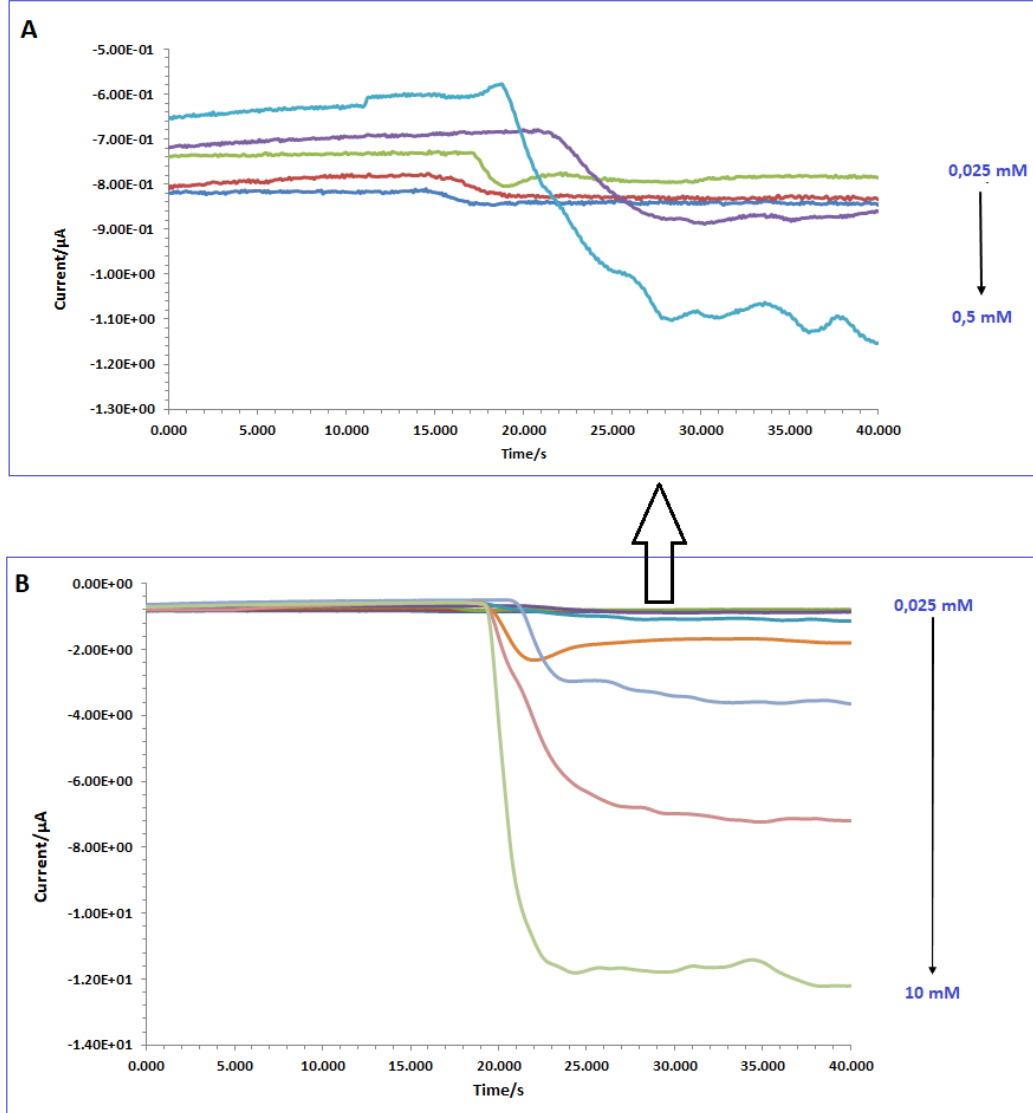


Şekil 32. Biyosensörün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin sonuçlar. 1 mM galaktoz konsantrasyonu için 3 tekrarlı ölçümler alınmıştır

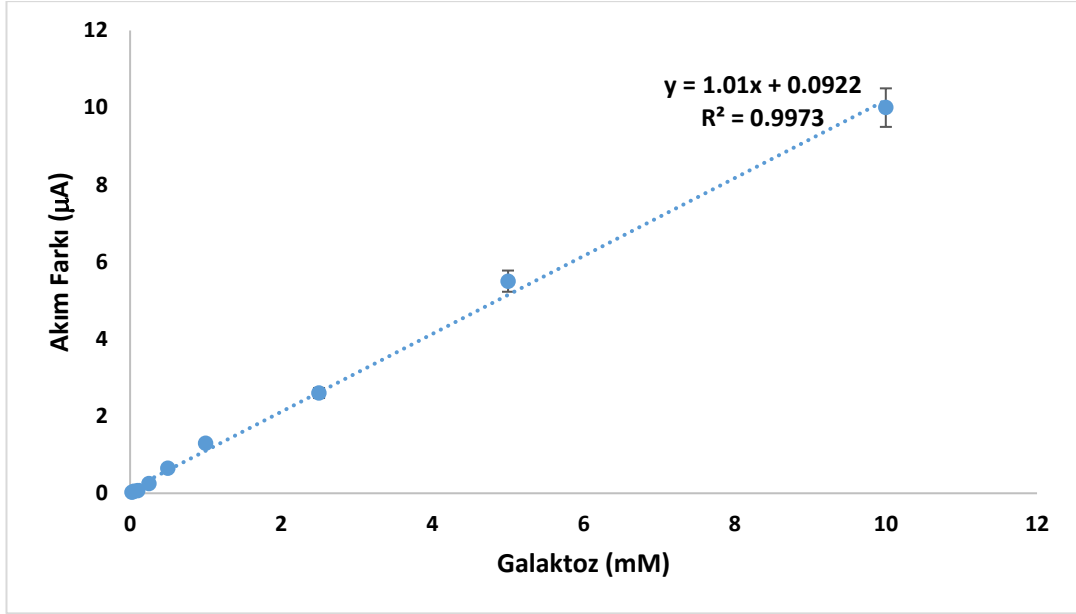
4.1.12. Serbest galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin bulgular

Biyosensörün doğrusal tayin aralığı için 0,001 mM-10 mM arası galaktoz içeren çözeltilerle amperometrik olarak çalışmıştır. Şekil 33 karıştırmalı ortamda elde edilen tekli katım amperometrik cevapları, Şekil 34 buna ilişkin çizilen standart grafiğini gösterirken Şekil 35 karıştırmalı ortamda elde edilen sıralı katım amperometrik cevapları ve buna ilişkin standart grafiğini göstermektedir. Şekil 36’de

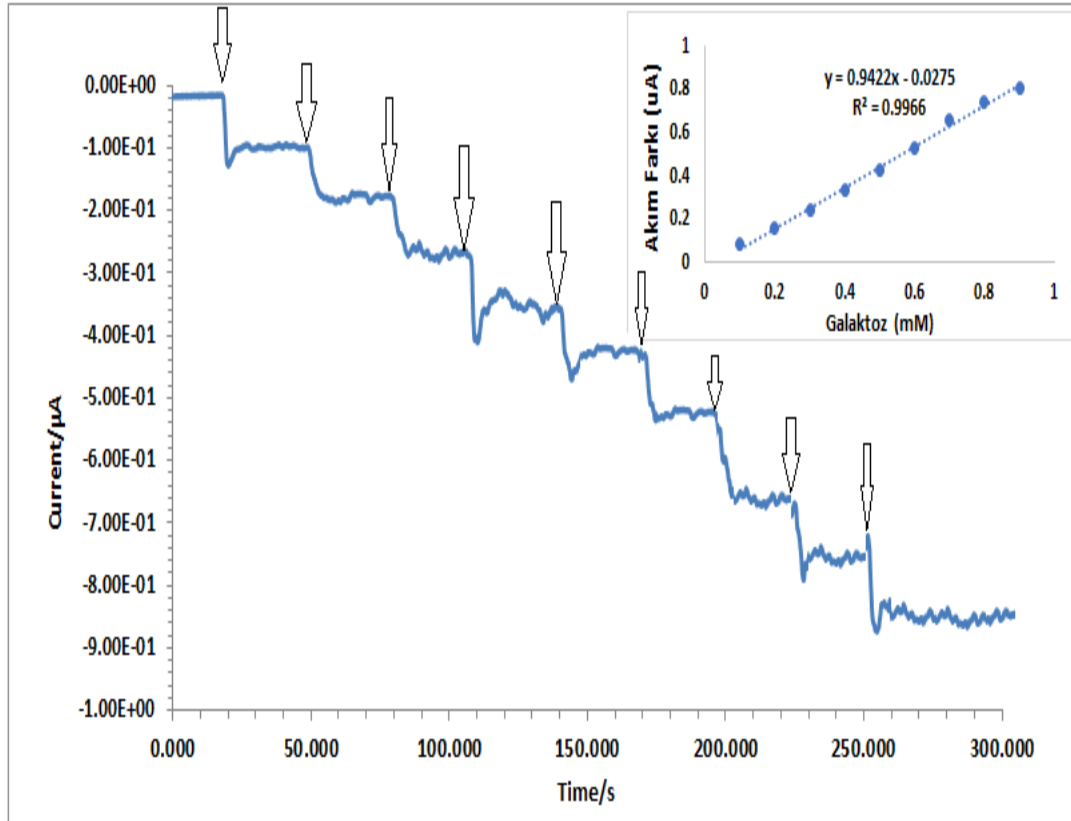
biyosensör yüzeyine galaktoz standartlarının damlatılması yoluyla elde edilen sabit hal amperometrik cevapları yer alırken Şekil 36’da buna ilişkin çizilen standart grafiği yer almaktadır. Bu sonuçlara göre biyosensörün doğrusal tayin aralığı 0,025-10 mM arası bulunmuştur.



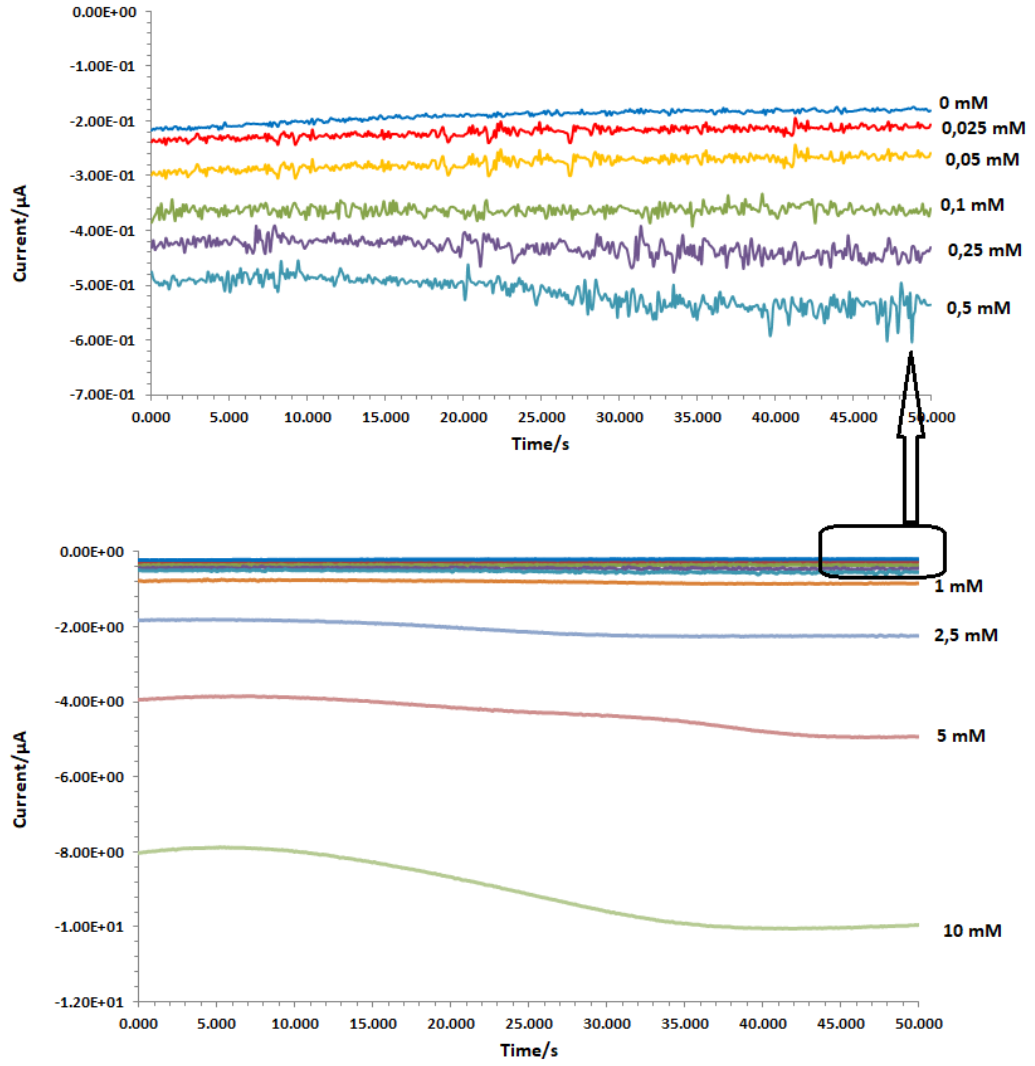
Şekil 33. Biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesine yönelik amperometri sonuçları. A) 0,025-0,5 mM ; B) 0,025-10 mM arası galaktoz konsantrasyonlarına ilişkin amperometrik cevaplar.



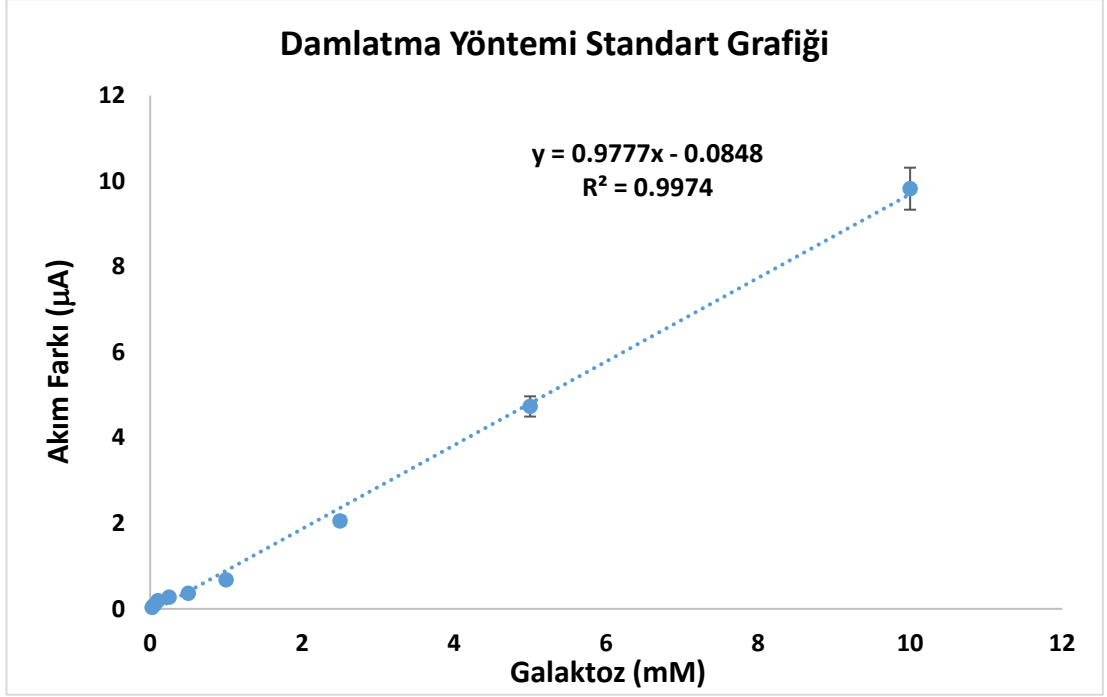
Şekil 34. Biyosensörün doğrusal tayin aralığına ilişkin kalibrasyon grafiği



Şekil 35. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün karıştırılmalı ortamda 100 mM galaktozdan 5'er μL sıralı katımı ile elde edilen amperometrik cevaplar ve buna ilişkin çizilen standart grafiği.



Şekil 36. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün biyosensör yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda galaktoz damlatılması yoluyla elde edilen sabit hal (karıştırmaz) amperometrik cevapları. 0 -10 mM galaktoz konsantrasyonlarına ilişkin cevaplar



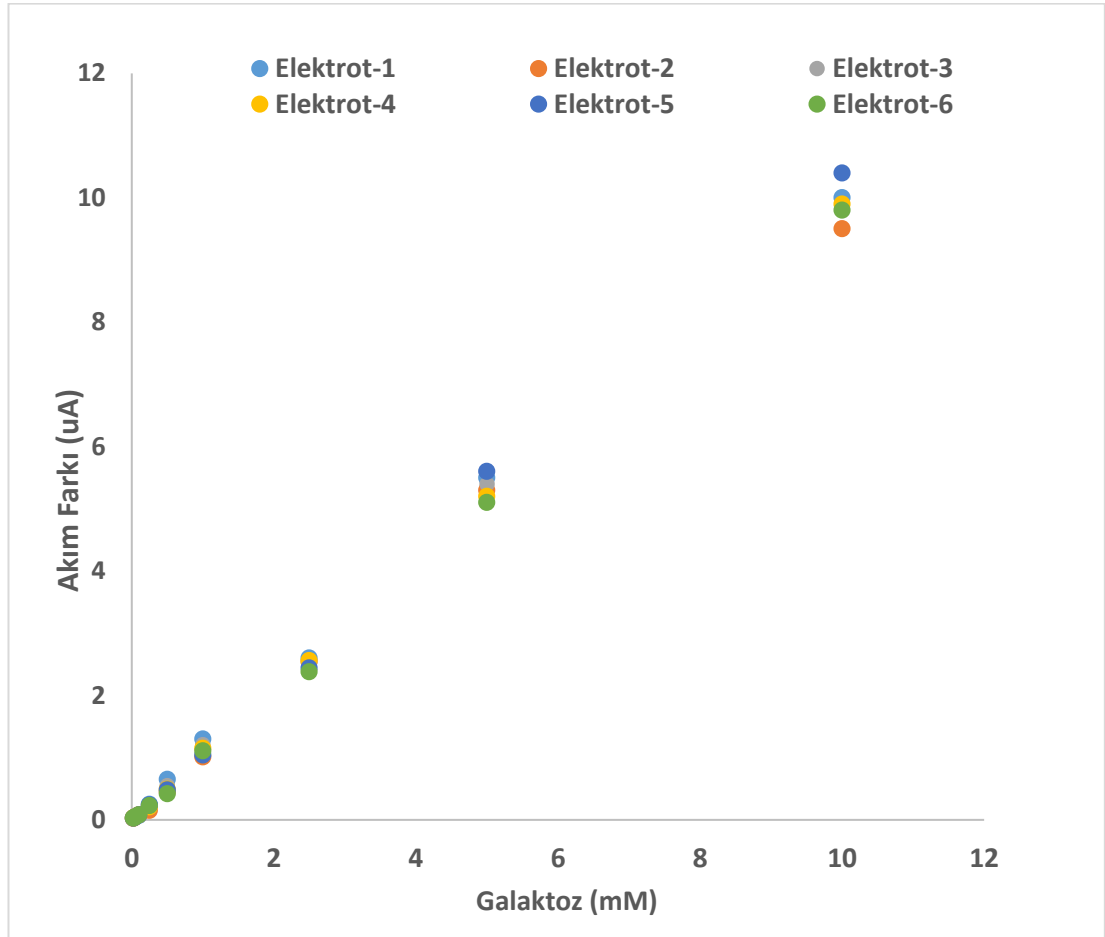
Şekil 37. Serbest galaktoz biyosensörünün damlatma yöntemi yöntemiyle elde edilmiş standart grafiği

4.1.13. Serbest galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğine ilişkin bulgular

Bu çalışmada hazırlanan serbest galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik denemesi düşük (0,1 mM), orta (1 mM) ve yüksek (10 mM) galaktoz konsantrasyonlarında olmak üzere 3 noktada 6 tekrarlı olacak şekilde hem gün içi, hem de günler arası olarak gerçekleştirilmiş, ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S. $\pm$) ve % varyasyon katsayısı (% V.K.) değerleri Tablo 7’de verilmiştir. Hem gün içi hem de günler arası tekrarlanabilirlik için elde edilen verilen %15’in altındadır ve kabul edilebilir seviyededir.

Tablo 7. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular

Konsantrasyon (mM)	Gün içi tekrarlanabilirlik (n=6)		Günler arası tekrarlanabilirlik (n=6)	
	Ortalama $\pm$ SD	%CV	Ortalama $\pm$ SD	%CV
0,1	0,096 $\pm$ 0,0054	5,63	0,104 $\pm$ 0,0108	10,38
1	1,041 $\pm$ 0,047	4,51	1,024 $\pm$ 0,098	9,57
10	10,025 $\pm$ 0,34	3,39	9,946 $\pm$ 0,74	7,44



Şekil 38. Tekrar üretilebilirlik çalışmasına ilişkin çizilen standart grafikleri

Tekrar üretilebilirlik için 6 farklı elektrotla hazırlanmış biyosensörle çalışılmış ve 0,025-10 mM arası galaktoz konsantrasyonlarına verilen biyosensör cevapları grafiğe geçirilmiştir. Şekil 32 de bu elektrotlara ilişkin standart grafiği, Tablo 8 de ise bu grafiklerin denklemleri ve R^2 değerleri verilmiştir. Grafiklerin eğimlerinden tekrar üretilebilirliğine ilişkin hesaplanan %CV değeri %7,78 olarak bulunmuştur.

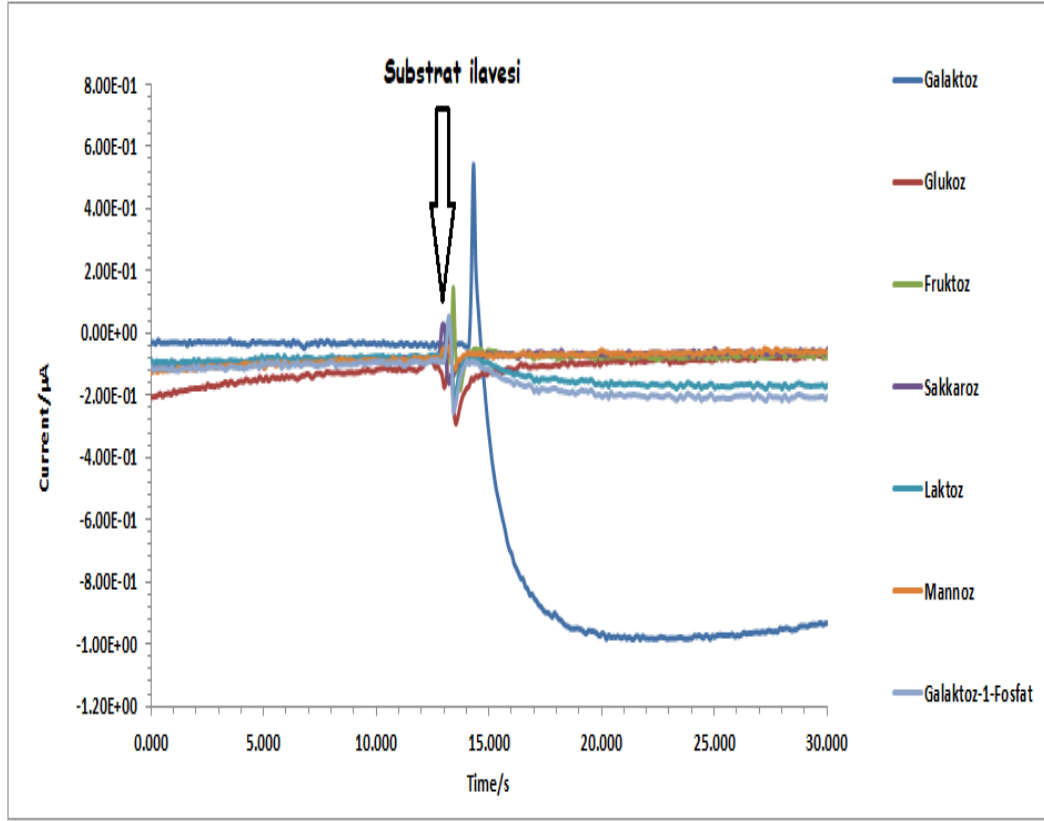
Tablo 8. Geliştirilen biyosensörün farklı elektrotlarla tayin aralığında elde edilen grafik denklemleri

	Grafik Denklemi	Grafiğin R^2 değeri
Elektrot-1	$y=1,0538x-0,0134$	0,9983
Elektrot-2	$y=0,9463x+0,004$	0,9993
Elektrot-3	$y=0,9298x+0,0029$	0,9970
Elektrot-4	$y=0,9925x+0,0511$	0,9973
Elektrot-5	$y=1,0974x+0,0324$	0,9820
Elektrot-6	$y=1,1218x-0,0201$	0,9891

4.1.14. Serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı ve girişim etkisine ilişkin bulgular

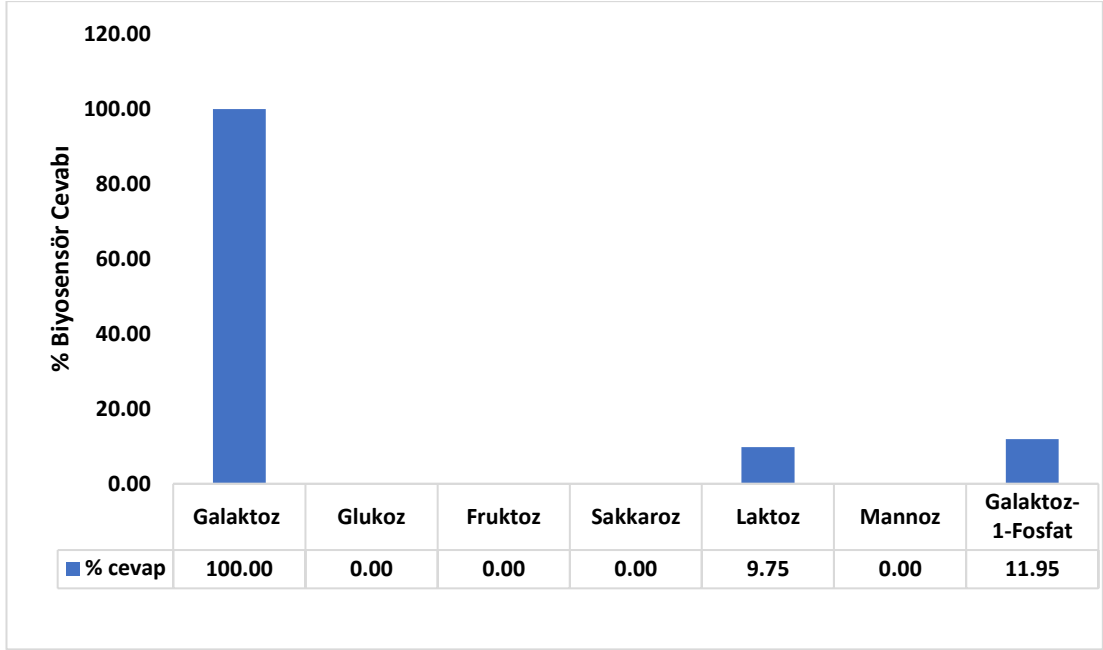
Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı belirlenmesi amacıyla galaktoza yapı olarak benzeyen diğer şeker ve şeker türevlerinden glukoz, fruktoz, mannoz, sakkaroz, laktoz ve galaktoz-1-fosfat test edilmiştir. Galaktoz dahil her bir analitin çözelti içindeki konsantrasyonu 1 mM'dır. Şekil 39 bu denemeye ilişkin amperometrik cevapları, Şekil 40 ise amperometrik cevaplardan yola çıkılarak elde edilen sütun grafiğini göstermektedir. Galaktoza verilen cevap %100 kabul edilmiş diğer analitlere verilen cevaplar galaktoza verilen cevaba oranlanarak % biyosensör cevabı hesaplanmıştır. Buna göre geliştirilen biyosensör, galaktoz

içermeyen glukoz, fruktoz, mannoz ve sakkaroz cevap vermemiştir. Yapısında galaktoz bulunan bir disakkarit olan laktoz ve fosfatlı bir şeker olan galaktoz-1-fosfata ise galaktoza verilen cevabın %10'u kadar bir cevap vermiştir.

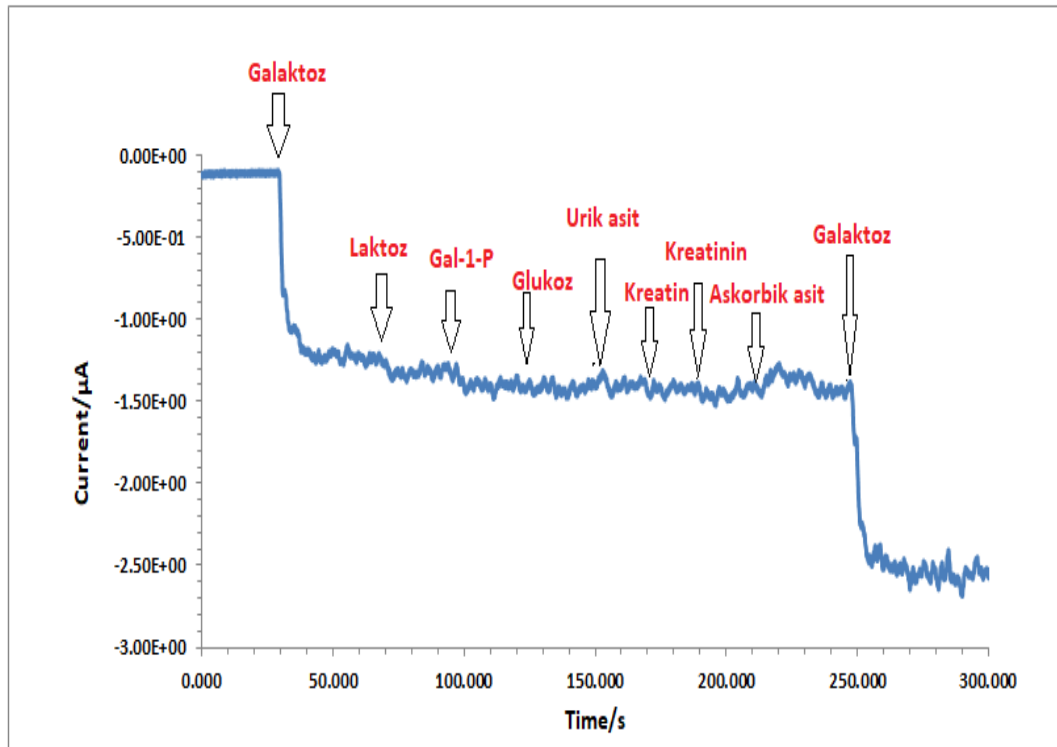


Şekil 39. Biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin amperometri sonuçları. Her bir substratın konsantrasyonu 1 mM'dır.

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün galaktoza verdiği cevaba serumda veya plazmada bulunan glukoz, kreatinin, kreatin ve ürik asitin yanı sıra elektrokimyasal ölçümlere girişim yapabilecek elektroaktif bir tür olan askorbik asitin etkisi incelenmiş, sonuçlar Şekil 41 ve Tablo 9'da gösterilmiştir. Şekil 41 de biyosensörün GaOX'un doğal substratlarından olan galaktoz, laktoz ve galaktoz-1-fosfat dışında askorbik asite de bir miktar cevap verdiği görülmektedir. Laktoz ve Gal-1-P varlığı biyosensör cevabını yaklaşık %10 arttırmakta askorbik asit ise %11 azaltmaktadır.



Şekil 40. Geliştirilen biyosensörün çeşitli substratlara cevabına ilişkin sütun grafiği



Şekil 41. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün girişim etkisi denemesine ilişkin amperometrik cevaplar. Galaktoz: 10 mM; Laktoz: 10 mM; Gal-1-P: 10 mM; Glukoz: 5 mM; Urik asit: 0,5 mM; Kreatin: 100 mM; Kreatinin : 5 mM; Askorbik asit: 0,2 mM.

Tablo 9. Serbest galaktoz biyosensörünün girişim etkisi denemesine ilişkin bulgular

Substrat	% Biyosensör Cevabı
Galaktoz	100
Galaktoz + Laktoz	110,85
Galaktoz + Gal-1-P	109,60
Galaktoz + Glukoz	100
Galaktoz + Urik asit	100
Galaktoz + Kreatin	100
Galaktoz + Kreatinin	100
Galaktoz + Askorbik asit	89,05

4.1.15. Serbest galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması ve geri eldesine ilişkin bulgular

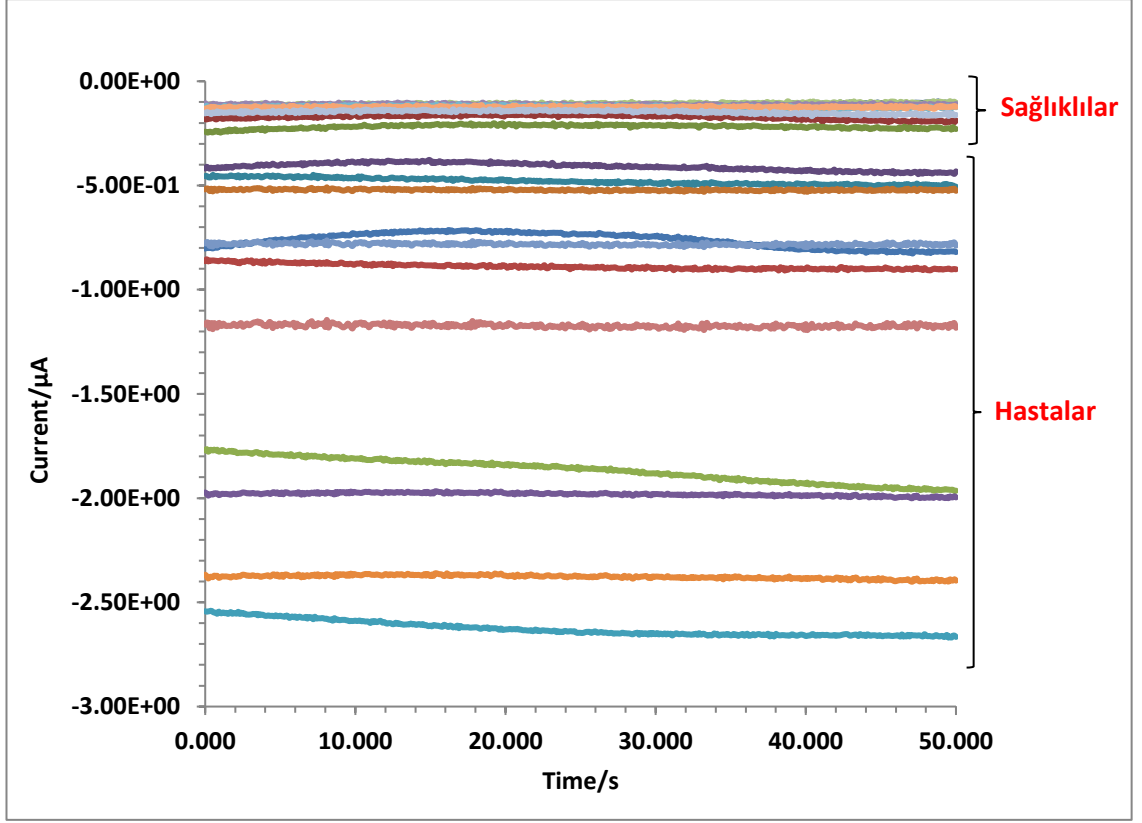
Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün geri elde denemesi sağlıklı kontrollerden toplanan plazma havuzuna 3 seviye için standart katma ile yapılmıştır. Tablo 10’da gösterilen sonuçlara göre % geri elde %93-100 arasındadır.

Tablo 10. Serbest galaktoz biyosensörünün geri elde denemesine ilişkin bulgular

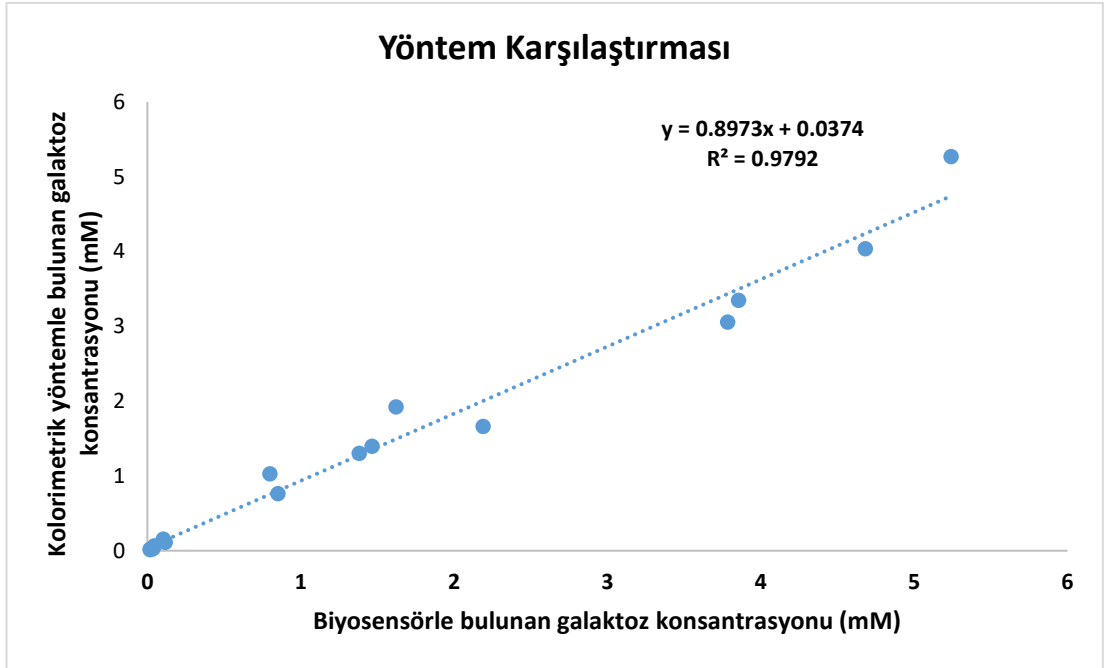
Eklenen Galaktoz (mM)	Bulunan Galaktoz (mM)	% Recovery	%VK
0	0,031±0,00186	-	
0,1	0,124±0,0062	93,00	5
1	0,97±0,0291	93,90	3
10	10,059±0,402	100,28	3,99

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün pratikte kullanımının test edilmesi amacıyla sağlıklı ve hasta plazma galaktoz düzeylerini yansıtan 10 sağlıklı ve 11 hasta örneğinde damlatma yöntemiyle çalışılmıştır.

Karıştırmalı yöntemde çalışma tamponuna eklenen örnek 10 kat seyrelmektedir. Bu seviye kimi sağlıklılar için biyosensörün ölçebileceği galaktoz konsantrasyonunun altındadır. Bu nedenle örnek uygulaması denemesi damlatma yöntemiyle yapılmış ve buna ilişkin amperometrik cevaplar Şekil 42’de, bu cevaplara ilişkin sonuçlar ve yöntem karşılaştırılması ise Şekil 43’te verilmiştir.



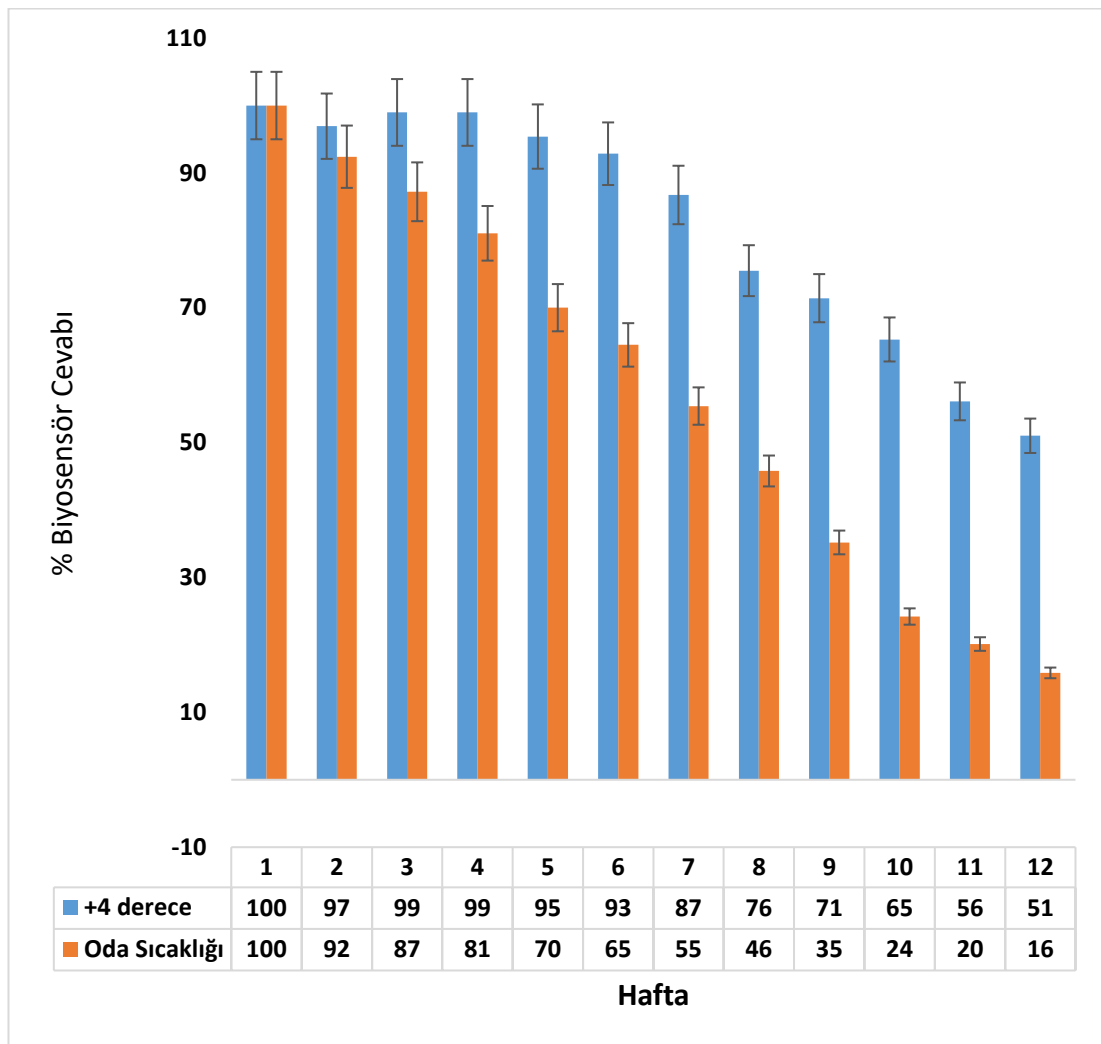
Şekil 42. Sağlıklı ve galaktozemili hasta plazma galaktoz düzeylerini gösteren örneklerden damlatma yöntemi ile elde edilmiş amperometrik cevapları



Şekil 43. Yöntem karşılaştırılmasına ilişkin çizilen korelasyon grafiği

4.1.16. Serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığını test etmek amacıyla yapılan bu denemede 1 mM galaktoz için ölçümler alınmıştır. 2 elektrot hazırlanırken elektrotların biri kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de bekletilmiş diğeri ise oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen ceavaplar Şekil 44’de verilmiştir. Buna göre biyosensör +4 °C’de bekletildiğinde 12 hafta sonunda %50 aktivite kaybı gözlenirken, oda sıcaklığında saklandığında 7 hafta sonunda %50 aktivite kaybı gözlenmiştir.

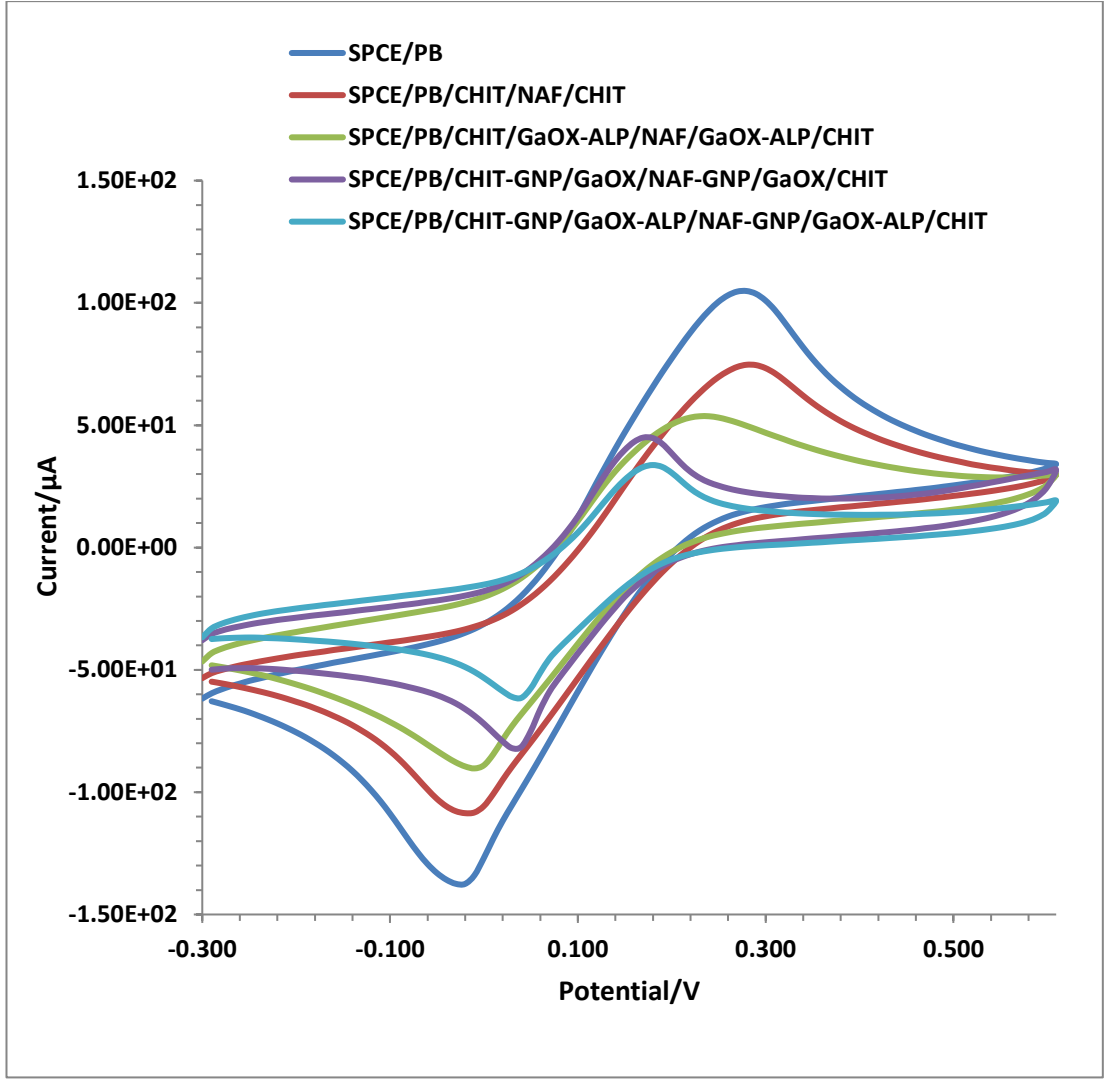


Şekil 44. Serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular

4.2. Total Galaktoz Biyosensörü İle İlgili Bulgular

4.2.1. Total galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin bulgular

Tez çalışmasının bu kısmında Gal-1-P tayini yani bir başka deyişle total galaktoz tayini için bir biyosensör daha geliştirilmiştir. Serbest galaktoz biyosensöründen farklı olarak elektrot yüzeyine Gal-1-P'ı hidrolize ederek GaOX için daha öncelikli bir substrat olan galaktoza çeviren ALP enzimi ilave edilmiştir. İmmobilizasyon aşamaları serbest galaktoz biyosensörü ile aynıdır. Şekil 45'te immobilizasyon aşamalarına ilişkin CV'ler yer almaktadır. ALP eklenmiş elektroda kadar olan CV'ler Şekil 15 ile hemen hemen aynıdır ki bu da olması gereken bir durumdur. ALP ilavesi ile elektrot yüzeyinde difüzyon bariyeri arttığından redoks piklerinin düşmesi beklenmektedir. Nitekim Şekil 45'te açık mavi olan CV'de de görüldüğü gibi Ferri/Ferro'nun redoks pikleri düşmüştür.

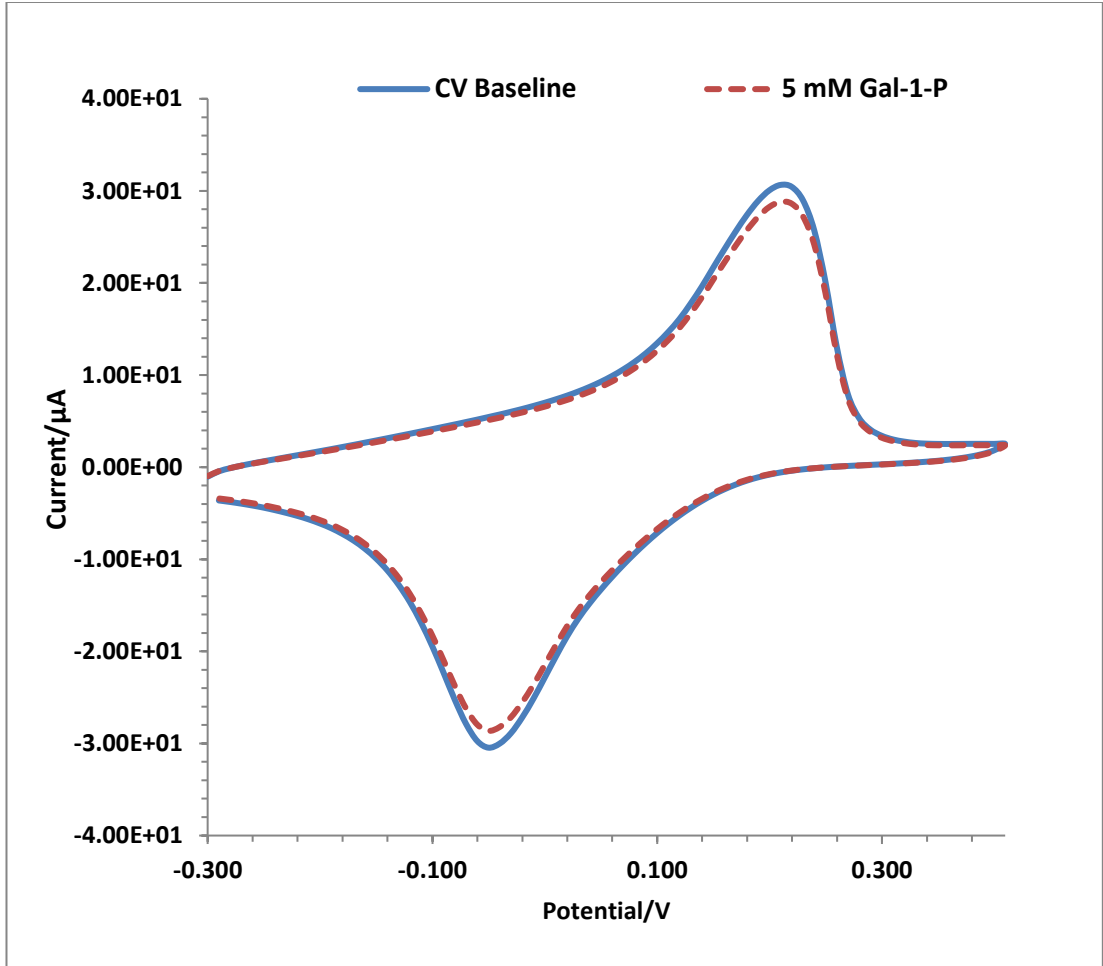


Şekil 45. Total galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin 0,1 M KCl içeren $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ 'de alınmış döngüsel voltammogramlar (50 mV/s).

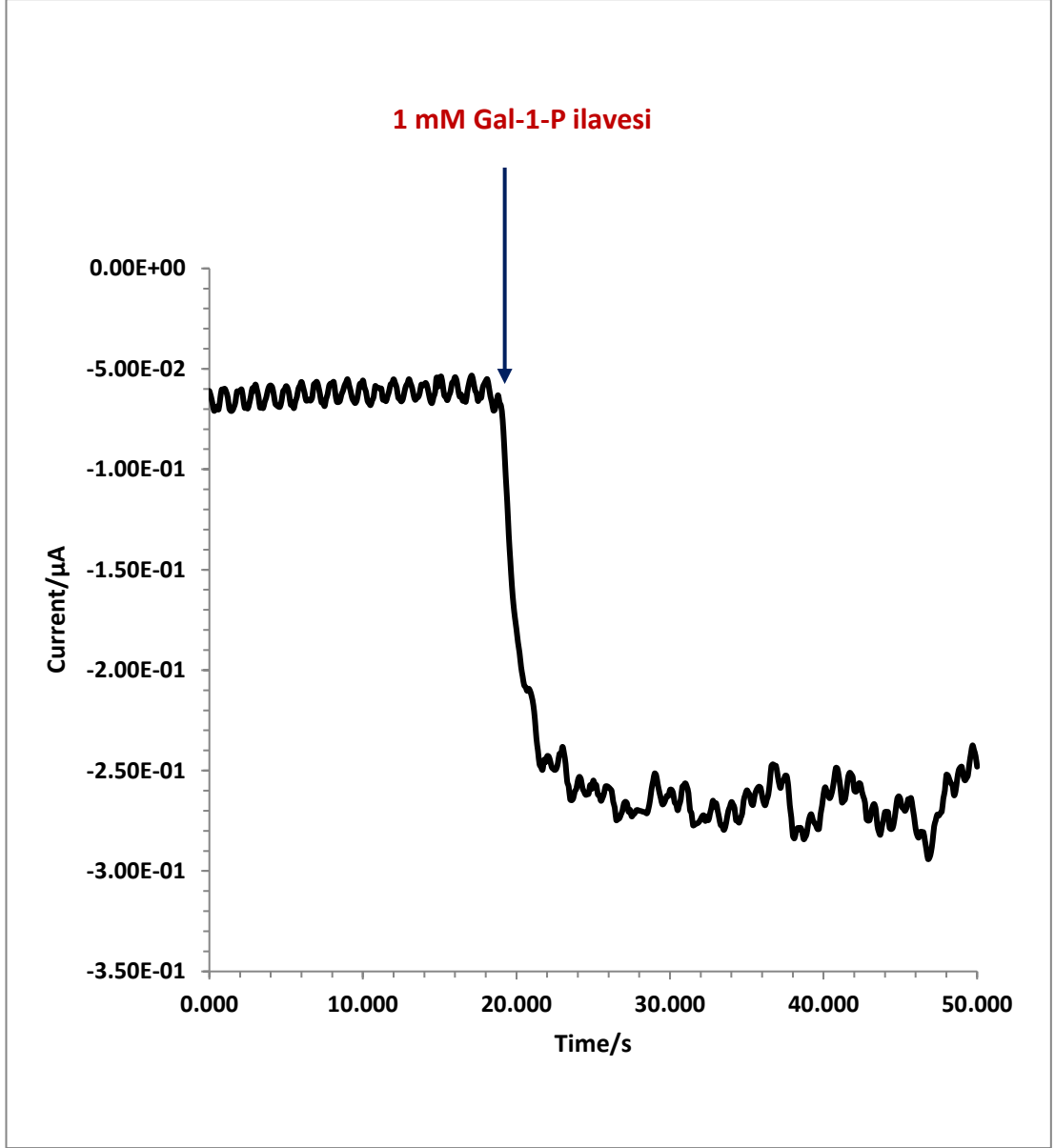
4.2.2. Total galaktoz biyosensörünün galaktoz-1-fosfata cevabına ilişkin bulgular

Bir biyosensörün immobilizasyon aşamalarının karakterizasyonundan sonra test edilmesi gereken ve biyosensör geliştirilmesinin en önemli adımı olan aşama ölçülecek analite olan cevaptır. Bu amaçla tampon çözelti ortamına Gal-1-P'nin 0 ve 5 mM olacak şekilde standartları eklendi ve buna ilişkin CV'ler alındı. Şekil 46'da görüleceği üzere ortama Gal-1-P eklenmesi ile PB'nun redoks pikleri düşmüştür. Döngüsel voltammetri yani CV kantitatif ölçümler için çok hassas olmamakla birlikte daha hassas elektrokimyasal teknikler olan Diferansiyel Puls Voltametrisi ve

amperometri için yol göstericidir. Bu tez çalışmasında kantitasyon için amperometri tekniğinin kullanılması planlanmıştır. Şekil 46'daki katodik pik referans alınarak -0,1 V'ta amperometrik ölçüm gerçekleştirilmiş ve Şekil 47'de görüleceği üzere Gal-1-P ilavesi ile akım negatif yönde artarak biyosensör cevabı gerçekleşmiştir.



Şekil 46. Total galaktoz biyosensörünün Gal-1-P'ye verdiği cevaba ilişkin döngüsel voltammogramlar. Ölçümler pH:8,0 Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl₂ içeren) tamponunda alınmıştır. Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık: 30

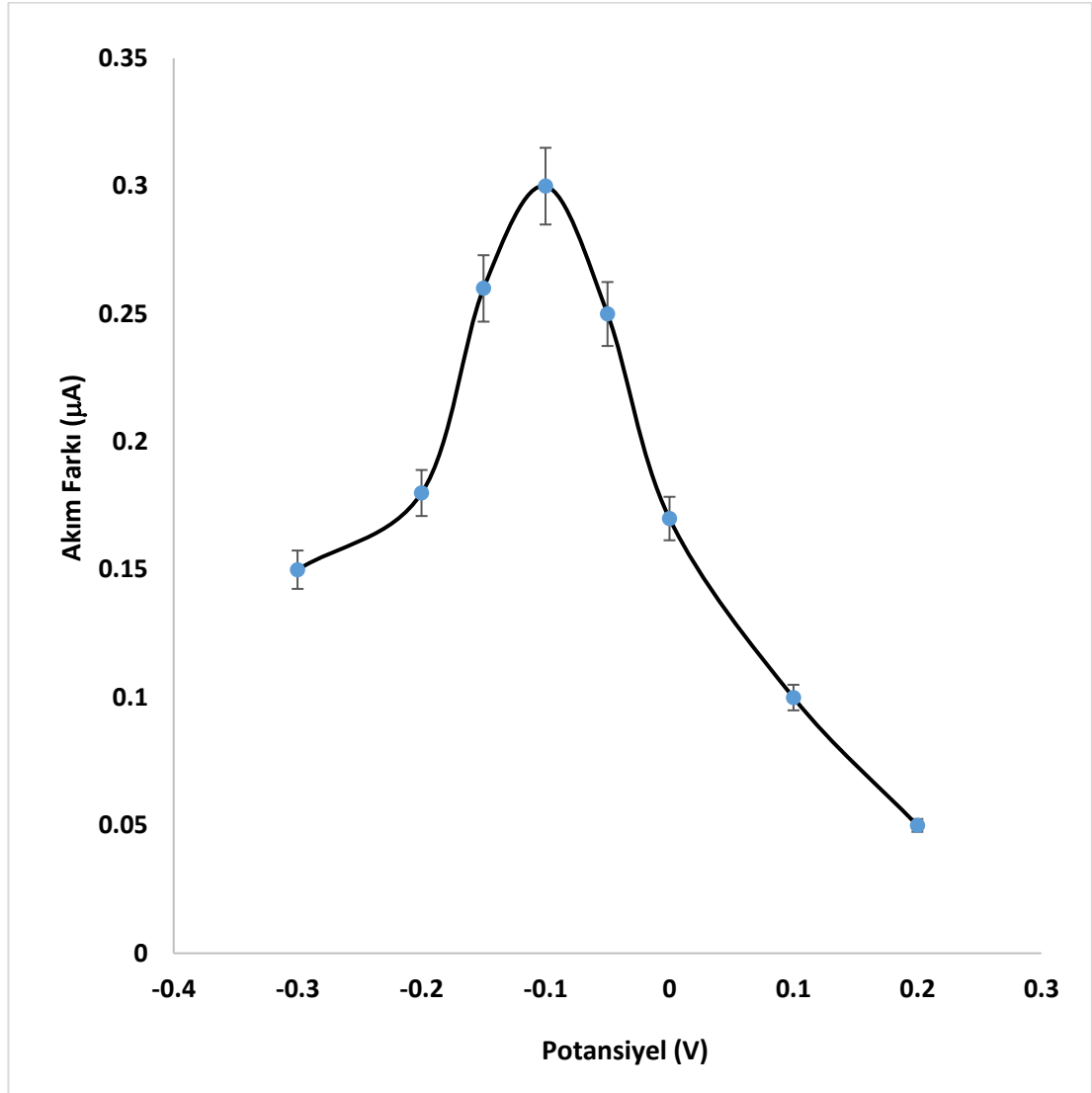


Şekil 47. Total galaktoz biyosensörünün Gal-1-P'ye verdiği cevaba ilişkin -0,1 V'ta alınmış amperometrik ölçümler. Ölçümler pH:8,0 Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl₂ içeren) tamponunda alınmıştır

4.2.3. Amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular

Şekil 46'teki katodik pik referans alınarak en yüksek cevabın elde edildiği amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla -0,3&0,2 V arası test edilmiştir. Ölçümler Gal-1-P'nin son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 48'de bu amperometrik ölçümlerden elde edilen akım farkı

- potansiyel grafiği gösterilmektedir. En yüksek akım farkı -0,1 V'ta elde edildiği için optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları bu potansiyelde yapılmıştır.



Şekil 48. Total galaktoz biyosensörünün amperometrik çalışma potansiyelinin belirlenmesine ilişkin bulgular. Ölçümler pH:8,0 Tris-HCl (0,1 M KCl ve 1 mM MgCl₂ içeren) tamponunda 1 mM Gal-1-P için alınmıştır

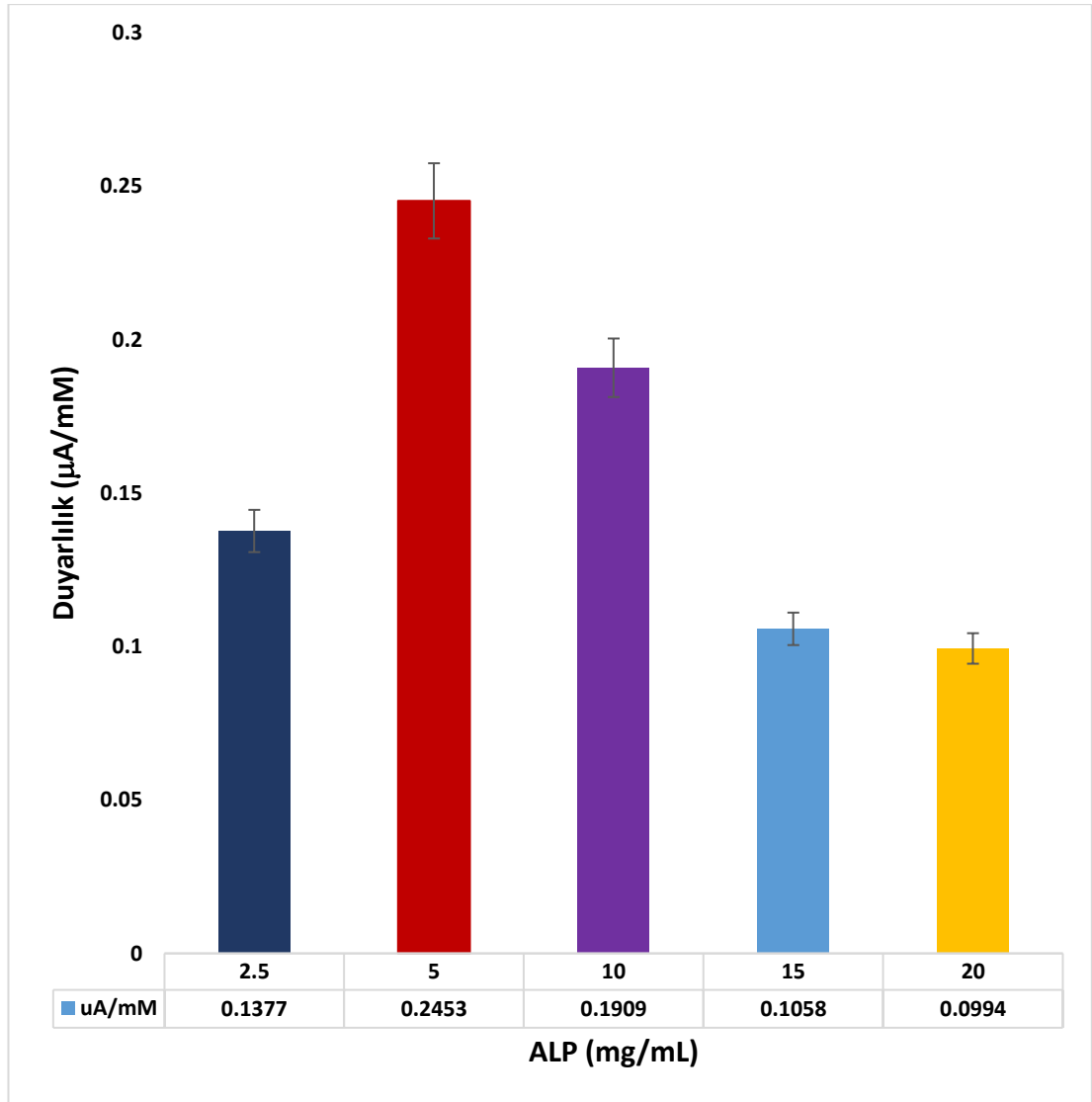
4.2.4. Alkalen fosfatazın optimizasyonuna ilişkin bulgular

Gal-1-P ve galaktoz tayini için tasarlanan total galaktoz biyosensörünün diğer immobilizasyon bileşenleri ve GaOX optimizasyonu serbest galaktoz biyosensörünün geliştirilmesi aşamasında yapılmıştır. Bu bölümde ise ALP konsantrasyonunun optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla değişen miktarlarda

(2,5-5-10-15-20 mg/mL) ALP içeren elektrotlarla 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında amperometrik olarak çalışılmış ve sonuçlar Tablo 11 ve Şekil 49'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre en hassas (0,2453 μ A/mM) biyosensör yanıtları 5 mg/mL ALP'nin kullanıldığı elektrotla elde edilmiştir

Tablo 11. Alkalen fosfatazın optimum miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular

Enzim konsantrasyonu (mg/mL)	Grafiğin denklemi	R²	%VK
2,5	$y=0,1377x + 0,0147$	0,985	5,31
5	$y=0,2453x + 0,1171$	0,993	4,21
10	$y=0,1909x + 0,0965$	0,988	6,90
15	$y=0,1058x + 0,0569$	0,993	9,08
20	$y=0,0994x + 0,0273$	0,989	8,25

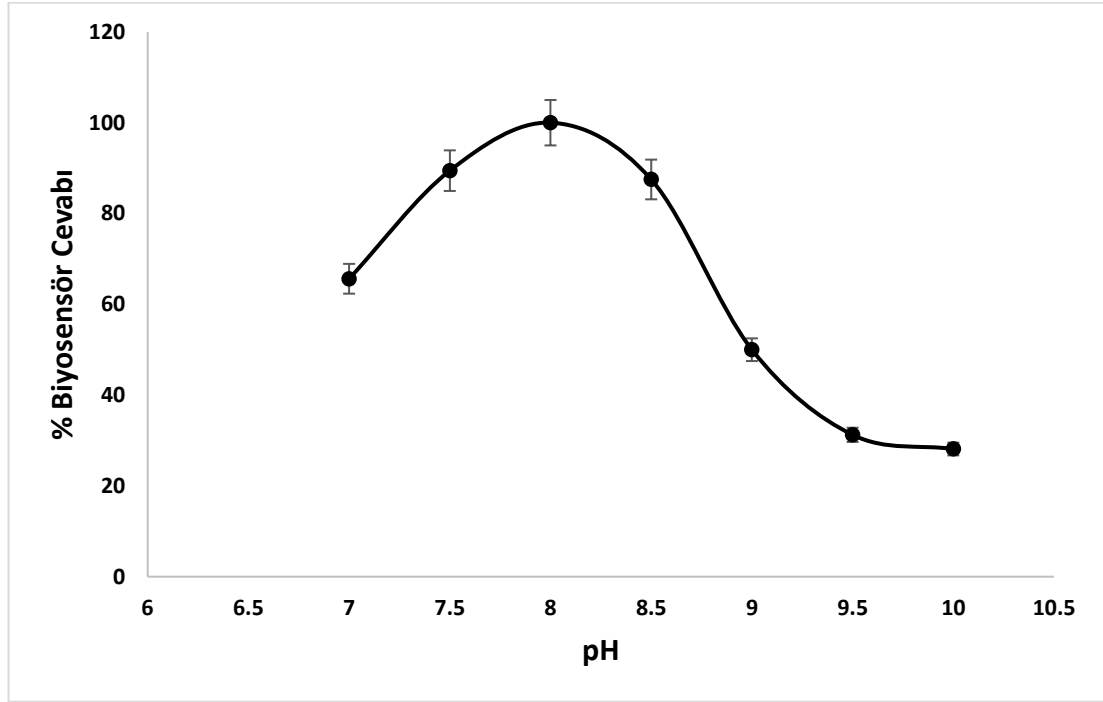


Şekil 49. Grafik, 0,2-10 mM konsantrasyon aralığında Gal-1-P konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik farklı **ALP konsantrasyonları** ile modifiye edilmiş SPCE'lerin duyarlılıklarını karşılaştırır.

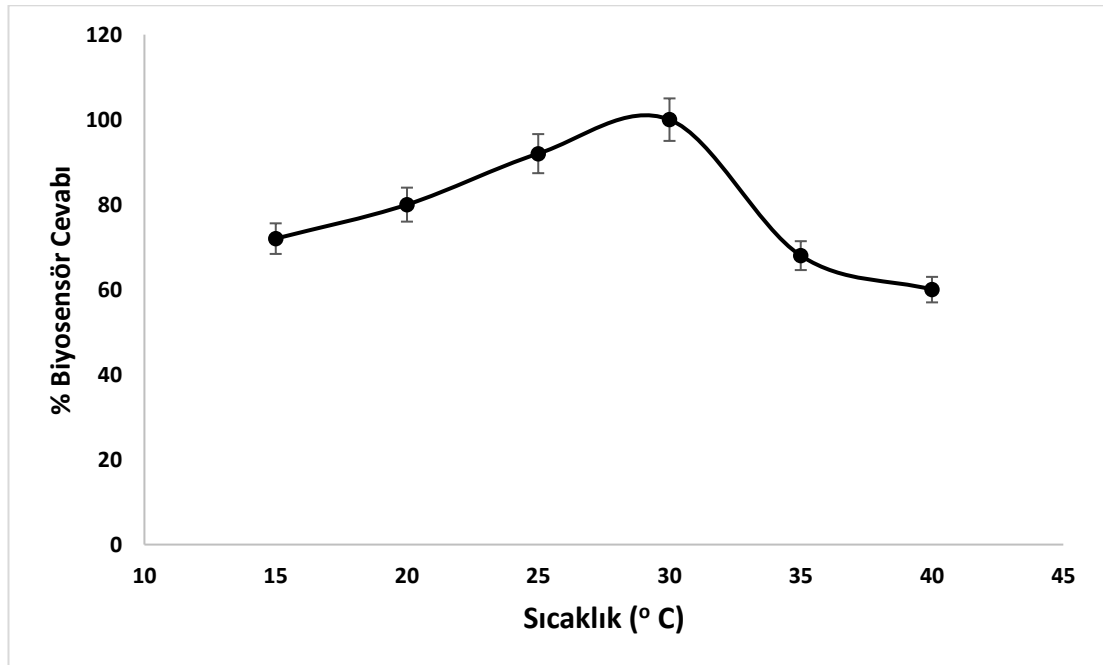
4.2.5. Total galaktoz biyosensörünün pH ve sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular

Total galaktoz biyosensörünün çalışma koşullarının optimizasyonu için pH ve sıcaklık etkisi incelenmiştir. Alkalen fosfataz enzimi adından anlaşılacağı üzere bazik ortamda aktivite gösteren bir enzimdir. Fakat bu tez çalışmasında geliştirilen total galaktoz biyosensörü iki enzimden oluştuğu için biyosensör cevabı sadece ALP'ye bağlı değildir. Dolayısıyla biyosensörün optimum pH'ı her iki enzimin birarada çalışabileceği optimum pH'ı göstermektedir. Şekil 50'da optimum pH, şekil

51’de ise optimum sıcaklık sonuçları verilmektedir. Buna göre total galaktoz biyosensörü için optimum pH:8, optimum sıcaklık ise 30 °C olarak bulunmuştur.



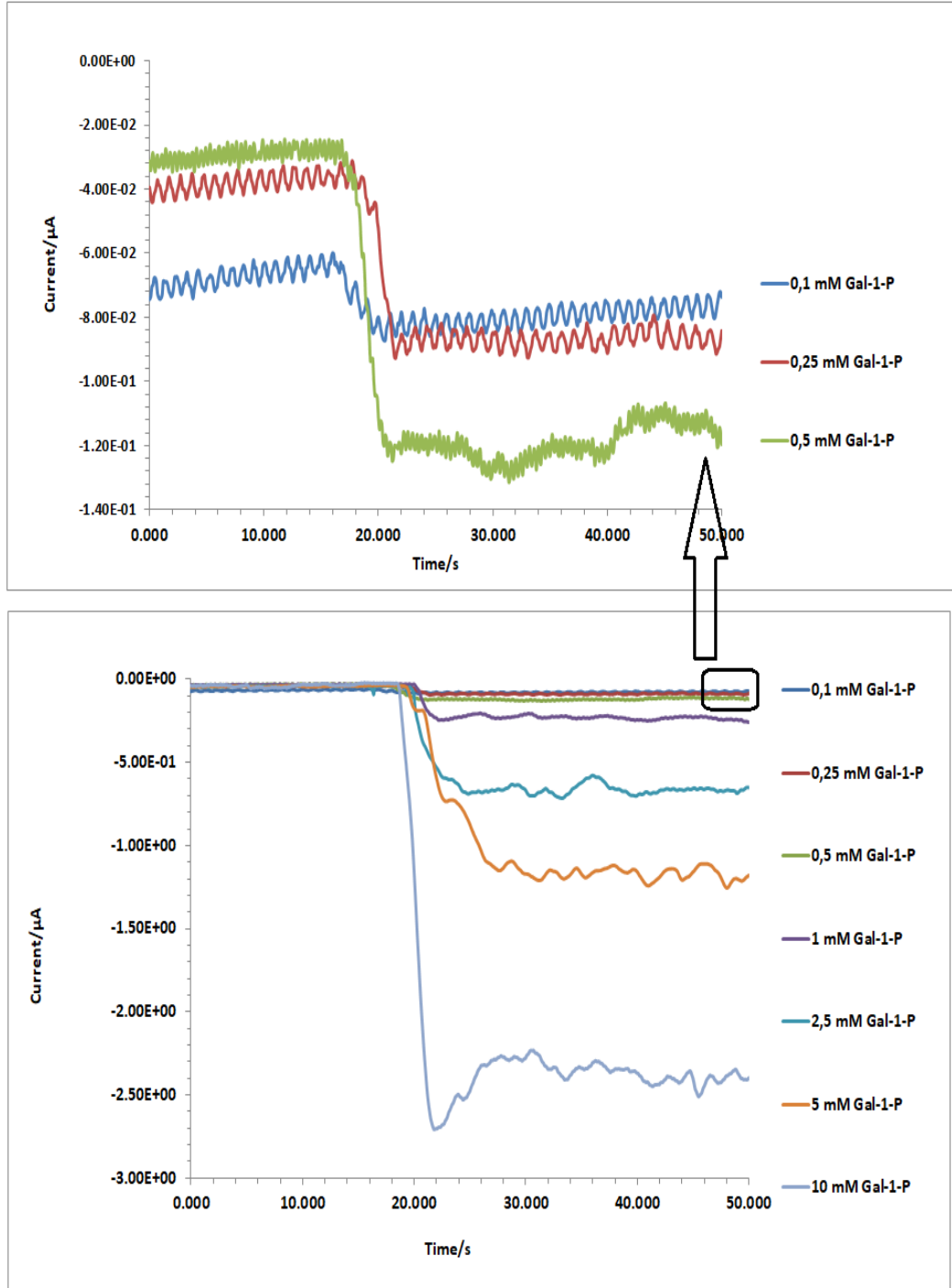
Şekil 50. Total galaktoz biyosensörünün pH optimizasyonuna ilişkin bulgular. 1 mM Gal-1-P için gerçekleştirilen ölçümler 3 tekrarlıdır.



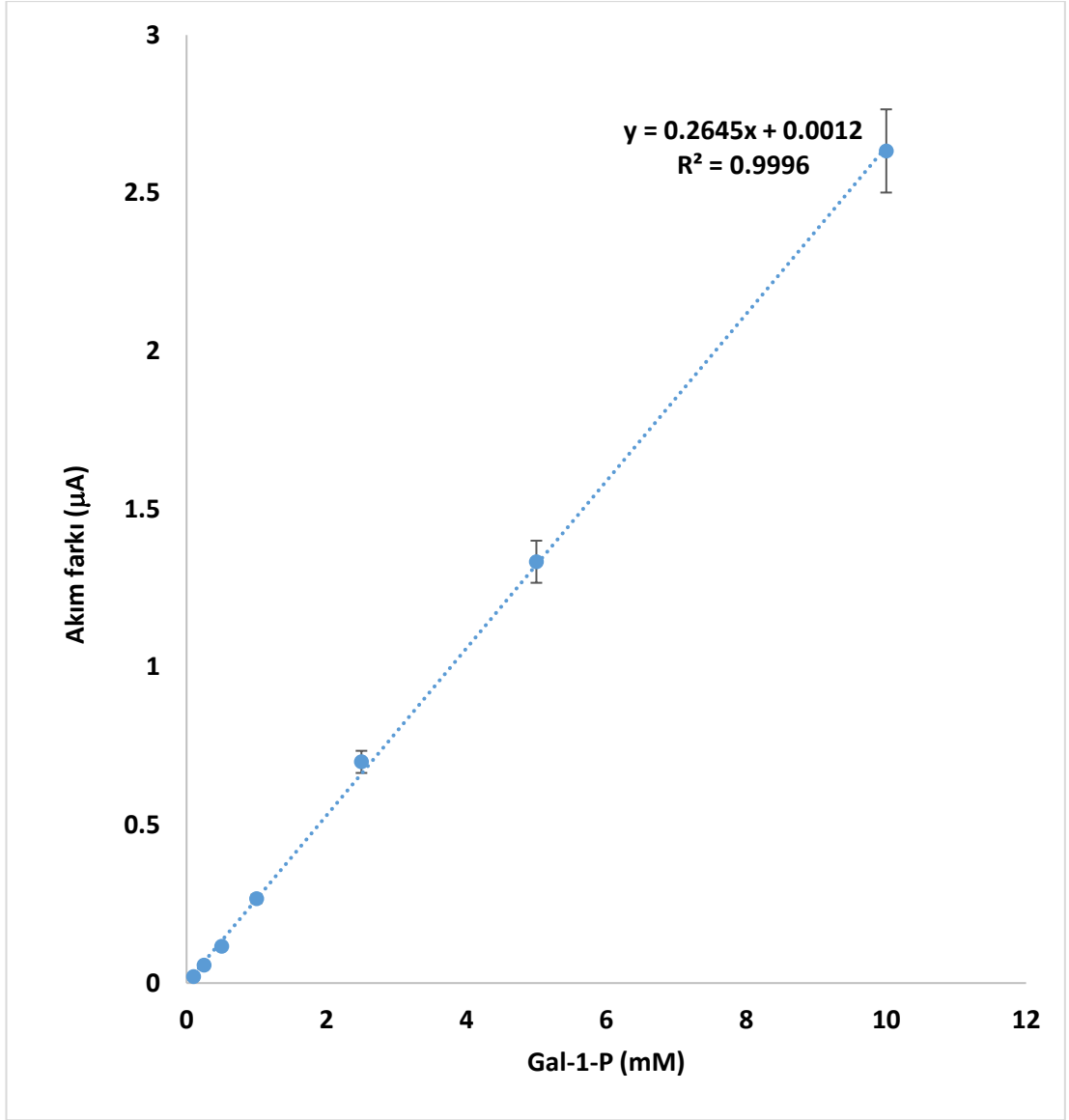
Şekil 51. Total galaktoz biyosensörünün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular. 1 mM Gal-1-P için gerçekleştirilen ölçümler 3 tekrarlıdır.

4.2.6. Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı

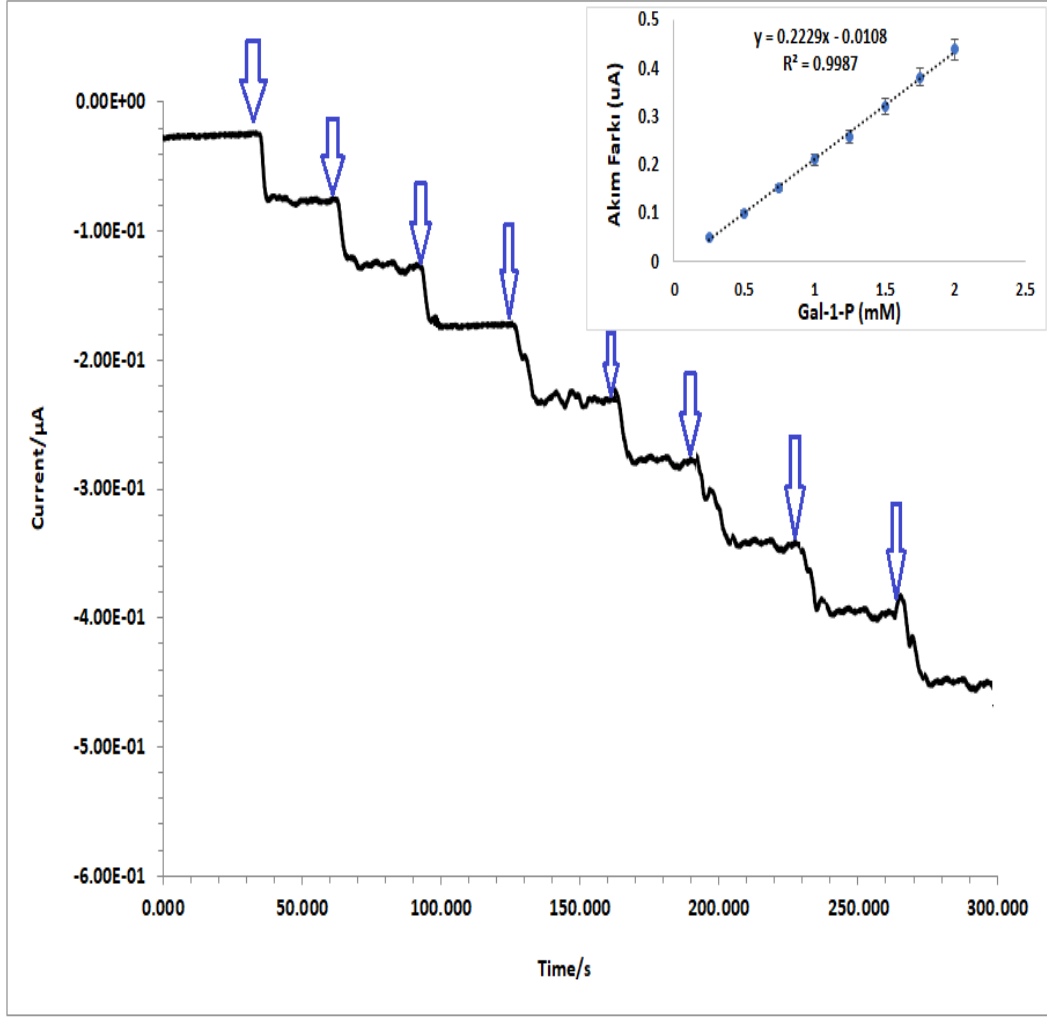
Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı için 0,001 mM-10 mM arası Gal-1-P içeren çözeltilerle amperometrik olarak çalışılmıştır. Şekil 52 karıştırmalı ortamda elde edilen tekli katım amperometrik cevapları, Şekil 53 buna ilişkin çizilen standart grafiğini gösterirken Şekil 54 karıştırmalı ortamda elde edilen sıralı katım amperometrik cevapları ve buna ilişkin standart grafiği göstermektedir. Şekil 55’de biyosensör yüzeyine Gal-1-P standartlarının damlatılması yoluyla elde edilen sabit hal amperometrik cevapları yer alırken, Şekil 56’da buna ilişkin çizilen standart grafiği yer almaktadır. Bu sonuçlara göre total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 0,1-10 mM arası bulunmuştur



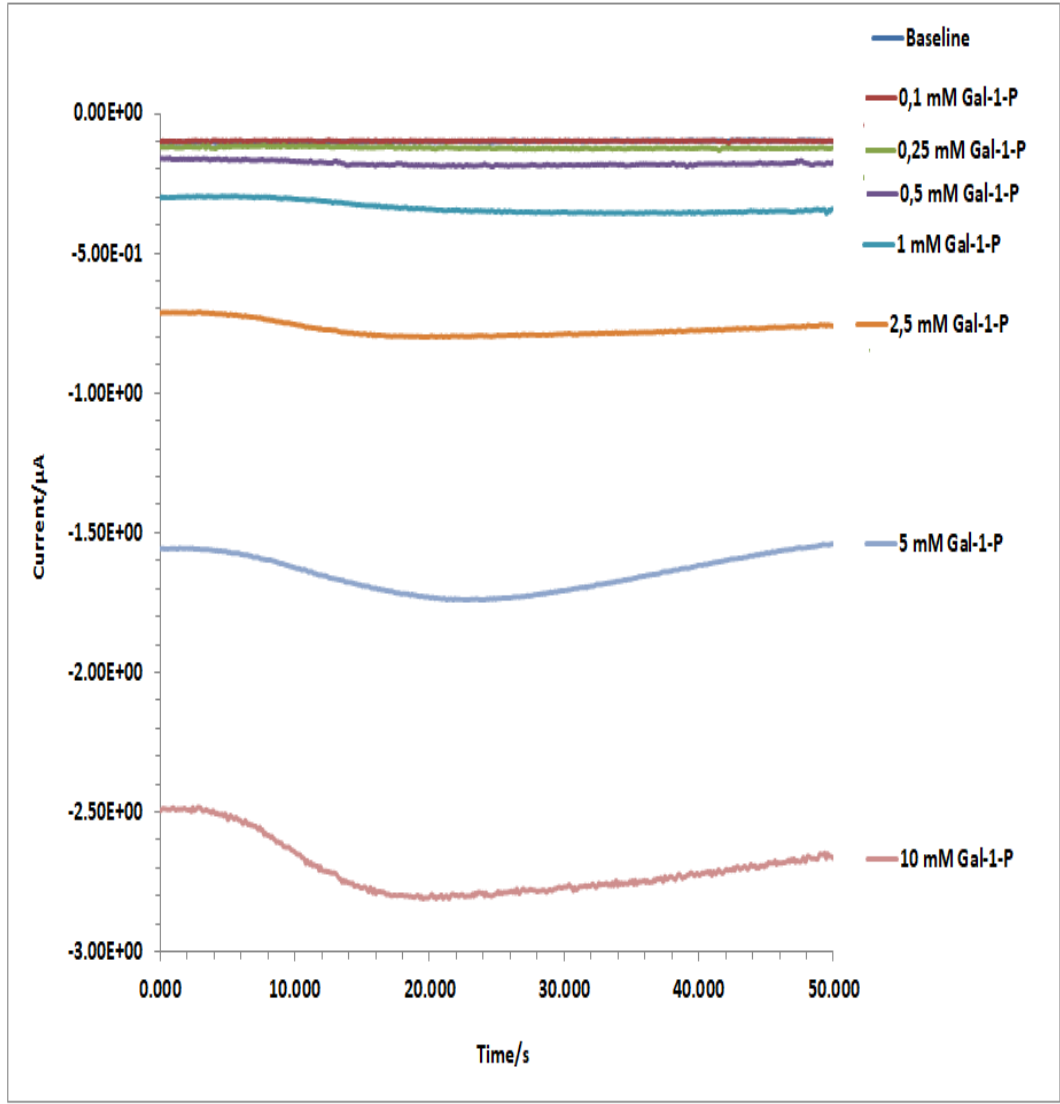
Şekil 52. Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesine yönelik amperometri sonuçları. A) 0,1-0,5 mM ; B) 0,1-10 mM arası Gal-1-P konsantrasyonlarına ilişkin amperometrik cevaplar.



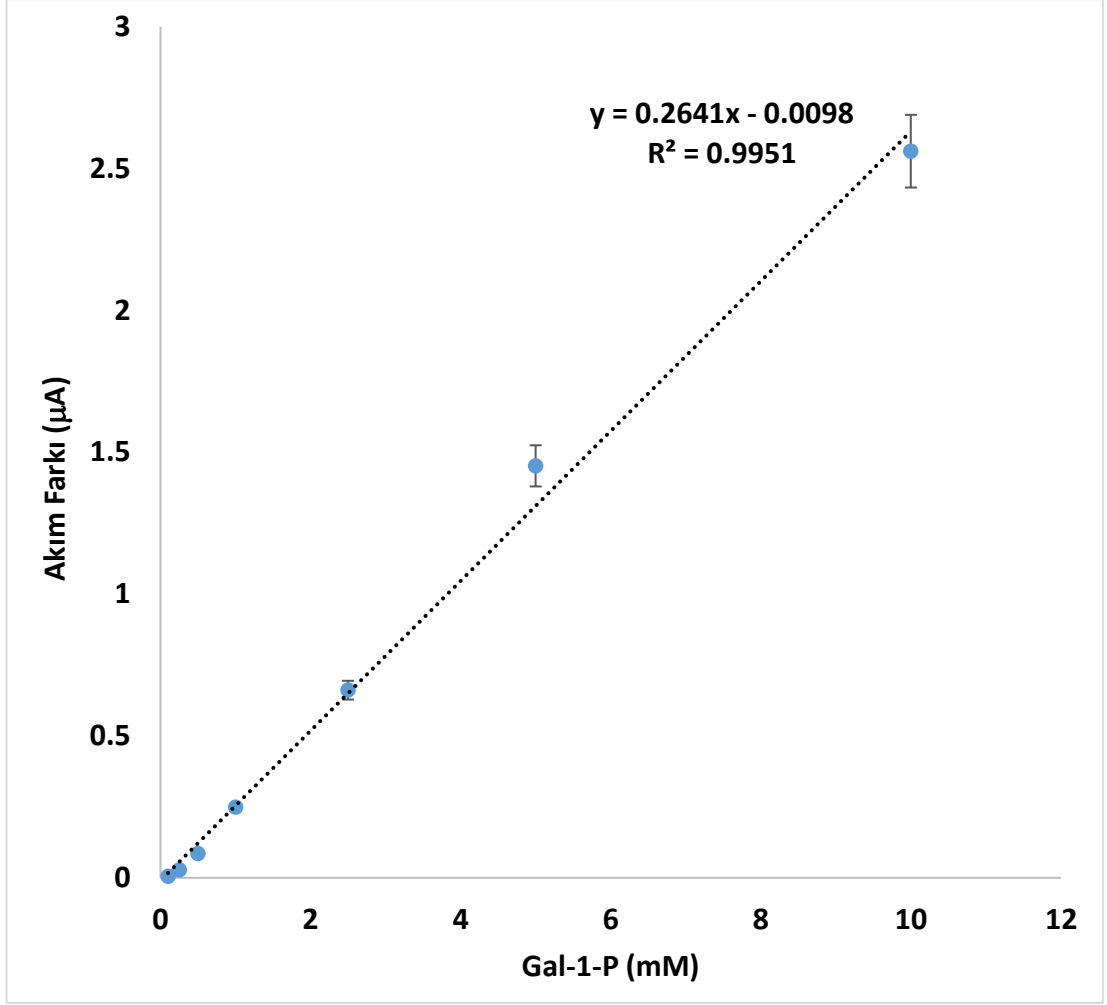
Şekil 53. Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin standart grafiği.



Şekil 54. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün karıştırılmalı ortamda 25 mM Gal-1-P'ın sıralı katımı ile elde edilen amperometrik cevaplar ve buna ilişkin çizilen standart grafiği



Şekil 55. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün biyosensör yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda Gal-1-P damlatılması yoluyla elde edilen sabit hal (karıştırmasız) amperometrik cevapları. 0 -10 mM Gal-1-P konsantrasyonlarına ilişkin cevaplar



Şekil 56. Total galaktoz biyosensörünün damlatma yöntemiyle elde edilmiş standart grafiği

4.2.7. Total galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği

Tezin bu kısmında total galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik denemesi düşük (0,25 mM), orta (1 mM) ve yüksek (10 mM) Gal-1-P konsantrasyonlarında olmak üzere 3 noktada 6 tekrarlı olacak şekilde hem gün içi hem de günler arası olarak gerçekleştirilmiş, ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S. $\pm$) ve % varyasyon katsayısı (% V.K.) değerleri Tablo 12’de verilmiştir. Hem gün içi hem de günler arası tekrarlanabilirlik için elde edilen veriler %15’in altındadır ve kabul edilebilir seviyededir.

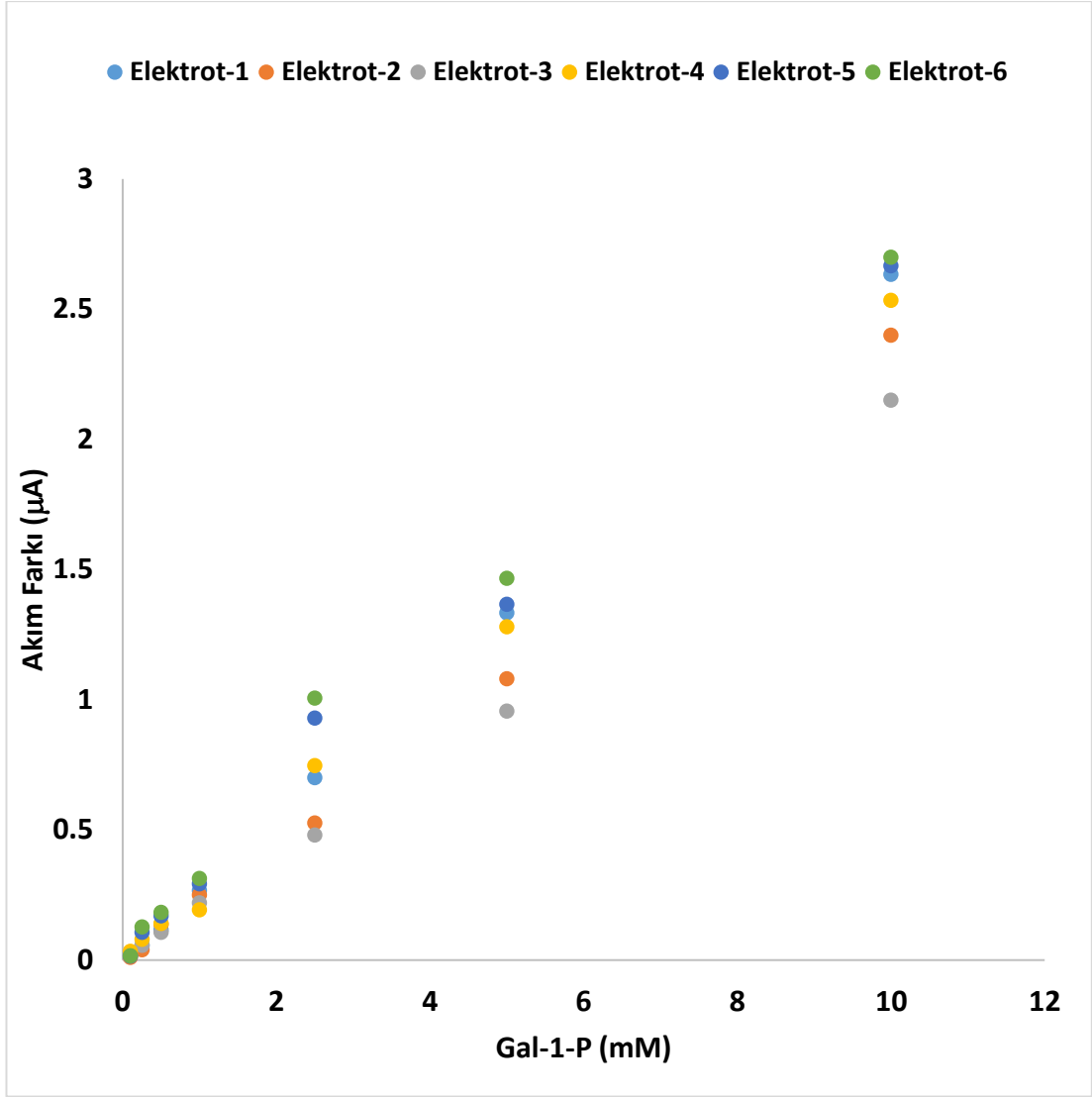
Tablo 12. Total galaktoz biyosensörünün gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular

Gal-1-P (mM)	Gün içi tekrarlanabilirlik (n=6)		Günler arası tekrarlanabilirlik (n=6)	
	Ortalama $\pm$ SD	%VK	Ortalama $\pm$ SD	%VK
0,25	0,246 $\pm$ 0,021	8,31	0,256 $\pm$ 0,027	10,45
1	1,014 $\pm$ 0,059	5,79	1,009 $\pm$ 0,098	9,73
10	10,098 $\pm$ 0,227	2,24	10,117 $\pm$ 0,352	3,48

Tekrar üretilebilirlik için 6 farklı elektrotla hazırlanmış biyosensörle çalışılmış ve 0,10-10 mM arası galaktoz konsantrasyonlarına verilen biyosensör cevapları grafiğe geçirilmiştir. Şekil 57 bu elektrotlara ilişkin standard grafiği, Tablo 13 de ise bu grafiklerin denklemleri ve R^2 değerleri görülmektedir. Grafiklerin eğimlerinden tekrar üretilebilirliğine ilişkin hesaplanan %CV değeri %8,75 olarak bulunmuştur.

Tablo 13. Total galaktoz biyosensörünün farklı elektrotlarla tayin aralığında elde edilen grafik denklemleri

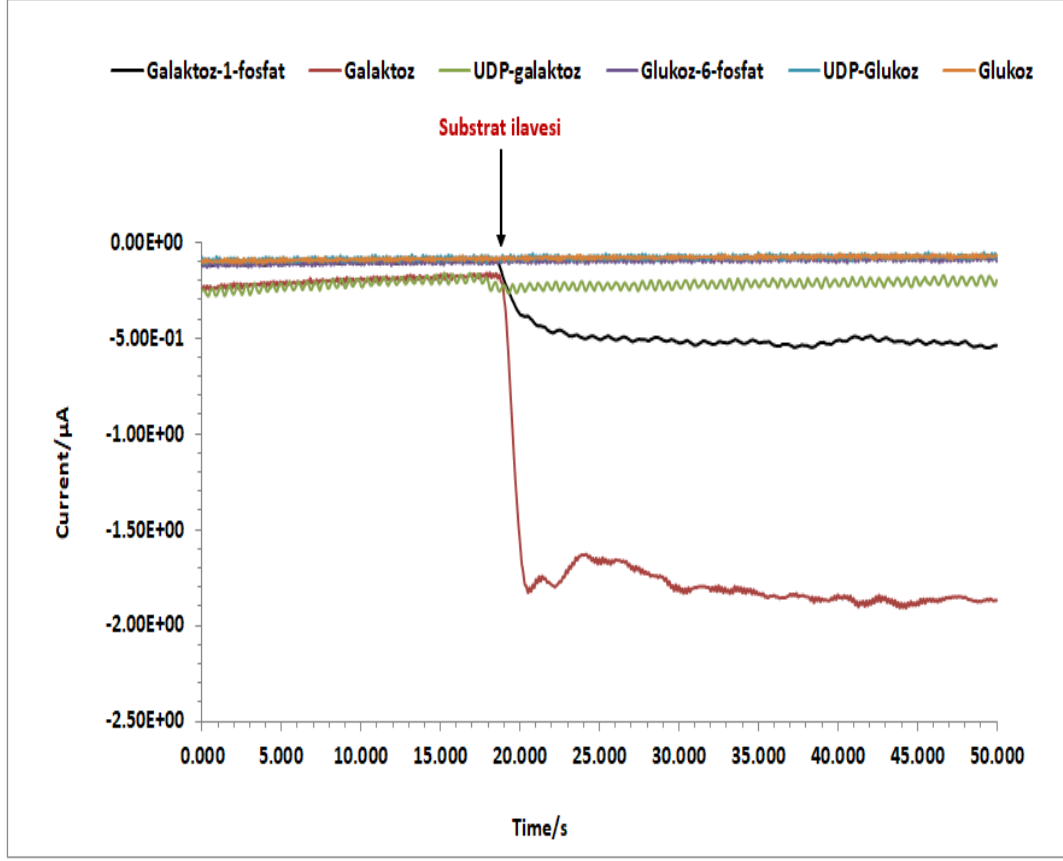
	Grafik Denklemi	Grafığın R^2 değeri
Elektrot-1	$y=0,2645x + 0,0012$	0,9996
Elektrot-2	$y=0,2373x - 0,0211$	0,9968
Elektrot-3	$y=0,2118x - 0,016$	0,9966
Elektrot-4	$y=0,2535x + 0,0145$	0,9969
Elektrot-5	$y=0,2642x + 0,0623$	0,9906
Elektrot-6	$y=0,2683x + 0,088$	0,9858



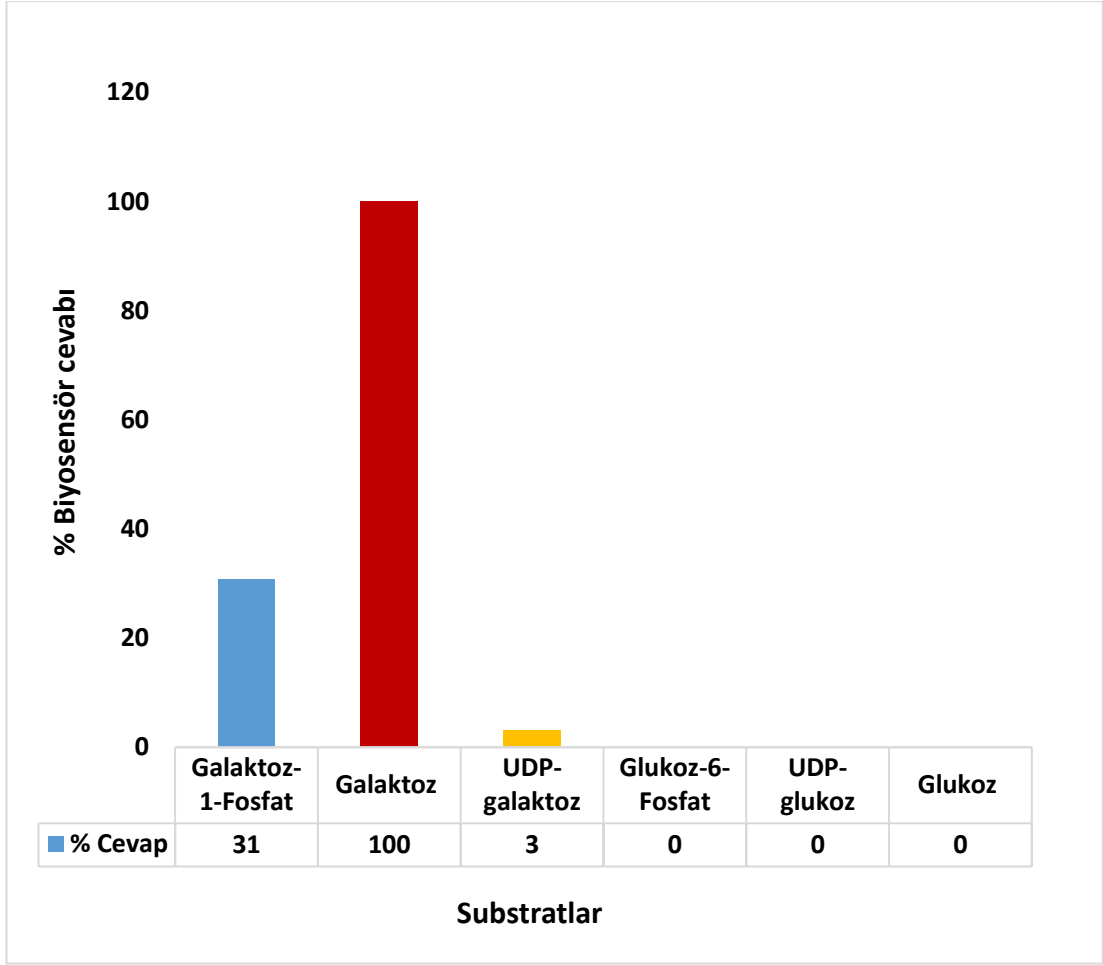
Şekil 57. Total galaktoz biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmasına ilişkin standart grafikleri

4.2.8. Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı

Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla her birinin son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde Gal-1-P, galaktoz, UDP-glukoz, UDP-galaktoz, Glukoz-6-fosfat ve glukoz test edilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 58 ve 59’da verilmiştir. Her iki şekil incelendiğinde geliştirilen biyosensör sadece galaktoz içeren substratlara cevap vermiştir.



Şekil 58. Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğine ilişkin amperometrik cevaplar. Her bir substratın konsantrasyonu 1 mM'dır.



Şekil 59. Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı denemesine ilişkin sütun grafiğı

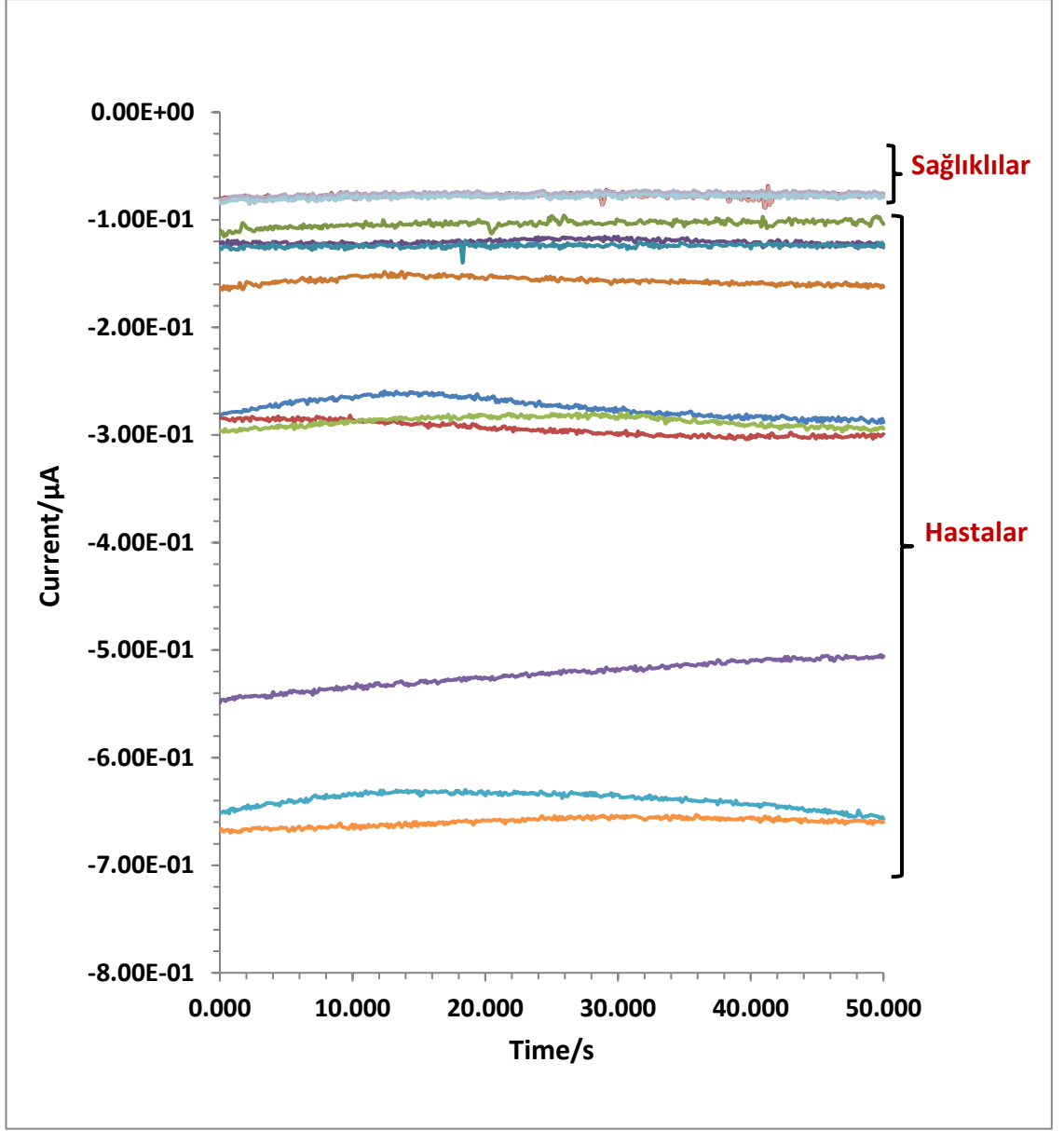
4.2.9. Total Galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması ve geri eldesine ilişkin bulgular

Total galaktoz biyosensörünün pratik kullanımının test edilmesi amacıyla sağlıklı kontrollerden elde edilen eritrosit hemolizati havuzunda standart katma yöntemi ile geri elde denemesi yapılırken örnek denemesi ise gene bu havuzdan düşük orta yüksek seviyeleri içerecek şekilde rastgele standart katmalar yoluyla elde edilen hasta düzeyini içeren eritrosit hemolizatlarında ise total galaktoz tayini yapılmıştır. Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün % geri eldesine ilişkin sonuçlar Tablo 14'te verilirken, örnek denemesine ilişkin damlatma yöntemi ile elde edilmiş amperometrik cevaplar Şekil 60'da ve buna ilişkin sonuçlar Tablo 15'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre biyosensörün % geri eldesi kabul edilebilir aralıktadır. Hasta ve sağlıklılar arasında ayırım yapabilmektedir.

Tablo 14. Total galaktoz biyosensörünün geri elde denemesine ilişkin bulgular

Eklenen Gal-1-P (mM)	Bulunan Gal-1-P (mM)	% Recovery	%VK
0	0	-	
0,25	0,252 ± 0,0134	101	5,32
1	1,055±0,0989	105	9,4
10	9,98±0,296	99,8	2,97



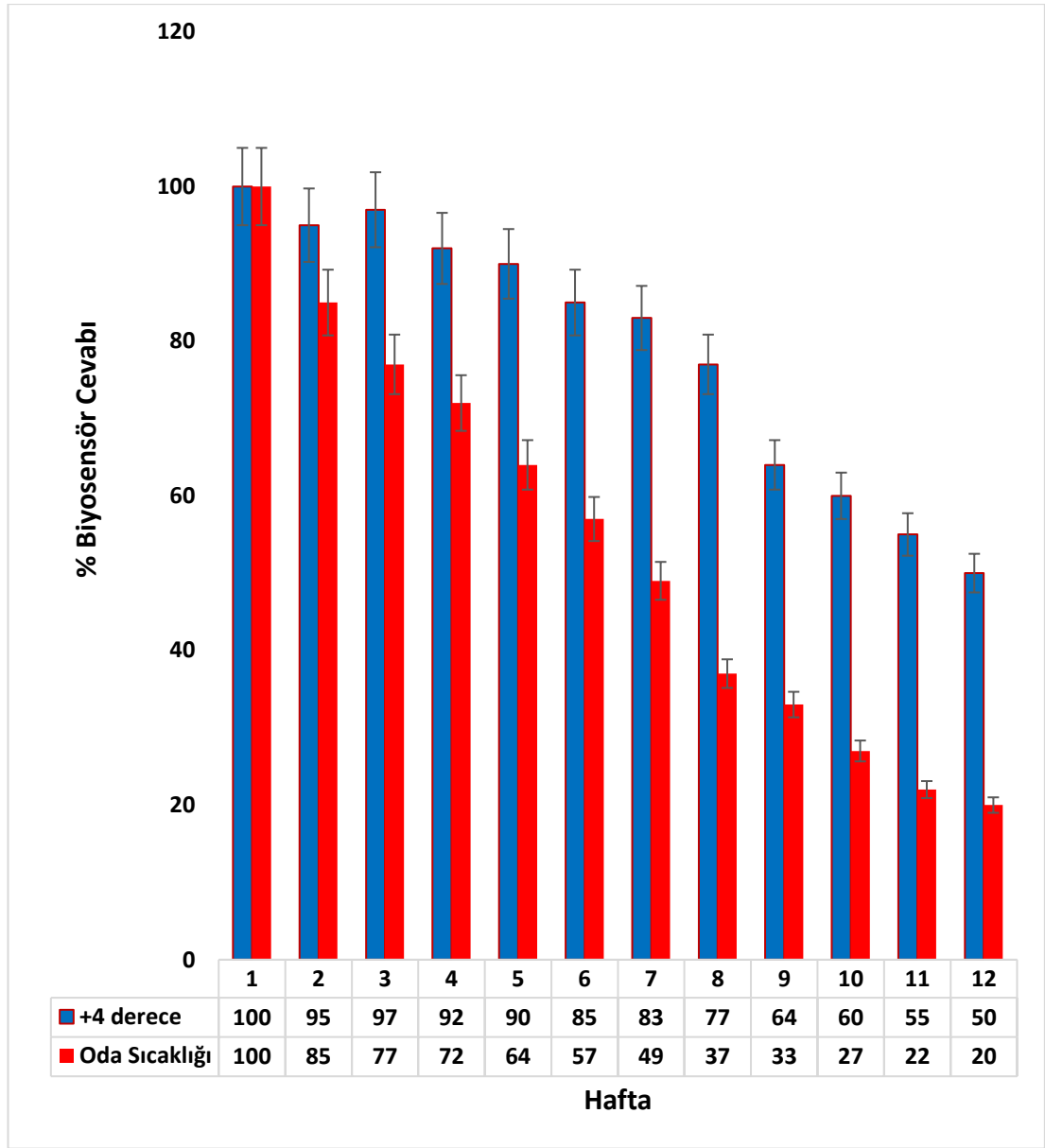
Şekil 60. Sağlıklı ve galaktozemi hastaların eritrosit total galaktoz seviyelerini yansıtan örneklerle ilişkin damlatma yöntemiyle elde edilmiş amperometrik cevaplar

Tablo 15. Galaktozemili kişilerin eritrosit hemolizat total galaktoz düzeylerini yansıtan örneklere ilişkin sonuçlar

Hasta	Eritrotsit total galaktoz (mM)
Hasta 1	0,0596
Hasta 2	0,0962
Hasta 3	0,0972
Hasta 4	0,1766
Hasta 5	0,424
Hasta 6	0,438
Hasta 7	0,456
Hasta 8	0,866
Hasta 9	1,1576
Hasta 10	1,1714

4.2.10. Total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular

Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığını test etmek amacıyla yapılan bu denemede 1 mM Gal-1-P için ölçümler alınmıştır. 2 elektrot hazırlanırken elektrotların biri kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de saklanmış, diğeri ise oda sıcaklığında saklanmıştır. Elde edilen cevaplar Şekil 61’de verilmiştir. Buna göre serbest galaktoz biyosensörün benzer sonuçlar elde edilmekle birlikte +4 °C’de bekletildiğinde 12 hafta sonunda %50 aktivite kaybı gözlenirken, oda sıcaklığında saklandığında 7 hafta sonunda %50 aktivite kaybı gözlenmiştir



Şekil 61. Total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular

5. Tartışma

Galaktoz normalde üç enzimin koordineli aktiviteleri yoluyla glikoza metabolize edilir: galaktokinaz (GALK), galaktoz-1-fosfat uridil transferaz (GALT) ve üridin difosfoglukoz 4-epimeraz (GALE) (Anderson, 2018). Yüksek konsantrasyonlarda galaktoz ve metabolitleri memeliler için toksiktir (Anderson, 2018). Galaktokinaz ve GALT'ın ve belki de nadiren epimerazın kalıtsal eksiklikleri, galaktoz içermeyen bir diyetin erken tanınması ve kurumuyla önlenebilecek klinik bozukluklara neden olur (Beutler, 1991). Galaktozun plazma/serum değerleri, sağlıklı kişilerde maksimum $< 0,28$ mM ve 5 günden daha küçük yenidoğanlarda $< 1,11$ mM'de seviyesinde bulunur (Connell, 2012). Yenidoğan bebeklerde $1,11$ mM'dan yüksek galaktoz seviyeleri ölümcül olabilir (Adam et al., 2015; Beutler, 1991). Galaktozemi galaktoz metabolizmasındaki enzimlerden birinin eksikliği durumunda ortaya çıkan kalıtsal bir metabolik bozukluk olup galaktoz birikimi ile karakterizedir (Anderson, 2018; Beutler, 1991). Yenidoğan döneminde teşhis edilmeyen ve dolayısıyla tedavi edilmeyen hastalarda yetersiz beslenme, gelişememe, sarılık, karaciğer hastalığı, katarakt, E. coli sepsisi ve yenidoğan ölümü gerçekleşebilir (Adam et al., 2015; Vaca et al., 1978). Galaktozeminin tedavisi, süt ve süt ürünlerini içeren diyet galaktozunun kısıtlanmasını içerir (Beutler, 1991; Connell, 2012).

Galaktoz seviyesinin ölçümü, galaktozemi ve galaktoz intoleransı açısından klinik önem taşır. Özellikle yenidoğanlarda erken tanı konulamaması ağır klinik hatta ölümcül sonuçlar doğurabilir. Teşhis konduktan sonra da galaktozun diyetten çıkarılması gerekir. Dolayısıyla bu parametrelerin kanda tayini büyük önem taşır. Bu projenin amacını da serbest ve total galaktoz tayini için hızlı, spesifik, ucuz elektrokimyasal bir biyosensör sistemi geliştirilmesi oluşturmaktadır.

Galaktoz tayini için önceki yöntemler arasında kolorimetri (M. Il Kim et al., 2012), kütle spektrometri (Y. Li et al., 2011), ince tabaka kromatografisi (Pruden et al., 1975) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Gross & Acosta, 1991; Hu et al., 1995) bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler maliyetli, zaman alıcıdır ve yüksek girişim etkisi ile (özellikle kolorimetrik yöntem için) yeterince spesifik değildir, bu nedenle bu sorunların üstesinden gelmek için galaktoz tayini için yapılan

biyosensörler diğer analitler için olduğu gibi galaktoz tayini için de büyük ilgi çekmektedir. Bir biyosensör, bir biyolojik algılama elemanını bir dönüştürücü ile birleştirerek analit konsantrasyonu ile orantılı bir sinyal üretir (*Introduction to Biosensors*, n.d.; Nikolelis & Nikoleli, 2018). Biyosensörlerin kullanımı sadece laboratuvar da değil ev, sokak, arazi, hastane hemen her yerdedir. Glukoz oksidazın kullanıldığı glukoz biyosensörleri ilk ticarileşen türleri olmakla birlikte bugün birçok analit için ticarileşen biyosensör vardır. Bütün bu biyosensörlerin ortak noktası öncelikle laboratuvar da oluşturulan yöntem çalışmalarıyla başlamasıdır. Sonra optimizasyon çalışmaları yapılır, yöntemin doğruluğu, kesinliği, girişim etkisi ve stabilitesi belirlendikten sonra piyasanın da o analit için talebi doğrultusunda ticarileşir. Biyosensörler sayesinde bir hasta bir damla kan alabilir ve analit konsantrasyonunu bir dakikadan daha kısa sürede okuyabilir. Biyosensörler sadece analitleri tanımlamak ve ölçmek için değil, aynı zamanda çok düşük bir konsantrasyonda bile kompleks bileşiklerde bulunan spesifik moleküllerin taranmasında da kullanılabilir. Bu özellik, analitik araştırma, gıda ve kimya endüstrileri, kirlilik kontrolü , süreç izleme ve klinik tanı alanlarında faydalarını sağlamıştır (Farré & Barceló, 2007; *Introduction to Biosensors*, n.d.; Scheller et al., 1985).

Amperometrik enzim biyosensörlerinin geliştirilmesinde en çok kullanılan konfigürasyon, bir oksidaz enziminin kullanımını içeren konfigürasyondur. Bu enzim sınıfı, substratı oksitler ve daha sonra elektronları moleküler oksijene aktardıktan sonra orijinal aktif durumlarına geri dönerek hareket eder, böylece bu enzimatik reaksiyonun son ürünleri, substratın oksitlenmiş formu ve bir yan ürün olarak hidrojen peroksit olur. Oksijen tüketimi (Mulchandani, 1998) veya peroksit (Guilbault & Lubrano, 1973; Updike & Hicks, 1967) oluşumu izlenerek substratın konsantrasyonu bulunabilir. Son yıllarda hidrojen peroksit ölçümüne dayalı yöntemler, oksijenin indirgenmesine dayalı yöntemlere göre büyük ölçüde tercih edilmiştir. Bununla birlikte, bu yaklaşımdaki büyük bir dezavantaj, genellikle mevcut olan birçok elektroaktif maddenin (yani askorbik asit, ürik asit, vb.) gerçek örneklerde, oksitlenerek girişim sinyalleri verebilmeleridir.

Screen printed elektrotlar (SPE'ler), serigrafi teknolojisine dayalı tek kullanımlık sensörlerdir. Bu elektrotların başlıca avantajları, operasyon basitliği, güvenilirliği, taşınabilirliği, referans, çalışma ve yardımcı elektrotları içeren küçük enstrümantal kurulumları ve düşük maliyetleridir. Ayrıca, elektrot yüzeyinin kirlenmesi tek kullanımlık özellikteki biyosensörlerin tekrar tekrar kullanılmalarını engellerken bu yöntemde aynı elektrot yüzeyi ardışık analizler için güvenle kullanılabilir. SPE'lerin, çeşitli kökenlerden birkaç numunenin doğrudan ve güvenilir analizi için diğer katı elektrotlara kıyasla çok faydalı oldukları da kanıtlanmıştır (Lucarelli et al., 2002; Smart et al., 2020). Ardışık kullanımdan sonra sonuçların tekrarlanabilirliği, SPE'lerin göze çarpan bir özelliği olarak kabul edilir.

Bu tez çalışması kapsamında yapılması amaçlanan serbest ve total galaktoz (galaktoz + galaktoz-1-fosfat) tayinidir. Literatür verilerine bakıldığında zaman galaktoz için geliştirilen biyosensörler serbest galaktozu hedeflemektedir. Ancak özellikle galaktozemi tanısı ve tedavisinin izlenmesinde total galaktoz tayini daha değerlidir. Total galaktoz tanımı serbest ve fosfatlanmış galaktozu (galaktoz-1-fosfat) içermektedir. Bu tez çalışmasında iki tip galaktoz biyosensörü geliştirilmesi hedeflenmiştir. Birincisi plazma galaktoz seviyelerini ölçen serbest galaktoz biyosensörü iken diğeri eritrosit Gal-1-fosfat seviyesini de ölçen total galaktoz biyosensörüdür.

İmmobilizasyon konfigürasyonunun belirlenmesine ilişkin bulgularla ilgili tartışma

Polikatyonik bir immobilizasyon matriksi olan kitosan ile polianyonik bir bileşen olan nasyon arasındaki elektrostatik çekim kuvvetleri ile enzimin biyosensör yüzeyine katman-katman (layer by layer) yöntemiyle tutundurulması immobilizasyondaki ana stratejidir. İmmobilizasyon konfigürasyonuna ait bulgular incelendiğinde (bkz. Bölüm 4.1.4) iki nokta göze çarpacaktır: birincisi 2 katmanlı konfigürasyonlarda tek katmanlı olanlara ve kitosan ile başlanan tabakalaşmada nasyon ile başlananlara göre daha hassas cevaplar elde edilmiştir. Elektrotlar oluşturulduktan sonra 10 dakika tamponlu ortama daldırılmış ve manyetik karıştırıcı eşliğinde karıştırılmıştır. Böylelikle yüzeye zayıf bağlanan bileşenlerin yüzeyden

uzaklaşması ve daha tekrarlanabilir ölçümlerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Tek tabakalı olanlarda 2 katmanlı olanlara göre daha düşük cevaplar elde edilmesinin nedeni iki katmanlılarda elektrostatik çekimin daha fazla olması olabilir. Kitosanla başlanan katmanlaşmada daha hassas cevaplar elde edilmesinin nedeni ise kitosanın yapışkan, adsorptif yapısının enzimi daha kuvvetli bağlaması olabilir.

Kitosan miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgularla ilgili tartışma

Literatürde iyi bilindiği ve rapor edildiği gibi , CHIT'ın doğal mikrometrik gözenekli yapısı, sensörlerin yüzey alanını ve buna karşılık gelen yükleme kapasitesini artırabilir, böylece sinyalin yükseltilmesine katkıda bulunabilir (Shukla et al., 2013). Ayrıca, nispeten küçük molekülleri tespit ederken, CHIT gözenekli yapıları, elektrot yüzeyine analit difüzyonu üzerinde minimal bir etkiye sahiptir. Son olarak, CHIT toksik değildir ve çevre dostudur, biyolojik olarak parçalanabilen ve yenilenebilir ham bir malzemedir (Suginta et al., 2013). Algılayıcı malzeme bileşeni olarak toksik olmaması önemlidir, çünkü düşük immünojenite üretir, numuneler ve sensör malzemeleri arasındaki uyumsuzluk nedeniyle yanlış tepkileri önler ve/veya en aza indirir. Yaygın doğal polimerler arasında kitosan, iyi mekanik mukavemet, hidrofilik, kolay işlenebilirlik ve biyouyumluluğun kimyasal avantajları, biyo-çevrede stabilite ve kimyasal modifikasyon yeteneği gibi fiziksel avantajlara sahiptir (Jiang & Wu, 2019). Her türlü biyosensörü desteklemek için evrensel bir substrat bulmak mümkün olmamakla birlikte, kitosan biyolojik/kimyasal bağlanma için bol yanal fonksiyonel grupları nedeniyle biyosensör tasarımı için uygun bir substrat materyali olarak en üst sıralarda yer almaktadır.

Sahip olduğu doğal mikrometrik gözenekli yapısı, sensörlerin yüzey alanını arttırması, non-toksik olması, enzimler için doğal bir ortam sağlaması gibi özelliklerinden dolayı biyosensör oluşturulmasında en fazla kullanılan immobilizasyon bileşenlerinin başında kitosan gelmektedir. Bu tez çalışmasında ana immobilizasyon bileşenlerinden biri olan kitosanın optimizasyonu biyosensörün performansı için büyük önem arz etmektedir. Tablo 3 ve Şekil 24'te gösterildiği üzere en hassas ve kesin biyosensör cevapları %0,1'lik kitosanla alınmıştır. Dikkat edilirse biyosensör cevabı kitosanın konsantrasyonu %0,05'ten %0,1'e çıkarıldığında

artmış, sonrasında ise kademeli olarak azalmıştır. Aslında %1'lik kitosanın kullanıldığı elektrotta hazırlanmış fakat elektrot yapısı çok kısa bir süre sonra biyoaktif tabakanın komple elektrottan kıvrılarak ayrılması sonucu bozulmuştur. Kitosan konsantrasyonu arttıkça biyosensör cevabının azalmasının nedeni sık gözenekli kitosan yapısının enzimin substratla reaksiyona girmesini engellemesi olabilir. Literatür verilerine bakıldığında kitosanın sıklıkla kullanıldığı konsantrasyonların %0,05-0,2 arası olduğu dikkati çekmektedir (Batra et al., 2013; Cui et al., 2019; Narwal et al., 2018; Wu et al., 2009; Xiang et al., 2016). Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensörle de aynı aralıkta maksimum cevaplar alınırken optimum kitosan miktarı %0,1 olarak seçilmiştir.

Nafyon miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Nafyon sahip olduğu adhezif, biyouyumlu ve yarı-geçirgen özellikleri ile biyosensör yapımında sıklıkla kullanılan bir immobilizasyon matriksidir. Bu çalışmada nafyonun kullanılma amacı kitosan ile oluşturdukları elektrostatik çekim kuvvetleri vasıtasıyla enzimleri elektrot yüzeyine tutundurmadır. Bu amaçla nafyon konsantrasyonunun optimizasyonu yapılmış ve optimum nafyon miktarı %0,1 olarak bulunmuştur. Şekil 25 incelendiğinde nafyon konsantrasyonu %0,05'ten %0,1'e çıkarıldığında biyosensör cevabının arttığı, sonrasında ise kademeli olarak düştüğü göze çarpmaktadır. Bu anlamda kitosan ile benzer sonuçlar vermiştir. Her ne kadar iletken bir polimer olsa da nafyon konsantrasyonunun artması katmanların daha sıkı ve yoğun olmasına neden olmuştur. Bu durum da substrat-enzim etkileşimine bir bariyer oluşturmuş olabilir.

Damlatma hacminin optimizasyonuna ilişkin bulgularla ilgili tartışma

İmmobilizasyon bileşenlerinin elektrot yüzeyine damlatma hacminin biyosensör cevabına etkisini incelemek ve optimum damlatma hacmini bulmak amacıyla 2,5-5-7,5-10 μL hacimler denenmiştir. Tablo 5 ve Şekil 26'te gösterilen sonuçlara göre elektrot yüzeyine damlatma hacimleri 2,5 μL 'den 5 μL 'ye çıktığında biyosensör cevabı da artmıştır. 5 μL 'lik damlatma hacminden daha büyük hacimlerde ise biyosensör duyarlılığında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Çalışma elektrodunun yüzey alanı 2,5 μL 'lik damlatma hacmiyle tamamen kaplanmazken 5 μL 'de

tamamen kaplanmaktaydı. 7,5 ve 10 μ L hacimlerde ise bir miktar sıvı çalışma elektrodunun yüzey alanının dışına taşmaktaydı. Elde edilen cevaplar da göstermektedir ki 5 μ L'lik damlatma hacmi çalışma elektrodu için yeterli gelmekte fazlası ise çalışma elektrodunun yüzey alanını aştığı için biyosensör duyarlılığını arttırmamıştır. Aynı elektrotla yapılan çalışmalarda damlatma hacmi için bir optimizasyon çalışması yapılmamıştır. Heo ve ark. (Heo et al., 2022) 7 uL, Marzo ve ark. (López-Marzo & Baldrich, 2019) 10 uL, Zhybak ve ark. (Zhybak et al., 2016) 2 uL, Harrad ve ark. (El Harrad & Amine, 2016) ise 5 μ L damlatma hacmini kullanmıştır.

GNP'nin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgularla ilgili tartışma

Özellikle son 20 yılda yapılan çalışmalar gösterdi ki altın nanopartiküller (GNP) benzersiz elektronik, optik ve katalitik özellikleri ile birçok alanda olduğu gibi elektrokimyasal sensörler alanında da büyük ilgi görmüştür. GNP'lerin iletkenlik özelliğinin yanı sıra son derece yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması, adsorbe edilen türlerin fazla ve kuvvetli bağlanmasını sağlayarak mükemmel hassasiyet ve seçicilikte ölçüm yapılmasına olanak sağlamıştır. Nitekim Şekil 15'te GNP'nin immobilizasyon yöntemine dahil edilmesi ile daha fazla enzimin yüzeye bağlanmasından dolayı redoks pikleri düşmüştür. Şekil 16'da enzimsiz GNP'li ve GNP'siz elektrotlar karşılaştırılıp biyosensörün yüzey alanı hesaplanmış ve GNP'nin yüzey alanını %26 oranında arttırdığı gösterilmiştir. GNP'nin biyosensör cevabına etkisi ise Şekil 27-29'de gösterilmiştir. GNP ilavesi biyosensör cevabını yaklaşık 1,5 kat arttırmıştır ki bu da GNP'nin sahip olduğu özelliklerden dolayı beklenen bir durumdur.

Galaktoz oksidaz konsantrasyonunun optimizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Galaktoz oksidaz D-galaktoz, dihidroksiaseton (DHA) gibi bir dizi birincil alkol substratının D-izomerlerinin ve indirgeme uçlarında D-galaktozlu polisakkaritlerin stereospesifik oksidasyonunu katalize eden oksidoredüktaz sınıf bir enzimdir. Bu tez çalışmasında da galaktozun kantitatif ölçümünden birinci derece sorumlu olan component GaOX'dur. Dolayısıyla GaOX miktarının optimizasyonu biyosensörün

performansı için büyük önem taşımaktadır. GaOX miktarı ile ilgili sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 30'da verilmiştir. Genellikle enzim temelli biyosensörlerde enzim miktarı arttıkça biyosensörün duyarlılığı bir yere kadar artar sonrasında elektrot yüzeyinde yarattığı difüzyon bariyerinden dolayı biyosensör cevabı sabit kalır ya da düşer (Odaci et al., 2008; Ö. Yılmaz et al., 2012; Y. Y. Yılmaz et al., 2020). Elde ettiğimiz sonuçlar da bunu göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde başlangıçta enzim miktarı arttıkça biyosensör cevabı da dramatik olarak arttığı görülecektir. 10 ve 20 mg/mL GaOX kullanılan biyosensörlerde en hassas biyosensör cevapları elde edilirken iki konsantrasyon ile elde edilen cevaplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Bu tez çalışmasında kullanılan GaOX'un aktivitesi 3 U/mg iken, elektrot yüzeyinde 0,3 U'tür.

Serbest galaktoz biyosensörünün pH optimizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Bilindiği gibi enzim aktivitesi ortam pH'ına bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle pH optimizasyonu biyosensör performansı için önemli bir parametredir. Şekil 31 incelendiğinde görülecektir ki geliştirilen serbest galaktoz biyosensörü pH 5'in altında aktivite göstermezken pH 6'dan itibaren artmaya başlamış ve pH:7,5'ta maksimuma ulaşırken, pH:8'de de %95 aktivite göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan GaOX'un kaynağı *Dactylium dendroides*'dir. Elde edilen bu sonuçlar literatürle uyumludur (Paukner et al., 2015). Bu da immobilizasyon yönteminin enzimin optimum pH'sını değiştirmedeğini göstermektedir.

Serbest galaktoz biyosensörünün sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Özellikle enzim temelli biyosensörler için bir başka önemli parametre sıcaklığın biyosensör cevabına etkisidir. Şekil 32'de gösterildiği üzere sıcaklık 15 °C 'den 25 °C 'ye arttığında biyosensör cevabı da dramatik olarak artmış ve burada bir tepe noktasına ulaşmıştır. 35 °C'den sonra ise biyosensör yanıtı gittikçe düşmüştür. Paukner ve arkadaşlarının *Dactylium dendroides*'den izole ettikleri GaOX için bulunduğu optimum sıcaklık 35 °C'dir. 30 °C'de 'de 24 saat stabil olan enzimin aktivitesi 40 °C'de 11,2 dakikada yarılanırken 60 °C'de 2,7 dakikada yarılanmaktadır

(Paukner et al., 2015). Bu tez çalışmasında geliştirilen immobilizasyon yönteminin GaOX'un optimum sıcaklığını biraz düşürdüğü bulunmuştur. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlerden biraz farklı optimum sıcaklık ve pH'a sahip olması beklenen bir durumdur. Enzimin yüksek sıcaklıklardaki işlem kararlılığının düşük olması nedeniyle de optimum sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiştir. Böylelikle geliştirilen biyosensörle oda sıcaklıklarında ölçüm yapmak mümkündür. Bu da biyosensör kullanımını oldukça pratik hale getirmektedir.

Serbest galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Bir biyosensörün başarı ölçütlerinden en önemlisi biyosensörün doğrusal tayin aralığının hedef matrikstekki hedef analitin konsantrasyonunu kapsamasıdır. Bu tez çalışmasının amacı galaktozemi tanısı ve tedavisinin izlenmesine yardımcı olabilecek bir biyosensör geliştirmek olduğuna göre geliştirilen biyosensörün plazma/serum galaktoz seviyesini ölçebilmesi önemlidir. Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 0,025-10 mM olarak bulunmuştur. Literatür verilerine bakıldığında plazma galaktoz seviyeleri yeni doğanlarda 0,264 mM altı normal olarak kabul edilirken 15 günden büyük bebekler ve yetişkinler için 0,11 mM'ın altı normal olarak kabul edilmektedir (Berry, 2021). Karıştırmalı yöntemde örnek 10 kat, damlatmalı yöntemde ise 2 kat seyrelir. Bu durum karıştırmalı yöntemde kantitasyon yapılabilmesi için minimum plazma konsantrasyonunun 0,25 mM, damlatmalı yöntem için ise 0,05 mM olmasını gerektirir. Bu nedenle sağlıklı örnek ölçümlerini de içerebilmesi açısından damlatmalı yöntemin kullanılması daha doğrudur. Galaktozemi hastalarının plazma galaktoz seviyeleri ise 0,55 mM'ın üzerinde olmakla birlikte 6 mM seviyelerine kadar çıkabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün tayin aralığı hastaların plazma galaktoz seviyelerini kapsarken sağlıklıların da önemli kısmını kapsamaktadır.

Serbest galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Biyoanalitik yöntemlerde tekrarlanabilirlik denemeleri yöntemin kesinliğini belirlemek için yapılır. EMA'nın biyoanalitik yöntem validasyon rehberinde kabul

edilebilir oran %15'in altıdır (European Medicines Agency & Ema, 2012). Bu çalışmada geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün hem gün içi, hem günler arası tekrarlanabilirliği Tablo 7'de gösterildiği gibi kabul edilir düzeyde, %15'in altındadır.

Tekrar üretilebilirlik biyosensörün farklı elektrotlarla hazırlanıp aynı konsantrasyonlar için aynı cevabı verebilmesinin bir ölçüsüdür. Tekrarlanabilirlik gibi yöntemin kesinliğini gösterir. Bu çalışmada geliştirilen serbest galaktoz biyosensörün 6 elektrot için tekrar üretilebilirliği için hesaplanan %VK değeri 7,78 olarak bulunmuştur. Bu değerde kabul edilebilir limitler içerisindedir.

Serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı ve girişim etkisine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliğı ile ilgili bulgular Şekil 39 ve 40'da verilmiştir. Buna göre biyosensör galaktoz içermeyen şekerlere yanıt vermezken galaktoz içeren laktoz ve galaktoz-1-fosfata, galaktoza verdiği yanıtın %10'u kadar cevap vermiştir. Galaktoz oksidazın D-galaktoz, ve indirgeme uçlarında D-galaktozlu polisakkaritlerin stereospesifik oksidasyonunu katalize eden oksidoredüktaz sınıf bir enzim olduğu düşünüldüğünde yapısında galaktoz içeren analitlere cevap vermesi normal kabul edilmektedir (Paukner et al., 2015).

Girişim etkisi denemesinde plazmada bulunan ve galaktoz ölçümüne girişim etkisi yapabilecek türlerin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada PB'nun kullanılma amacı enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 'i daha düşük potansiyellerde saptayarak ürik asit, askorbik asit gibi elektroaktif türlerin girişim etkisini minimize etmektir. Nitekim -0,05 V'ta fizyolojik konsantrasyonlardaki ürik asit, kreatin, kreatinin, glukoz gibi analitlerin girişim etkisi gözlenmezken, askorbik asitin biyosensör yanıtına %10 oranında girişim yaptığı saptanmıştır. Fakat askorbik asit stabil olmayan bir moleküldür ve kolaylıkla okside olabildiğinden çoğunlukla plazmadaki seviyesi çok daha düşüktür. Zaten mevcut glukometrelerde askorbik asit varlığı ölçümü etkileyebilse de bu ihmal edilebilir düzeydedir.

Serbest galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması ve geri eldesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün doğru ölçüm yapıp yapmadığının test edilmesi amacıyla sağlıklı kontrollerden elde edilen plazma havuzuna 3 seviye için standart katma yapılmış ve % geri eldesi hesaplanarak biyosensörün doğru ölçüm yapıp yapmadığı test edilmiştir. Biyoanalitik yöntem rehberleri geri elde için bir kabul kriteri belirtmemişlerdir. Fakat ölçümün tekrarlanabilir olması (%VK'sının %15'in altında olması) ve % geri eldenin %100' e yakın olması istenir. Bu kriterler çerçevesinde Tablo 11'e bakıldığında her üç seviye için % geri elde % 90'ın üzerinde % VK ise %5 ve altındadır. Bu anlamda geliştirilen serbest galaktoz biyosensörü biyoanalitik yöntem validasyon kriterlerini karşılamaktadır.

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün pratik kullanımının test edilmesi ve başka bir yöntemle karşılaştırılması için 11 (10 yapay +1 gerçek) hasta 10 sağlıklı düzeyi galaktoz içeren plazmalarda serbest galaktoz düzeylerine bakılmış ve sonuçlar Şekil 42 ve Şekil 43'de gösterilmiştir. Şekil 42 ölçüme ilişkin damlatma yöntemiyle elde edilmiş amperometrik cevapları Şekil 43 ise bu sonuçlarla birlikte kolorimetrik sonuçları da içeren korelasyon grafiğini göstermektedir. Şekil 42 incelendiğinde hasta ve sağlıklıların plazmalarındaki galaktoza yönelik biyosensör cevaplarının belirgin şekilde farklı olduğu görülecektir ($p < 0,0001$). Elde edilen bu sonuç geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün hasta ve sağlıklıları kolaylıkla ayırt edebildiğini göstermektedir.

Serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün depo kararlılığı biri +4 °C diğeri oda sıcaklığı olmak üzere iki sıcaklıkta denenmiştir. Şekil 44'te yer alan sonuçlara göre biyosensör ilk 6 haftanın sonunda bile %93 oranında aktivitesini korurken bu süre oda sıcaklığında 2 haftadır. Elde edilen sonuçlar immobilizasyon yönteminin enzim için korunaklı bir yapı oluşturduğunu ve biyosensörün ömrünü uzattığını göstermektedir.

Alkalen fosfatazın optimizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Total galaktoz biyosensörünün serbest galaktoz biyosensöründen farkı yüzeye ekstradan immobilize edilen ALP'dir. Dolayısıyla total galaktoz biyosensörü yani Gal-1-P'ı ölçecek bu biyosensörde en önemli optimizasyon ALP miktarının optimizasyonudur. Değişen miktarlarda ALP içeren biyosensörler karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 11 ve Şekil 49'de verilmiştir. ALP miktarının 5 mg/mL olarak kullanıldığı biyosensörde en hassas cevaplar elde edilirken sonrasında ise difüzyon bariyeri etkisinden dolayı biyosensör cevabı düşmüştür. Biyosensör yüzeyinde kullanılan ALP sıgır bağırsak mukozasından elde edilen ve aktivitesi 10 U/mg olan bir enzimdir. Dolayısıyla elektrot yüzeyindeki ALP yaklaşık 1 U'tir. GaOX ise yaklaşık 0,3 U'ti. ALP'nin aktivitesinin yüksek olması biyosensör cevabının hızlı olmasını da sağlar. Çünkü biyosensörün cevap verebilmesi için önce Gal-1-P'ın hidroliz olarak serbest galaktoza dönüşmesi gerekir. ALP da bunu yaptığından aktivitesinin GaOX'dan yüksek olması biyosensör hızını arttırmıştır.

Total galaktoz biyosensörünün pH ve sıcaklık optimizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Serbest galaktoz biyosensöründe biyoaktif komponent tekti ve o da galaktoz oksidazdı. Fakat total galaktoz biyosensöründe yüzeye bir de ALP ilave edildi. Bu nedenle total galaktoz biyosensörünün optimum pH ve sıcaklığı her iki enzimin birarada çalışabileceği optimum koşullar olacaktır. Total galaktoz biyosensörünün optimum pH'ına ilişkin grafik Şekil 50'de optimum sıcaklığına ilişkin grafik ise Şekil 51'de verilmiştir. Elde edilen bulgular pH 7'den 8'e çıktığında, total galaktoz biyosensörünün biyosensör cevabının, arttığını sonrasında ise kademeli olarak düştüğünü göstermektedir. Alkalen fosfatazın en kararlı olduğu pH aralığı 7,5-9,5 arası olup optimum pH'ı 8-10 arasındadır. Optimum pH substrata, iyonik konsantrasyona immobilizasyona göre değişebilmektedir (Hoylaerts et al., 1997; Millán, 2006b; *Phosphatase, Alkaline Main = 2,000DEA Units/Mg Protein 9001-78-9*, n.d.). Alkalen fosfatazın maksimum aktivite gösterebilmesi için çalışma tamponun 1-5 mM MgCl₂ içermesi gerekmektedir. Bu nedenle total galaktoz biyosensörünün çalışma tamponuna (ki bu da Tris-HCl'dir) 1 mM MgCl₂ ilave edilmiştir. Bu

çalışmada geliştirilen total galaktoz biyosensörünün optimum pH'ının 8 olarak bulunması literatürle uyumludur ve immobilizasyon yönteminin çalışmada kullanılan enzimlerin optimum pH'larını değiştirmedeği tespit edilmiştir.

Literatür verilerinde ALP'in optimum sıcaklığı ile ilgili direk bir bilgi olmamakla birlikte bu ALP'in aktivitesinin substrata, immobilizasyon yöntemine ve ortama göre değişmesinden kaynaklanmaktadır. Yapmış olduğumuz optimum sıcaklık denemesinde total galaktoz biyosensörünün aktivitesinin 15 °C 'den 30 °C 'ye kadar arttığını sonrasında ise düştüğünü göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada geliştirilen total galaktoz biyosensörü için optimum çalışma sıcaklığı 30 °C olarak seçilmiştir.

Total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı ile ilgili tartışma

Bu tez çalışmasında geliştirilen total galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 0,1-10 mM arası olarak bulunmuştur. Total galaktoz biyosensörünün hedef matriksi eritrosit hemolizatu hedef analiti de Gal-1-P'dir. Klasik galaktozemide eritrosit Gal-1-P seviyeleri genellikle 0,385 mM'ın üstünde olmakla birlikte 5 mM seviyelerine kadar çıkabilmektedir (Berry, 2021). Sağlıklılar için ise bu değer 0,0385 mM'ın altındadır. Damlatmalı yöntemle örneklerin 2 kat seyreltiği düşünülürse biyosensörün ölçebileceği minimum Gal-1-P konsantrasyonu 0,2 mM olmalıdır. Hastaların eritrosit Gal-1-P seviyelerinin 0,385 mM'ın üstünde olduğu düşünüldüğünde geliştirilen biyosensör klasik galaktozemili hastaların eritrosit Gal-1-P seviyelerini takip etmeye uygundur. Ancak sağlıklıların Gal-1-P seviyelerini ölçmek için uygun değildir.

Total galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği ile ilgili tartışma

Biyoanalitik yöntemlerde tekrarlanabilirlik denemeleri yöntemin kesinliğini belirlemek için yapılır. EMA'nın biyoanalitik yöntem validasyon rehberinde kabul edilebilir oran %15'in altıdır (European Medicines Agency & Ema, 2012). Bu çalışmada geliştirilen total galaktoz biyosensörünün hem gün içi hem günler arası

tekrarlanabilirlik Tablo 12’de gösterildiği üzere %15’in altında, kabul edilir düzeydedir.

Bu çalışmada geliştirilen total galaktoz biyosensöründe 6 elektrotun tekrar üretilebilirliği için hesaplanan %VK değeri 8,75 olarak bulunmuştur. Bu değer de kabul edilebilir limitlerdir.

Total galaktoz biyosensörünün substrat spesifikliği ile ilgili tartışma

Geliştirilen total galaktoz biyosensöründe serbest galaktoz biyosensöründen farklı olarak denenen analitler eritrosit GALT enzim aktivite tayininde ortama eklenen ya da ortamda bulunan analitlerdir. Bunlar UDP-glukoz, UDP-galaktoz, glukoz-6-fosfat’tır. Substrat spesifikliği ile ilgili sonuçlar Şekil 58 ve 59’da verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre total galaktoz biyosensörü yalnızca galaktoz içeren analitlere cevap vermiştir. Galaktoza verilen cevap %100 olarak kabul edilirse, Gal-1-P’a verilen cevap bunun %30’u kadardır. GaOX aslında tek başına da Gal-1-P’a cevap verse de bu cevap %10 seviyesindedir. Dolayısıyla ALP kullanılması biyosensörün Gal-1-P için cevabını yaklaşık 3 kat arttırmıştır.

Total Galaktoz biyosensörünün örnek uygulaması ve geri eldesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün Tablo 14’te gösterilen % geri elde değerleri serbest galaktoz biyosensöründe olduğu gibi %100’e yakındır ve tekrarlanabilir.

Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün hasta ve sağlıklı düzeylerini içerecek şekilde hazırlanan hemolizatlardaki Gal-1-P’a ilişkin amperometrik cevaplar Şekil 60’da, buradan hesaplanan Gal-1-P değerleri ise Tablo 15’de verilmiştir. Şekil 60 incelendiğinde görülecektir ki sağlıklı seviyeleri için elde edilen amperometrik cevaplar baseline ile üst üste çakışmıştır ve bu anlamda kantitasyon limitlerinin altında kalmaktadır. Hasta seviyeleri için elde edilen amperometrik cevaplar ise sağlıklılardan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır.

Total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma

Geliştirilen total galaktoz biyosensörünün depo kararlılığı biri +4 °C diğeri oda sıcaklığı olmak üzere iki sıcaklıkta denenmiştir. Şekil 61’da yer alan sonuçlara göre biyosensör ilk 5 haftanın sonunda bile %90 oranında aktivitesini korurken %50 aktivitesini 12 haftada kaybetmektedir. Oda sıcaklığında ise biyosensör 2 haftanın sonunda %85 aktivite gösterirken 7 hafta sonunda aktivitesi %50’nin altına düşmektedir. Elde edilen sonuçlar serbest galaktoz biyosensöründe olduğu gibi immobilizasyon yönteminin enzim için korunaklı bir yapı oluşturduğunu ve biyosensörün ömrünü uzattığını göstermektedir.

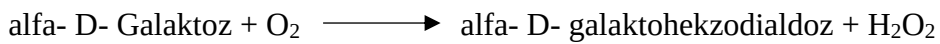
Literatürdeki galaktoz biyosensörleri ile karşılaştırılma

Galaktozun kantitatif tayini klinik kimya, gıda ve fermantasyon endüstrisi için büyük önem taşır. Galaktoz tayininde 2 analitik yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi gaz veya likit kromatografi temelli yöntemler, ikincisi ise enzim temelli spektrofotometrik, polarimetrik ve florometrik yöntemlerdir. Bu yöntemler genellikle zaman alıcı, pahalı ekipman ve uzman personel gerektiren yöntemlerdir. Biyosensörlerin kullanıldığı elektrokimyasal yöntemler ise galaktoz analizi için ucuz, pahalı ekipman ve örnek hazırlama aşaması gerektirmeyen, duyarlı ve spesifik yöntemlerdir.

Galaktoz Oksidaz Temelli Biyosensörler

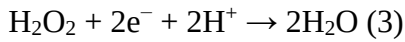
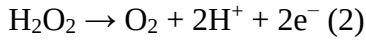
Galaktoz oksidaz (GaOx), aktif merkezinde ikisi tirozine, ikisi histidine biri çözücü molekülü olan suya kovalent bağlı bir bakır içerir (Tkac et al., 2002). GaOx, D-galaktoz, dihidroksiaseton (DHA) gibi bir dizi birincil alkol substratının D-izomerlerinin ve indirgeme uçlarında D-galaktozlu polisakkaritlerin stereospesifik oksidasyonunu katalize eder (Baron et al., 1994). Biyokomponent olarak enzimlerin kullanıldığı biyosensörler seçicilikleri ile ön plana çıkarlar. Bu amaçla galaktoz biyosensörlerinin çoğunda GaOx enzimi kullanılmıştır (Kanyong et al., 2017). GaOx’un katalizlediği reaksiyon eşitlik 1’de gösterilmiştir (Kanyong et al., 2017).

(Eşitlik 1.)



Reaksiyon ürünü olan H₂O₂ elektroaktif bir türdür. Elektrokimyasal GaOx biyosensörlerinin çoğu açığa çıkan H₂O₂'in indirgenmesini veya yükseltgenmesini baz alır. H₂O₂ 'in yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri sırasıyla eşitlik 2 ve 3' te verilmiştir (Kanyong et al., 2017).

Eşitlik 2 ve 3



H₂O₂ 'in yükseltgenme potansiyelinin yüksek olması biyosensörü ürik asit, askorbik asit gibi elektroaktif bileşiklerin girişimine maruz bırakır. Bu nedenle oksidaz temelli biyosensörlerde H₂O₂'i düşük potansiyellerde tayin etmeye olanak tanıyarak girişim etkisini aza indiren redoks mediyatörleri ve katalaz, peroksidaz gibi enzimler sıklıkla kullanılırlar (Arya et al., 2008; Bongiovanni et al., 2001; Evik et al., 2010; Mulchandani, 1998; F. Ricci & Palleschi, 2005a).

Biyolojik sıvılarda kantitatif galaktoz tayini için ilk elektrokimyasal yöntem 1977 yılında Taylor ve meslektaşları tarafından rapor edilmiştir (Taylor et al., 1977). GaOx'u glutaraldehit (Glu) çapraz bağlayan Taylor ve arkadaşları hızlı, hassas ve doğru galaktoz ölçümü yapabilen bir mikro-metot geliştirmiştir. GaOx-Glu karışımı daha sonra bir polikarbonat membran (PC) üzerine dökülmüş ve kurumaya bırakılmıştır. Model 23A glikoz analizörüne entegre edilen bu elektrotla hem plazmada ham de tam kanda galaktoz analizi yapılmıştır. Yöntem 28 mM'a kadar galaktozu tespit edebilirken çalışmada bir tayin limiti belirtilmemiştir. Girişim etkisi denemesinde taranan 39 fizyolojik bileşikten yalnızca gliseronun girişim etkisi saptanmıştır.

Manowitz ve arkadaşları interferans etkisini azaltmak için kompozit polimer tabanlı bir galaktoz biyosensörü geliştirmişlerdir (Manowitz et al., 1995). Geliştirilen biyosensör akış enjeksiyon analizi (FIA) sistemiyle kombine edilmiştir. Plazmada galaktoz tayini yapabilen bu biyosensörün elektrot modifikasyonu ve enzim immobilizasyonu ise şöyledir; üzeri platin kaplanmış karbon elektrodu 1,3-diaminobenzen/rezorsinol monomerlerinin olduğu çözeltiye daldırılır ve

elektropolimerizasyon yöntemiyle polimerizasyon gerçekleştirilir. Ardından elektrot üzerine %1,25'lik glutaraldehit damlatılır ve sonrasında da üzerine GaOX içeren enzim çözeltisinden damlatılır ve elektrot kurumaya bırakılır. Bu işlem bir katman daha oluşturmak üzere tekrarlanır. Manowitz ve arkadaşlarının geliştirdiği bu biyosensör askorbik asit, ürik asit ve parasetamolden gelen girişim etkisini engellemiştir. Geliştirilen biyosensörün doğrusallığı 6 mM'a kadar olduğu bulunurken, tayin limiti 50 μ M olarak bulunmuştur. Oda koşullarında 30 gün boyunca stabil olduğu saptanmıştır.

Dalkıran ve arkadaşlarının geliştirdiği ve çok duvarlı karbon nanotüp ve grafenin iletken özelliğine dayanan biyosensörle girişim etkisi önemli derecede azalmıştır (Dalkıran et al., 2016). Çok duvarlı karbon nanotüp ve grafenin ayrı ayrı denendiği iki tip biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrotlar Co_3O_4 nanopartikül ve kitosan ile modifiye edilmiş ve birinin modifikasyonunda grafen diğerinde ise çok duvarlı karbon nanotüp ayrıca kullanılmıştır. Her iki tip elektrotta da GaOx elektrot yüzeyine glutaraldehit ile immobilize edilmiştir. Çok duvarlı karbon nanotüp ile hazırlanan elektrotların grafenle hazırlananlara göre 1,6 kat daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Söz konusu biyosensör ile serumda galaktoz tayini de yapılmıştır.

Jia ve arkadaşları ince tabaka teknolojisini kullanarak Pt disk elektrodun çalışma elektrodu olarak kullanıldığı bir mikroçip sensör dizayn etmişlerdir (Jia et al., 2003). Öncelikle Pt disk elektrot yüzeyini ince bir film tabaka olacak şekilde nafyon ile kaplamışlardır. Sonrasında ise GaOx'u ilave etmişlerdir. Nafyonun kullanılması askorbik asit, ürik asit gibi negatif yüklü girişimciler başta olmak üzere diğer endojen bileşiklerin girişimini de engellemiştir. Geliştirilen biyosensörün cevap zamanı 40 saniyenin altındadır ve doğrusal tayin aralığı da 0,1-8,0 mM arasındadır. Tekrarlanabilirlik çalışmasında biyosensörün % varyasyon katsayısı %1,7 gibi çok küçük bir değerdir. Bu da biyosensörün ne kadar kesin sonuçlar verdiğini göstermektedir. Geliştirilen bu biyosensörle serumda galaktoz geri elde deneyi yapılmış ve %97-105 arasında bulunmuştur. Bu da geliştirilen biyosensörle rutin analizde galaktoz tayini yapılabileceğini göstermektedir.

Kanyong ve arkadaşları çalışmalarında yeni doğan serumunda saptamak üzere tek kullanımlık bir amperometrik galaktoz biyosensörü geliştirmişlerdir (Kanyong et al., 2013). Screen-printed elektrotların (SPE) kullanıldığı bu çalışmada öncelikle elektrot yüzeyi bir redoks mediyatörü olan kobalt fitalocyaninle (Co-Pc) modifiye edilmiş sonrasında üzeri selüloz asetat (CA) ile kaplanmıştır. GaOx CA üzerine fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Yöntemin prensibi galaktozun GaOx ile oksitlenmesi sonrası açığa çıkan ve küçük bir molekül olan H_2O_2 'in CA membranından geçip Co-Pc ile etkileşime girip yükseltgenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu biyosensörün avantajı CA'nın küçük porlarının büyük moleküllerin geçişine izin vermeyerek yaratacakları girişim etkisini en aza indirmesidir. Ancak askorbik asit, ürik asit ve diğer elektroaktif küçük moleküller CA'yı geçebilir. Kanyong ve arkadaşları buradan gelecek girişim etkisini sıfırlamak için GaOx ile yaklaşık aynı molekül ağırlığına sahip sığır albüminin (BSA) kullanıldığı bir kör elektrot daha yapmışlardır. GaOx ile alınan cevaptan kör elektrodun verdiği cevap çıkarılarak galaktoz tayini yüksek doğrulukla yapılmıştır. Yöntemin tayin aralığı 0,1-25,0 mM arası iken % geri eldesi ise %99'dur.

Bir başka galaktoz biyosensörü Şenel ve arkadaşları tarafından elektrot yüzeyine bir film şeklinde kaplanan poliglisidil metakrilat-ko-vinil ferrosenin amino gruplarına GaOx'un kovalent bağlanması yoluyla oluşturulmuştur (Evik et al., 2010). Aynı zamanda bir mediyatör olan vinil ferrosenin kullanılması H_2O_2 'in düşük potansiyellerde ölçülmesine olanak tanımıştır. Geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığı 2,0-20,0 mM arası, tayin limiti 0,1 mM ve cevap zamanı ise 5 saniye olarak bulunmuştur. Yine aynı grubun galaktoz için geliştirdiği bir başka biyosensörde immobilizasyon elektrot yüzeyine kaplanan poliglisidilpirol-ko-pirol vasıtasıyla gerçekleştirilmiş fakat herhangi bir mediyatör kullanılmamıştır (Şenel et al., 2011). Ölçüm GaOx galaktoz etkileşimi sonucu açığa çıkan H_2O_2 'in direk 0,7 V'ta amperometrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün cevap zamanı 5 saniyeden az tayin aralığı ise 2,0-16,0 mM arasındadır.

Lee ve arkadaşları galaktoz tayinin duyarlılığını arttırmak için galaktoz oksidazı ileten bir polimer olan 3,4-etilendioksitofen (EDOT) ile mikrotübüllerin elektrot yüzeyinde elektropolimerize olmasıyla elde edilen film üzerine kovalent

bağlamışlardır. Film enzim için geniş bir yüzey alanı yaratmıştır. Biyosensörün tayin aralığı 0,1-1,0 mM arası, tayin limiti 10.0 μM , cevap süresi 30-40 saniye ve duyarlılığı ise 6,37 $\mu\text{A.mM}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ olarak bulunmuştur (Lee et al., 2011).

Galaktoz tayinine yönelik geliştirilen biyosensörlerin büyük çoğunluğunda enzim olarak GaOx kullanılmakla beraber literatürde nadir de olsa galaktoz dehidrogenaz temelli galaktoz biyosensörleri de mevcuttur. Bunlardan biri de Maestre ve arkadaşlarının geliştirdikleri galaktoz dehidrogenaz (GADH) temelli galaktoz biyosensörüdür (Maestre et al., 2005). GADH $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ bağımlı ve yalnızca galaktozu değil ayı zamanda diğer şekerleri de katalizleyebilen bir enzimdir. Bu çalışmada grafit tozu, osphendion (Os) (bir redoks mediyatörü), NADP^+ , GADH ve parafin yağı karıştırılarak teflon tüpün içine doldurulmuş ve böylelikle karbon pasta elektrot oluşturulmuştur. Biyosensörün tayin aralığı 1,0-3,0 mM gibi dar bir aralığa sahipken tayin limiti ise 0,2 mM'dır. Çalışma ospendionun redoks mediyatörü olarak kullanılmasının başarılı sonuçlar verdiğini açıklamaktadır. Ne var ki gerek enzimin gerekse kullanılan koenzimlerin pahalılığı galaktoz biyosensörlerinde GADH kullanımını sınırlandırmıştır.

Tablo 16'da literatürde var olan ve serum/plazma/kandaki galaktoz ölçümünü hedefleyen biyosensörlerin performans özellikleri yer almaktadır. Buna göre bu çalışmada geliştirilen serbest galaktoz biyosensörü ortalama bir tayin aralığına, hızlı cevap süresine ve oldukça iyi bir depo kararlılığına sahiptir. Literatür verilerinde bildiğimiz kadarıyla Gal-1-P'e yönelik bir biyosensöre rastlanmadığından total galaktoz biyosensörü için bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Tablo 16. Literatürde var olan galaktoz biyosensörleri ile bu çalışmanın karşılaştırılması

Sensör Dizaynı	Duyarlılık	Tayin aralığı (mM)	Cevap süresi (s)	Stabilite (gün)	Örnek	Referans
GaOx/CA/Co-SPCE	7,0 $\mu\text{A.mM}^{-1}.$ cm^{-2}	0,1–25,0	30	14	Serum	(Kanyong et al., 2013)
GalOx/Glu/PC/H ₂ O ₂	-	0,0–28,0	40	7	Plazma, kan	(Taylor et al., 1977)
Glu/GaOx/Glu/1,3-DAB/Res/Pt		50×10^{-3} – 6,0	18	30	Plazma	(Manowitz et al., 1995)
GaOx/Glu/Chit/PB/Pt	49,0 nA.mM^{-1}	0,1–6,0	42–60	30	Serum	(Y. Wang et al., 2003)
GaOx/Co ₃ O ₄ /Graphene/GC E	6,6 $\mu\text{A.mM}^{-1}.$ cm^{-2}	$9,0 \times 10^{-3}$ – 0,6	15	~30	Serum	(Dalkıran et al., 2016)
GaOx/Co ₃ O ₄ /MWCNTs/GC E	10,4 $\mu\text{A.mM}^{-1}.$ cm^{-2}	$9,0 \times 10^{-3}$ – 1,0	20	~30	Serum	(Dalkıran et al., 2016)
GaOx/Nafion/Pt	100,0 nA.mM^{-1}	0,25–4,25	<30	10	Serum	(Ji & Zhang, 1993)
GaOx/Kollajen / H ₂ O ₂	1,0–3,0 mA.M^{-1}	$5,0 \times 10^{-4}$ – 0,6	60	~300	Serum	(Bertrand et al., 1981)
GaOx/Glu/Chit/SWCNT-GCE	1126,0 nA.Mm^{-1}	up to 1.0	-	-	Kan	(Tkac et al., 2007)
GaOx/Polipirol /Pt	3,5–14,7 $\text{mA.M}^{-1}.$ m^{-2}	$5,0 \times 10^{-4}$ – 2,0	-	15	Kan	(Coche-Guerente et al., 1995)
GaOx/Polipirol e-[p(HEMA)]/Pt	937,0 $\mu\text{A.M}^{-1}$	$5,0 \times 10^{-2}$ – 10,0	70	270	Serum	(Brahim et al., 2002)
Nafyon/PU/Xerogel-GaOX/Pt	0,037 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,5-7,0	~30	-	Serum	(Labban et al., 2018)
CHIT/GaOX/Naf/PB/SPCE	1,01 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,025-10	20	84	Plazma	Bu çalışma

6. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasının amacı serbest ve total galaktoz (galaktoz + galaktoz-1-fosfat) tayini için amperometrik biyosensörler geliştirilmesidir. Serbest galaktoz biyosensörünün hedef matriksi plazma veya serum, total galaktoz biyosensörünün hedef matriksi eritrosit hemolizatıdır.

Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi Galaktoz oksidaz aktivitesi sonucu açığa çıkan ve elektroaktif bir bileşik olan H_2O_2 'in SPCE üzerine elektrodpozisyon yöntemi ile biriktirilen PB vasıtasıyla düşük potansiyelde indirgenmesine dayanmaktadır. H_2O_2 'in düşük potansiyelde indirgenmesi askorbik asit, ürik asit gibi elektroaktif türlerin girişim etkisini azaltmaktadır. Total galaktoz biyosensörünün çalışma prensibi ise şöyledir: elektrot yüzeyine immobilize edilen ALP, Gal-1-P'ı galaktoza hidrolizlerken açığa çıkan galaktoz GaOX tarafından oksitlenir. Bu tepkimede oluşan H_2O_2 ise PB tarafından elektrot yüzeyinde indirgenir.

Her iki biyosensör içinde aynı immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu çalışmada uygulanan immobilizasyon yöntemi özgündür. Immobilizasyon yöntemi kitosan ile nafyon katmanları arasındaki elektrostatik çekim kuvvetleri yoluyla enzim yapısını elektrot yüzeyine tutundurmaya dayanır.

Yapılan optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları şöyledir:

- Serbest galaktoz biyosensörü için çalışma potansiyeli -0,05 V; total galaktoz biyosensörü için ise -0,1 V olarak bulunmuştur.
- Geliştirilen biyosensörlerin immobilizasyon konfigürasyonları SPCE/PB/CHIT/GaOX/NAF/GaOX/CHIT şeklinde olduğunda en hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.
- Immobilizasyon bileşenlerinden kitosanın optimum konsantrasyonu %0,1 olarak bulunurken nafyonun da benzer şekilde %0,1 olarak bulunmuştur.
- Immobilizasyon bileşenlerinin elektrot yüzeyine damlatma hacmi için en iyi sonuçlar 5 μ L olarak bulunmuştur.
- GNP'nin immobilizasyon bileşeni olarak kullanılması biyosensör cevabını yaklaşık 1,5 kat arttırmıştır.

- Serbest galaktoz biyosensörü için optimum GaOX miktarı 10 mg/mL olarak bulunurken total galaktoz biyosensörü için optimum ALP miktarı 5 mg/mL olarak bulunmuştur.
- Serbest galaktoz biyosensörünün optimum pH'ı 7,5 (50 mM PBS, 0,1 M KCl içeren tamponda) olarak bulunurken biyosensör pH 7,5-8 arasında stabildir. Total galaktoz biyosensörünün optimum pH'sı ise 8 (50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂ ve 0,1 M KCL içeren tamponda) olarak bulunmuştur.
- Her iki biyosensörle de en yüksek biyosensör cevapları 30 °C'de elde edilirken her iki biyosensör de oda sıcaklığında %90'ın üzerinde aktivite göstermiştir.
- Serbest galaktoz biyosensörü için doğrusal tayin aralığı 0,025-10 mM arasındadır. Bu aralık hem sağlıklı bireylerin hem de hastaların plazmasındaki galaktoz seviyelerini kapsamaktadır. Total galaktoz biyosensörünün Gal-1-P için doğrusal tayin aralığı ise 0,1-10 mM arasında bulunmuştur. Bu aralık klasik tip galaktozemili hastaların eritrosit Gal-1-P düzeylerini kapsarken sağlıklılarıdaki eser miktardaki Gal-1-P düzeylerini kapsamamaktadır.
- Her iki biyosensörün de gün içi ve günler arası üç seviye tekrarlanabilirliği için hesaplanan %VK değerleri kabul edilebilir limit olan %15'in altındadır.
- Serbest galaktoz biyosensörünün tekrar üretilebilirliği için hesaplanan %VK %7,78; total galaktoz biyosensörü için hesaplanan %VK değeri ise 8,75'tir.
- Geliştirilen serbest galaktoz biyosensörü galaktoz içermeyen glukoz, fruktoz, mannoz ve sakkaroz cevap vermemiştir. Yapısında galaktoz bulunan bir disakkarit olan laktoz ve fosfatlı bir şeker olan galaktoz-1-fosfata ise galaktoza verilen yanıtın %10'u kadar bir yanıt vermiştir. Total galaktoz biyosensöründe galaktoza verilen cevap %100, Gal-1-P'a %31 ve UDP-Galaktoza ise %3'tür. Total galaktoz biyosensörü UDP-glukoz ve Glukoz-6-Fosfata bir yanıt vermemiştir.
- Sağlıklı ve hasta düzeylerini içerecek şekilde hazırlanan 10 sağlıklı ve 11 galaktozemili örneğinin plazmalarında galaktoz, eritrosit hemolizatında ise Gal-1-P tayini yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörlerin plazma ve hemolizat

matrikslerinde doğru ölçüm yaptıkları hem % geri elde deneyleriyle hem de yöntem karşılaştırılmasıyla gösterilmiştir.

- Son olarak her iki biyosensör de +4 °C’de 12 hafta, oda sıcaklığında ise 7 hafta boyunca stabildir.

Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensör tek kullanımlık olarak değil tekrar tekrar kullanılabilir olarak tasarlanmıştır. Eğer tek kullanımlık olarak tasarlanmak istense kovalent immobilizasyon teknikleri denenirdi. Bu durumda enzim ile substrat arasında bir membran olmayacağından daha hassas biyosensör cevapları elde edilebilirdi. Fakat kovalent immobilizasyon tekniklerinin kullanıldığı biyosensörlerin depo kararlılığı çok kısa olmaktadır. Geliştirilen biyosensör hedef matrikslerinde hedef analitleri ölçebilmiştir dolayısıyla bu tez çalışmasının ana amacına ulaşılmıştır.

Kaynaklar

- Abbaspour, A., & Kamyabi, M. A. (2005). Electrochemical formation of Prussian blue films with a single ferricyanide solution on gold electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 584(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.07.008>
- Adam, B. W., Flores, S. R., Hou, Y., Allen, T. W., & De Jesus, V. R. (2015). Galactose-1-phosphate uridylyltransferase dried blood spot quality control materials for newborn screening tests. *Clinical Biochemistry*, 48(6), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.009>
- Akcay, Y. D., Sagin, F. G., Aksu, K., Keser, G., Taylor, E., Knight, I., Winyard, P. G., & Sozmen, E. Y. (2012). A panel of oxidative stress assays does not provide supplementary diagnostic information in Behcet's disease patients. *Journal of Inflammation*, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-13>
- Alim, S., Kafi, A. K. M., Rajan, J., & Yusoff, M. M. (2019). Application of polymerized multiporous nanofiber of SnO₂ for designing a bienzyme glucose biosensor based on HRP/GOx. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1028–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.171>
- Anderson, S. (2018). GALT Deficiency: Galactosemia. *MCN The American Journal of Maternal/Child Nursing*, 43(1), 44–51. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000388>
- Arya, S. K., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 1083–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.10.018>
- Baghbaderani, S. S., & Noorbakhsh, A. (2019). Novel chitosan-Nafion composite for fabrication of highly sensitive impedimetric and colorimetric As(III) aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 131, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.059>

- Baron, A. J., Stevens, C., Wilmot, C., Seneviratne, K. D., Blakeley, V., Dooley, D. M., Phillips, S. E. V., Knowles, P. F., & McPherson, M. J. (1994). Structure and mechanism of galactose oxidase. The free radical site. *Journal of Biological Chemistry*.
- Batra, B., Lata, S., Sunny, Rana, J. S., & Pundir, C. S. (2013). Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film. *Biosensors and Bioelectronics*, 44(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2012.12.034>
- Berry, G. T. (2012). Galactosemia: When is it a newborn screening emergency? In *Molecular Genetics and Metabolism* (Vol. 106, Issue 1, pp. 7–11). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.007>
- Berry, G. T. (2021). Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia. *GeneReviews®*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1518/>
- Berry, G. T., Segal, S., & Gitzelmann, R. (2006). Disorders of galactose metabolism. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*, 121–130. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28785-8_7
- Berry, G. T., Singh, R. H., Mazur, A. T., Guerrero, N., Kennedy, M. J., Chen, J., Reynolds, R., Palmieri, M. J., Klein, P. D., Segal, S., & Elsas, L. J. (2000). Galactose breath testing distinguishes variant and severe galactose-1-phosphate uridylyltransferase genotypes. *Pediatric Research*, 48(3), 323–328. <https://doi.org/10.1203/00006450-200009000-00010>
- Berry, G. T., Walter, J., & Fridovich-Keil, J. L. (2016). Disorders of Galactose Metabolism. *Inborn Metabolic Diseases*, 139–147. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49771-5_6
- Bertrand, C., Coulet, P. R., & Gautheron, D. C. (1981). Multipurpose electrode with different enzyme systems bound to collagen films. *Analytica Chimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)83925-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)83925-8)

- Beutler, E. (1991). Galactosemia: screening and diagnosis. *Clinical Biochemistry*, 24(4), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(91\)80003-L](https://doi.org/10.1016/0009-9120(91)80003-L)
- Bhimji, A., Zaragoza, A. A., Live, L. S., & Kelley, S. O. (2013). Electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay featuring proximal reagent generation: Detection of human immunodeficiency virus antibodies in clinical samples. *Analytical Chemistry*, 85(14), 6813–6819. <https://doi.org/10.1021/AC4009429>
- Bongiovanni, C., Ferri, T., Poscia, A., Varalli, M., Santucci, R., & Desideri, A. (2001). An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. *Bioelectrochemistry*, 54(1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(01\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(01)00105-2)
- Borah, H., Gogoi, S., Kalita, S., & Puzari, P. (2018). A broad spectrum amperometric pesticide biosensor based on glutathione S-transferase immobilized on graphene oxide-gelatin matrix. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 828, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.047>
- Brahim, S. I., Maharajh, D., Narinesingh, D., & Guiseppi-Elie, A. (2002). Design and characterization of a galactose biosensor using a novel polypyrrole-hydrogel composite membrane. *Analytical Letters*, 35(5), 797–812. <https://doi.org/10.1081/AL-120004070>
- Cerone, J., & Rios, A. (2019). Galactosemia. *Pediatrics in Review*, 40(Supplement 1), 24–27. <https://doi.org/10.1542/PIR.2018-0150>
- Cerone, J., Rios, A., Welling, L., Le, B., & Gt, B. (2019). Galactosemia. *Pediatrics In Review*, 40(Supplement_1), 24–27. <https://doi.org/10.1542/PIR.2018-0150>
- Chadha, U., Bhardwaj, P., Agarwal, R., Rawat, P., Agarwal, R., Gupta, I., Panjwani, M., Singh, S., Ahuja, C., Selvaraj, S. K., Banavoth, M., & Sonar, P. (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2022.02.010>
- Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Mediated biosensors. In *Biosensors and*

Bioelectronics (Vol. 17, Issues 6–7, pp. 441–456).
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X)

Chu, Z., Liu, Y., & Jin, W. (2017a). Recent progress in Prussian blue films: Methods used to control regular nanostructures for electrochemical biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 96, 17–25.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.036>

Chu, Z., Liu, Y., & Jin, W. (2017b). Recent progress in Prussian blue films: Methods used to control regular nanostructures for electrochemical biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 96, 17–25.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2017.04.036>

Church, S. (2006). Del. firm installs fuel cell. *The News Journal*, B7.

Coche-Guerente, L., Cosnier, S., Innocent, C., & Mailley, P. (1995). Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. *Analytica Chimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00178-3](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00178-3)

Coleman, J. E. (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 21, 441–483.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BB.21.060192.002301>

Connell, E. (2012). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (5th edn). *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1258/acb.2012.201217>

Cui, H. F., Zhang, T. T., Lv, Q. Y., Song, X., Zhai, X. J., & Wang, G. G. (2019). An acetylcholinesterase biosensor based on doping Au nanorod@SiO₂ nanoparticles into TiO₂-chitosan hydrogel for detection of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111452.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2019.111452>

Dalkıran, B., Erden, P. E., & Kılıç, E. (2016). Electrochemical biosensing of galactose based on carbon materials: graphene versus multi-walled carbon

125

nanotubes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9532-x>

De Mattos, I. L., Gorton, L., Ruzgas, T., & Karyakin, A. A. (2000). Sensor for hydrogen peroxide based on Prussian Blue modified electrode: Improvement of the operational stability. *Analytical Sciences*, 16(8), 795–798.
<https://doi.org/10.2116/analsci.16.795>

Demirbas, D., Coelho, A. I., Rubio-Gozalbo, M. E., & Berry, G. T. (2018). Hereditary galactosemia. In *Metabolism: Clinical and Experimental*.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.025>

Doumic, L. I., Salierno, G., Ramos, C., Haure, P. M., Cassanello, M. C., & Ayude, M. A. (2016). “Soluble”: Vs. “insoluble” Prussian blue based catalysts: Influence on Fenton-type treatment. *RSC Advances*, 6(52), 46625–46633.
<https://doi.org/10.1039/C6RA06618F>

Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El’skaya, A. V., Martelet, C., & Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM*, 29(2–3), 171–180.
<https://doi.org/10.1016/J.RBMRET.2007.11.007>

El Harrad, L., & Amine, A. (2016). Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. *Enzyme and Microbial Technology*, 85, 57–63. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2016.01.006>

Ellis, D., Eckhoff, M., & Neff, V. D. (1981). Electrochromism in the mixed-valence hexacyanides. 1. Voltammetric and spectral studies of the oxidation and reduction of thin films of Prussian blue. *Journal of Physical Chemistry*, 85(9), 1225–1231. <https://doi.org/10.1021/J150609A026>

European Medicines Agency, & Ema. (2012). Guideline on bioanalytical method validation. *EMA Guideline*, 44(July 2011), 1–23.
<https://doi.org/EMA/CHMP/EWP/192217/2009>

- Evik, E., Şenel, M., & Fatih Abasyank, M. (2010). Construction of biosensor for determination of galactose with galactose oxidase immobilized on polymeric mediator contains ferrocene. *Current Applied Physics*, 10(5), 1313–1316. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.03.014>
- Farré, M., & Barceló, D. (2007). Sensor, biosensors and MIP based sensors. In *Food Toxicants Analysis* (pp. 599–636). <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50017-1>
- Ferreira, M., Fiorito, P. A., Oliveira, O. N., & Córdoba De Torresi, S. I. (2004). Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(12), 1611–1615. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.12.025>
- Gross, K. C., & Acosta, P. B. (1991). Fruits and vegetables are a source of galactose: Implications in planning the diets of patients with Galactosaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14(2), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF01800599>
- Guilbault, G. G., & Lubrano, G. J. (1973). An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 64(3), 439–455. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)82476-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)82476-4)
- Hasan, A., Nurunnabi, M., Morshed, M., Paul, A., Polini, A., Kuila, T., Al Hariri, M., Lee, Y. K., & Jaffa, A. A. (2014). Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/307519>
- Heitner-Wirguin, C. (1996). Recent advances in perfluorinated ionomer membranes: structure, properties and applications. *Journal of Membrane Science*, 120(1), 1–33. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(96\)00155-X](https://doi.org/10.1016/0376-7388(96)00155-X)
- Hench, L. L. (1998). Biomaterials: A forecast for the future. *Biomaterials*, 19(16), 1419–1423. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00133-1)
- Heo, W., Lee, K., Park, S., Hyun, K. A., & Jung, H. Il. (2022). Electrochemical

- biosensor for nucleic acid amplification-free and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA via CRISPR/Cas13a trans-cleavage reaction. *Biosensors and Bioelectronics*, 201, 113960. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113960>
- Herren, F., Ludi, A., Fischer, P., & Halg, W. (1980). Neutron Diffraction Study of Prussian Blue, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Location of Water Molecules and Long-Range Magnetic Order. *Inorganic Chemistry*, 19(4), 956–959. <https://doi.org/10.1021/IC50206A032>
- Hira, S. A., Yusuf, M., Annas, D., Nagappan, S., Song, S., Park, S., & Park, K. H. (2021). Recent Advances on Conducting Polymer-Supported Nanocomposites for Nonenzymatic Electrochemical Sensing. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 60(37), 13425–13437. <https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.1C02043>
- Holtzman, H. (1945). Alkali Resistance of the Iron Blues. *Industrial & Engineering Chemistry*, 37(9), 855–861. <https://doi.org/10.1021/IE50429A019>
- Honeychurch, K. C., & Hart, J. P. (2003). Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(7), 456–469. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00703-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00703-9)
- Hoylaerts, M. F., Manes, T., & Millán, J. L. (1997). Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem*, 272(36), 22781–22787. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22781>
- Hu, O. Y., Hu, T. -M, & Tang, H. -S. (1995). Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: Comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(2), 231–235. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840223>
- Hussaini, S. H., & Farrington, E. a. (2007). Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert Opinion on Drug Safety*, 6(6), 673–684.

<https://doi.org/10.1517/14740338.6.6.673>

Information on EC 3.1.3.1 - alkaline phosphatase - BRENDA Enzyme Database. (n.d.). Retrieved March 10, 2022, from <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.3.1#pH RANGE>

Introduction to biosensors. (n.d.). Retrieved March 9, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986445/>

Itaya, K., Uchida, I., & Neff, V. D. (1986). Electrochemistry of Polynuclear Transition Metal Cyanides: Prussian Blue and Its Analogues. *Accounts of Chemical Research*, 19(6), 162–168. <https://doi.org/10.1021/AR00126A001>

Jayan, H., Pu, H., & Sun, D. W. (2020). Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 95, 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.007>

JC Say, K. C. R. F. (1991). Alkaline phosphatase from rat osseous plates: Purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim Biophys Acta*, 1074, 256–262.

Ji, X. F., & Zhang, Y. H. (1993). A galactose sensor based on the platinized glassy carbon electrode modified with Nafion film. *Fenxi Huaxue = Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 21(5), 519–522. <https://eurekamag.com/research/002/283/002283759.php>

Jia, N. Q., Zhang, Z. R., Zhu, J. Z., & Zhang, G. X. (2003). A galactose biosensor based on the microfabricated thin film electrode. *Analytical Letters*. <https://doi.org/10.1081/AL-120023704>

Jiang, Y., & Wu, J. (2019). Recent development in chitosan nanocomposites for surface-based biosensor applications. *ELECTROPHORESIS*, 40(16–17), 2084–2097. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201900066>

Kanyong, P., Krampa, F. D., Aniweh, Y., & Awandare, G. A. (2017). Enzyme-based

amperometric galactose biosensors: a review. In *Microchimica Acta*.
<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2465-z>

Kanyong, P., Pemberton, R. M., Jackson, S. K., & Hart, J. P. (2013). Development of an amperometric screen-printed galactose biosensor for serum analysis. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.006>

Karyakin, A. A. (2017). Advances of Prussian blue and its analogues in (bio)sensors. *Current Opinion in Electrochemistry*, 5(1), 92–98.
<https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2017.07.006>

Karyakin, A. A., Gitelmacher, O. V., & Karyakina, E. E. (1995). Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose. *Analytical Chemistry*, 67(14), 2419–2423.
<https://doi.org/10.1021/AC00110A016>

Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., & Gorton, L. (1998). The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 456(1–2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(98\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(98)00202-2)

Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., & Gorton, L. (1999). On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 1(2), 78–82. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(99\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(99)00010-7)

Karyakin, A. A., Puganova, E. A., Bolshakov, I. A., & Karyakina, E. E. (2007). Electrochemical sensor with record performance characteristics. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(40), 7678–7680.
<https://doi.org/10.1002/ANIE.200700341>

Khumngern, S., Jirakunakorn, R., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Numnuam, A. (2021). A highly sensitive flow injection amperometric glucose biosensor using a gold nanoparticles/polytyramine/Prussian blue modified screen-printed carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 138, 107718.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEMA.2020.107718>

- Kim, D. S., Moon, I. K., Yang, J. H., Choi, K., Oh, J., & Kim, S. W. (2020). Mesoporous ZnCo₂O₄ nanowire arrays with oxygen vacancies and N-dopants for significant improvement of non-enzymatic glucose detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 878. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114585>
- Kim, E. E., & Wyckoff, H. W. (1991). Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 218(2), 449–464. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90724-K](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90724-K)
- Kim, M. Il, Shim, J., Li, T., Woo, M. A., Cho, D., Lee, J., & Park, H. G. (2012). Colorimetric quantification of galactose using a nanostructured multi-catalyst system entrapping galactose oxidase and magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *Analyst*, 137(5), 1137–1143. <https://doi.org/10.1039/c2an15889b>
- Kotb, M. A., Mansour, L., & Shamma, R. A. (2019). Screening for galactosemia: Is there a place for it? *International Journal of General Medicine*, 12, 193–205. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S180706>
- Kusoglu, A., & Weber, A. Z. (2017). New Insights into Perfluorinated Sulfonic-Acid Ionomers. *Chemical Reviews*, 117(3), 987–1104. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00159>
- Labban, N., Wayu, M. B., Steele, C. M., Munoz, T. S., Pollock, J. A., Case, W. S., & Leopold, M. C. (2018). First Generation Amperometric Biosensing of Galactose with Xerogel-Carbon Nanotube Layer-By-Layer Assemblies. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/NANO9010042>
- Lee, K. N., Lee, Y., & Son, Y. (2011). Enhanced sensitivity of a galactose biosensor fabricated with a bundle of conducting polymer microtubules. *Electroanalysis*, 23(9), 2125–2130. <https://doi.org/10.1002/elan.201100183>
- Li, C. M., Zhen, S. J., Wang, J., Li, Y. F., & Huang, C. Z. (2013). A gold nanoparticles-based colorimetric assay for alkaline phosphatase detection with tunable dynamic range. *Biosensors and Bioelectronics*, 43(1), 366–371.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.015>

- Li, Y., Ptolemy, A. S., Harmonay, L., Kellogg, M., & Berry, G. T. (2011). Ultra fast and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry based assay for galactose-1-phosphate uridylyltransferase and galactokinase deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.018>
- Lindgren, A., Ruzgas, T., Gorton, L., Csöregi, E., Bautista Ardila, G., Sakharov, I. Y., & Gazaryan, I. G. (2000). Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(9–10), 491–497. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00110-X)
- López-Marzo, A. M., & Baldrich, E. (2019). AuNPs/methylene blue dual-signal nanoimmunoconjugates and electrode activation for electrochemical biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 855, 113500. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2019.113500>
- Lü, Y., Zhan, W., He, Y., Wang, Y., Kong, X., Kuang, Q., Xie, Z., & Zheng, L. (2014). MOF-templated synthesis of porous Co₃O₄ concave nanocubes with high specific surface area and their gas sensing properties. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(6), 4186–4195. <https://doi.org/10.1021/AM405858V>
- Lucarelli, F., Kicela, A., Palchetti, I., Marrazza, G., & Mascini, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor for analysis of wastewater samples. *Bioelectrochemistry*, 58(1), 113–118. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00133-0)
- Luong, J. H. T., Hrapovic, S., & Wang, D. (2005). Multiwall carbon nanotube (MWCNT) based electrochemical biosensors for mediatorless detection of putrescine. *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.200403117>
- Ma, X., Li, M., Feng, C., Hu, W., Wang, L., & Liu, X. (2016). Development and

reaction mechanism of efficient nano titanium electrode: Reconstructed nanostructure and enhanced nitrate removal efficiency. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.047>

Maestre, E., Katakis, I., Narváez, A., & Domínguez, E. (2005). A multianalyte flow electrochemical cell: Application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.01.014>

Manivannan, S., Kang, I., & Kim, K. (2016). In Situ Growth of Prussian Blue Nanostructures at Reduced Graphene Oxide as a Modified Platinum Electrode for Synergistic Methanol Oxidation. *Langmuir*, 32(7), 1890–1898. <https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.5B04278>

Manowitz, P., Stoecker, P. W., & Yacynych, A. M. (1995). Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(3–4), 359–370. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)96854-R](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96854-R)

Mauritz, K. A., & Moore, R. B. (2004). State of Understanding of Nafion. *Chemical Reviews*, 104(10), 4535–4586. <https://doi.org/10.1021/cr0207123>

Mi, J., Chen, X., Zhang, Q., Zheng, Y., Xiao, Y., Liu, F., Au, C. T., & Jiang, L. (2019). Mechanochemically synthesized MgAl layered double hydroxide nanosheets for efficient catalytic removal of carbonyl sulfide and H₂S. *Chemical Communications*, 55(63), 9375–9378. <https://doi.org/10.1039/C9CC03637G>

Millán, J. L. (2006a). Alkaline phosphatases. *Purinergic Signalling*, 2(2), 335–341. <https://doi.org/10.1007/S11302-005-5435-6>

Millán, J. L. (2006b). Alkaline phosphatases. *Purinergic Signalling*, 2(2), 335–341. <https://doi.org/10.1007/S11302-005-5435-6/FIGURES/3>

Mulchandani, A. (1998). Principles of Enzyme Biosensors. *Enzyme and Microbial*
133

- Narwal, V., Kumar, P., Joon, P., & Pundir, C. S. (2018). Fabrication of an amperometric sarcosine biosensor based on sarcosine oxidase/chitosan/CuNPs/c-MWCNT/Au electrode for detection of prostate cancer. *Enzyme and Microbial Technology*, 113, 44–51. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2018.02.010>
- Neff, V. D. (1978). Electrochemical Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue. *Journal of The Electrochemical Society*, 125(6), 886–887. <https://doi.org/10.1149/1.2131575>
- Newman, J. D., White, S. F., Tothill, I. E., & Turner, A. P. F. (1995). Catalytic Materials, Membranes, and Fabrication Technologies Suitable for the Construction of Amperometric Biosensors. *Analytical Chemistry*, 67(24), 4594–4599. <https://doi.org/10.1021/AC00120A027>
- Nikolelis, D. P., & Nikoleli, G. P. (2018). Nanotechnology and biosensors. In *Nanotechnology and Biosensors*. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00358-0>
- Novelli, G., & Reichardt, J. K. V. (2000). Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: Past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71(1–2), 62–65. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3073>
- Nsabimana, A., Lan, Y., Du, F., Wang, C., Zhang, W., & Xu, G. (2019). *Alkaline phosphatase-based electrochemical sensors for health applications*. <https://doi.org/10.1039/c8ay02793e>
- Odaci, D., Telefoncu, A., & Timur, S. (2008). Pyranose oxidase biosensor based on carbon nanotube (CNT)-modified carbon paste electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2008.01.020>
- Paukner, R., Staudigl, P., Choosri, W., Haltrich, D., & Leitner, C. (2015). Expression, purification, and characterization of galactose oxidase of *Fusarium sambucinum* in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*, 108, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.05.005>

<https://doi.org/10.1016/J.PEP.2014.12.010>

Peter, M. G. (1995). Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 32(4), 629–640. <https://doi.org/10.1080/10601329508010276>

Petrucci, R., Di Matteo, P., Sobolev, A. P., Liguori, L., Albanese, D., Proietti, N., Bortolami, M., & Russo, P. (2021). Impact of Dealcoholization by Osmotic Distillation on Metabolic Profile, Phenolic Content, and Antioxidant Capacity of Low Alcoholic Craft Beers with Different Malt Compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(16), 4816–4826. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C00679>

Petrucci, R., Pasquali, M., Scaramuzzo, F. A., & Curulli, A. (2021). Recent Advances in Electrochemical Chitosan-Based Chemosensors and Biosensors: Applications in Food Safety. *Chemosensors 2021, Vol. 9, Page 254*, 9(9), 254. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS9090254>

Phosphatase, Alkaline main = 2,000DEA units/mg protein 9001-78-9. (n.d). Retrieved July 21, 2022, from <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/p5521>

Piernas Muñoz, M. J., & Castillo Martínez, E. (2018). Prussian Blue and Its Analogues. Structure, Characterization and Applications. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*, 9–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91488-6_2

Pruden, B. B., Pineault, G., & Loutfi, H. (1975). A thin-layer chromatographic method for the quantitative determination of d-mannose, d-glucose and d-galactose in aqueous solution. *Journal of Chromatography A*, 115(2), 477–483. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)98950-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)98950-2)

Pyhtila, B. M., Shaw, K. A., Neumann, S. E., & Fridovich-Keil, J. L. (2015). Newborn Screening for Galactosemia in the United States: Looking Back, Looking Around, and Looking Ahead. *JIMD Reports*, 15, 79.

https://doi.org/10.1007/8904_2014_302

- Qiu, J. D., Peng, H. Z., Liang, R. P., & Xiong, M. (2007). Preparation of three-dimensional ordered macroporous Prussian blue film electrode for glucose biosensor application. *Electroanalysis*, 19(11), 1201–1206. <https://doi.org/10.1002/ELAN.200703844>
- Ricci, F., & Palleschi, G. (2005a). Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 21, Issue 3, pp. 389–407). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.001>
- Ricci, F., & Palleschi, G. (2005b). Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 389–407. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.001>
- Ricci, Francesco, Amine, A., Tuta, C. S., Ciucu, A. A., Lucarelli, F., Palleschi, G., & Moscone, D. (2003). Prussian Blue and enzyme bulk-modified screen-printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stability. *Analytica Chimica Acta*, 485(1), 111–120. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00403-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00403-3)
- Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M. I., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. A. (2016). Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/S16060780>
- Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., & Marko-Varga, G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta*, 330(2–3), 123–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00169-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00169-9)
- Scheller, F. W., Schubert, F., Renneberg, R., Müller, H. G., Jänchen, M., & Weise, H. (1985). Biosensors: trends and commercialization. *Biosensors*.

[https://doi.org/10.1016/0265-928X\(85\)80001-8](https://doi.org/10.1016/0265-928X(85)80001-8)

- Şenel, M., Bozgeyik, I., Çevik, E., & Fatih Abasiyanik, M. (2011). A novel amperometric galactose biosensor based on galactose oxidase-poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Synthetic Metals*, 161(5–6), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2010.12.025>
- Sgobbi, L. F., Razzino, C. A., & Machado, S. A. S. (2016). A disposable electrochemical sensor for simultaneous detection of sulfamethoxazole and trimethoprim antibiotics in urine based on multiwalled nanotubes decorated with Prussian blue nanocubes modified screen-printed electrode. *Electrochimica Acta*, 191, 1010–1017. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.11.151>
- Shahid-Ul-Islam, Shahid, M., & Mohammad, F. (2013). Green chemistry approaches to develop antimicrobial textiles based on sustainable biopolymers - A review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52(15), 5245–5260. <https://doi.org/10.1021/IE303627X>
- Shen, C., Li, X., Rasooly, A., Guo, L., Zhang, K., & Yang, M. (2016). A single electrochemical biosensor for detecting the activity and inhibition of both protein kinase and alkaline phosphatase based on phosphate ions induced deposition of redox precipitates. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.025>
- Shen, X., Wu, S., Liu, Y., Wang, K., Xu, Z., & Liu, W. (2009). Morphology syntheses and properties of well-defined Prussian Blue nanocrystals by a facile solution approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 329(1), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.067>
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043>
- Smart, A., Crew, A., Pemberton, R., Hughes, G., Doran, O., & Hart, J. P. (2020).

- Screen-printed carbon based biosensors and their applications in agri-food safety. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 127. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.115898>
- Sone, Y., Ekdunge, P., & Simonsson, D. (1996). Proton Conductivity of Nafion 117 as Measured by a Four-Electrode AC Impedance Method. *Journal of the Electrochemical Society*, 143(4), 1254. <https://doi.org/10.1149/1.1836625>
- Stokol, T., Schaefer, D. M., Shuman, M., Belcher, N., & Dong, L. (2015). Alkaline phosphatase is a useful cytochemical marker for the diagnosis of acute myelomonocytic and monocytic leukemia in the dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), 79–93. <https://doi.org/10.1111/VCP.12227>
- Suginta, W., Khunkaewla, P., & Schulte, A. (2013). Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. *Chemical Reviews*, 113(7), 5458–5479. <https://doi.org/10.1021/CR300325R>
- Suvarnaphaet, P., & Pechprasarn, S. (2017). Graphene-based materials for biosensors: A review. In *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s17102161>
- Taylor, P. J., Kmetec, E., & Johnson, J. M. (1977). Design, Construction, and Applications of a Galactose Selective Electrode. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac50014a030>
- Teymourian, H., Barfidokht, A., & Wang, J. (2020). Electrochemical glucose sensors in diabetes management: An updated review (2010-2020). *Chemical Society Reviews*, 49(21), 7671–7709. <https://doi.org/10.1039/D0CS00304B>
- Timson, D. J. (2016). The molecular basis of galactosemia — Past, present and future. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.077>
- Tkac, J., Vostiar, I., Gemeiner, P., & Sturdik, E. (2002). Indirect evidence of direct electron communication between the active site of galactose oxidase and a graphite electrode. *Bioelectrochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00043-9)

- Tkac, J., Whittaker, J. W., & Ruzgas, T. (2007). The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.014>
- Updike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The enzyme electrode. *Nature*, 214(5092), 986–988. <https://doi.org/10.1038/214986A0>
- Vaca, G., Sanchez-Corona, J., Medina, C., Olivares, N., Rivera, H., Hernández, A., Ibarra, B., Sotomayor, J. M., & Cantó, J. M. (1978). Galactosemia as a result of galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Archivos de Investigacion Medica*, 9(3).
- van Erven, B., Welling, L., van Calcar, S. C., Doulgeraki, A., Eyskens, F., Gribben, J., Treacy, E. P., Vos, R., Waisbren, S. E., Rubio-Gozalbo, M. E., & Bosch, A. M. (2017). Bone health in classic galactosemia: Systematic review and meta-analysis. In *JIMD Reports* (Vol. 35, pp. 87–96). Springer. https://doi.org/10.1007/8904_2016_28
- Vats, D., & Packman, S. (2014). Galactosemia. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00082-8>
- Wang, Q., Liu, Y., Campillo-Brocal, J. C., Jiménez-Quero, A., Crespo, G. A., & Cuartero, M. (2021). Electrochemical biosensor for glycine detection in biological fluids. *Biosensors and Bioelectronics*, 182, 113154. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113154>
- Wang, Y., Zhu, J., Zhu, R., Zhu, Z., Lai, Z., & Chen, Z. (2003). Chitosan/Prussian blue-based biosensors. *Measurement Science and Technology*. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/14/6/317>
- Welling, L., Bernstein, L. E., Berry, G. T., Burlina, A. B., Eyskens, F., Gautschi, M., Grünewald, S., Gubbels, C. S., Knerr, I., Labrune, P., van der Lee, J. H., MacDonald, A., Murphy, E., Portnoi, P. A., Öunap, K., Potter, N. L., Rubio-Gozalbo, M. E., Spencer, J. B., Timmers, I., ... Bosch, A. M. (2017).

International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40(2), 171–176. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9990-5>

Wen, W., Yan, X., Zhu, C., Du, D., & Lin, Y. (2017). Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. *Analytical Chemistry*, 89(1), 138–156. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04281>

Wu, B. Y., Hou, S. H., Yu, M., Qin, X., Li, S., & Chen, Q. (2009). Layer-by-layer assemblies of chitosan/multi-wall carbon nanotubes and glucose oxidase for amperometric glucose biosensor applications. *Materials Science and Engineering: C*, 29(1), 346–349. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2008.07.018>

Xiang, M. H., Liu, J. W., Li, N., Tang, H., Yu, R. Q., & Jiang, J. H. (2016). A fluorescent graphitic carbon nitride nanosheet biosensor for highly sensitive, label-free detection of alkaline phosphatase. *Nanoscale*, 8(8), 4727–4732. <https://doi.org/10.1039/C5NR08278A>

Xu, X., Niu, X., Li, X., Li, Z., Du, D., & Lin, Y. (2020). Nanomaterial-based sensors and biosensors for enhanced inorganic arsenic detection: A functional perspective. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128100>

Yamamoto, T., Saso, N., Umemura, Y., & Einaga, Y. (2009). Photoreduction of prussian blue intercalated into titania nanosheet ultrathin films. *Journal of the American Chemical Society*, 131(37), 13196–13197. <https://doi.org/10.1021/JA9041274>

Yamazoe, M., Mizuno, A., Nishi, Y., Niwa, K., & Isobe, M. (2016). Serum alkaline phosphatase as a predictor of worsening renal function in patients with acute decompensated heart failure. *Journal of Cardiology*, 67(5), 412–417. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.08.004>

Yang, G., Zhao, F., & Zeng, B. (2014). Facile fabrication of a novel anisotropic gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid/graphene modified electrode for the

- determination of theophylline and caffeine. *Talanta*, 127, 116–122. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2014.03.029>
- Yang, P., Peng, J., Chu, Z., Jiang, D., & Jin, W. (2017). Facile synthesis of Prussian blue nanocubes/silver nanowires network as a water-based ink for the direct screen-printed flexible biosensor chips. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.013>
- Yilmaz, Ö., Demirkol, D. O., Gülcemal, S., Kiliç, A., Timur, S., & Çetinkaya, B. (2012). Chitosan–ferrocene film as a platform for flow injection analysis applications of glucose oxidase and *Gluconobacter oxydans* biosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 100, 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2012.05.020>
- Yilmaz, Y. Y., Yalcinkaya, E. E., Demirkol, D. O., & Timur, S. (2020). 4-aminothiophenol-intercalated montmorillonite: Organic-inorganic hybrid material as an immobilization support for biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 307, 127665. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2020.127665>
- Zeng, J. B., He, Y. S., Li, S. L., & Wang, Y. Z. (2012). Chitin whiskers: An overview. *Biomacromolecules*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1021/BM201564A>
- Zhang, J., He, L., Zhang, X., Wang, J., Yang, L., Liu, B., Jiang, C., & Zhang, Z. (2017). Colorimetric and SERS dual-readout for assaying alkaline phosphatase activity by ascorbic acid induced aggregation of Ag coated Au nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 253, 839–845. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.186>
- Zhang, Y., & Wilson, G. S. (1993). Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂-based biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 345(1–2), 253–271. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)80483-X](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)80483-X)
- Zhao, L., Lin, J. M., Li, Z., & Ying, X. (2006). Development of a highly sensitive,

second antibody format chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of 17 β -estradiol in wastewater. *Analytica Chimica Acta*, 558(1–2), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.034>

Zhybak, M., Beni, V., Vagin, M. Y., Dempsey, E., Turner, A. P. F., & Korpan, Y. (2016). Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 505–511. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.10.009>

Ekler

Ege Ün. Evrak Tarih ve Sayısı: 14/07/2020-E.171700



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 99166796-050.06.04
Konu : 20-7T/36

Doç. Dr. Ebru Sezer
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız "**Galaktozemi Tanısı Ve Tedavisinin İzlenmesine Yönelik "Biyosensör Temelli Yöntem" ler Geliştirilmesi**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz Onay kararı ekte sunulmaktadır.

Başvuru dosyasının araştırmanın yürütüleceği kuruma iletilerek kurum iznini gösterir belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin (daha öncesinde sunulmamış ise) Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü (BAP)ve TÜBİTAK tarafından karşılanacağını, ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Varsa Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)
Etik Kurul Onayı

e-imzalıdır
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU
Kurul Başkanı

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Gençlik Cad. No:12 35040 Bornova/İzmir
Telefon No: +90 (232) 311 21 10 Faks No: +90 (232) 319 90 90
E-Posta: Internet Adresi: www.ege.edu.tr

Bilgi İçin: Nefise ÇAVUŞOĞULLARI
Uzman Memur
Telefon No: 0232 390 2132-4219

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması: https://edys.ege.edu.tr/en/Vision/Validate_Doc.aspx?V=BNF00ZRE adresinden yapılabilir.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 17)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel

ARAŞTIRMANIN AMACI NEDİR ?

Galaktoz vücudumuz için gerekli olan basit şekerlerden birisidir. Bu şekerin metabolizmasında rol oynayan bazı enzimler vardır. Eğer bu enzimlerden biri eksikse galaktoz vücutta fazlalaşmaya ve birikmeye başlar. Bu da çocukluk döneminde şiddetli rahatsızlıklara neden olabilir. Klinikte en sık GALT eksikliğine bağlı ortaya çıkar. GALT enziminin tamamına yakın eksik olması (enzim aktivitesi %10'un altında) klasik galaktozemi olarak ifade edilir.

Hastalık bulguları dokularda galaktoz-1-fosfat ve galaktitol olarak adlandırılan zarar verici maddelerin birikmesi ile ortaya çıkar. Anne sütü bol miktarda galaktoz içerdiği için bebeğin anne sütünü aldığı andan itibaren bu maddeler birikmeye başlar. Doğumdan sonra bir kaç gün içerisinde kusma, sarılık gibi bulgular ortaya çıkar. Bazen ise sadece katarakt ile bulgu verebilir. Hastalık erken dönemde farkedilmezse ölüm dahi görülebilir. Dolayısıyla hastalığı erken tanımak hayati önem taşır.

Bu projenin amacını da galaktoz tayini için hızlı, spesifik, ucuz elektrokimyasal bir biyosensör sistemi geliştirilmesi oluşturmaktadır.

KATILMA KOŞULLARI NELERDİR ?

Bu çalışmaya hasta grubu olarak dahil edilebilmeniz için önceden galaktozemi tanısı almış olmanız gerekir. Galaktozemi hastası değilseniz kontrol grubu olarak da çalışmaya katılabilirsiniz.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR ?

Yapılan rutin kontroller sırasında sizden 2 küçük t p kan (2ml EDTA'lı ve 4 ml düz kan tüpü) alınacaktır. Alacağımız kan  rneği için size sadece bir kez iğne ile girişim yapılacaktır. Bu kan  rneği sadece bu araştırma için kullanılacaktır.

KATILIMCI SAYISI NEDİR ?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 40 (30 sağlıklı kişi, 10 galaktozemi hastası

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada tek bir kez örnek alınacak olup takip süresi yoktur.

ÇALIşMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Eğer galaktozemi hastasıysanız geliştirilecek olan yeni yöntemle kan total galaktoz ölçümü daha doğru ve hızlı biçimde sağlanacaktır. Çalışmadan  ıkarılan sonuçlar ilerideki yaşantınızda sizin ve başka hastaların yararına kullanılabilecektir. Yapılan  alışma araştırma amaçlı olup, doğrudan yarar görme ya da tedavinin seyrinin değiştirilmesini beklemeniz doğru olmayacaktır.

ÇALIşMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Çalışma herhangi bir ilaç kullanımı yada cerrahi işlem içermediği için ilaç yan etkisi, zehirlenme ya da cerrahi bir yan etki riski bulunmamaktadır. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında nadiren de olsa bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde infeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Rutin kontrolleriniz için kan alınması sırasında fazladan 2 t p kan  rneği (2ml EDTA'lı ve 4 ml düz kan tüpü) alınacağı için bu örnek alımı sizin için fazladan bir risk oluşturmayacaktır. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

ARAşTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİLEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ya da besin yoktur.

HANGİ KOşULLARDA ARAşTIRMA DIşI BIRAKILABİLİRİM?

Örneklemenin tekrarı gerekirse ve siz bunu kabul etmezseniz doktorunuz sizi çalışmadan çıkarabilir. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız sürecektir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 90 232 3904031 no.lu telefondan veya 0532 4636790 no.lu cep telefonundan Doç. Dr. Ebru Sezer' e başvurabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR ?

Çalışmanın desteklenmesi amacıyla TÜBİTAK ve Ege Üniversitesi BAP'a başvuru yapılacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILDIĞIM GİZLİ TUTULACAK MI ?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya katılma onayı

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren iki sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI & SOYADI		

TARİH		
-------	--	--

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

Teşekkür

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol gösteren sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Doç. Dr. Ebru SEZER'e, kıymetli görüşlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Eser YILDIRIM SÖZMEN ve Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a, özellikle Galaktozemili kontrol örneklerin sağlanmasında desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Ebru CANDA, Prof. Dr. Sema Kalkan UÇAR ve Prof. Dr. Mahmut ÇOKER hocama, tez yazımı konusunda sağladığı motivasyonla itici güç sağlayan Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN hocama, Tıbbi Biyokimya ve Metabolizma laboratuvarlarında çalışan değerli arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan AİLEME ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Zeynep ÇELİK CANBAY'a ve bana yaşama enerjisi veren canım oğlum TOPRAK'a bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 22101 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İzmir, 26.08.2022

Erhan CANBAY

Özgeçmiş

ERHAN CANBAY

ÖĞRETİM GÖREVLİSİ DR.

Akademik Görevler

UZMAN EGE ÜNİVERSİTESİ/TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ
2015- BÖLÜMÜ/BİYOKİMYA ANABİLİM DALI)

Öğrenim Bilgisi

Lisans, Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Sosyoloji Bölümü, Sosyoloji Anabilim Dalı,	2022 – devam ediyor
Doktora, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı,	2018 – devam ediyor
Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya (YI) (Tezli)	2015 - 2017
Doktora, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Dr)	2013 - 2018
Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (YI) (Tezli)	2011 - 2013
Lisans, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü,	2005 - 2010

Yabancı dil bilgileri

1. İngilizce, B2 Orta Üstü

Sertifika, kurs ve eğitimler

1. Sağlık Ve Tıp, Uygulamalı LC MS MS eğitimi, SELÇUKSEM/Konya Selçuk Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, 2015

Tezler

1. Doktora, Organik Çözgene Dayanıklı Bakteri Temelli Mikrobiyal Biyosensör Ve Moleküler Damgalanmış Polimer Tabanlı Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi, Karakterizasyonu Ve Bazı Steroidlerin Tayininde Kullanılması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Türkiye, 2018

2. Yüksek Lisans, Lökosit Sistin Düzeyinin Belirlenmesi İçin Bir Lc Ms/ms Metodu Geliştirilmesi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Türkiye, 2017

3. Yüksek Lisans, Çok duvarlı karbon nanotüp-nafyon-sisteamin modifiye tirozinaz biyosensörü tasarımı ve dopamin tayinine adaptasyonu, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (YI) (Tezli), Türkiye, 2013

Projeler

1- Hiperlipidemisi Olan Çocuklarda Oksisterol Düzeyleri, Oksidan Stres ve Makrofaj Aktivasyon Göstergelerinin Belirlenmesi, 2021 - 2022, TÜBİTAK Projesi, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Yürütücü

2- Farklı Biyoteknolojik Stratejileri ile Fonksiyonel Arı Poleni Temelli Fermente Ürün Üretimi 2021 -, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Araştırmacı

3- Mezenşimal kök hücrelerin over kanseri hücre hattına etkisi ve senesence belirteçleri ile ilişkisi 2020 - , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Araştırmacı

4-Galaktozemi Tanısı Ve Tedavisinin İzlenmesine Yönelik Biyosensör Temelli Yöntemler Geliştirilmesi 2020 - , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Araştırmacı

5-Flavonoidlerden Zengin Bazı Doğal Bitkilerin SARSCoV2 Virüs Replikasyonunda Görevli 3Kimotripsin Benzeri Proteaz 3Clpro Enzimi Üzerine İnhibitor Etkisinin Araştırılması 2020 - , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Araştırmacı

6-Sağlıklı anneden CS ile doğan term ve preterm bebeklerde anne ve bebeklerde kanda p-cresol ve indoxyl sülfat ve dışkıda Bifidobacterium miktarının karşılaştırılması ve mikrobiyotanın değerlendirilmesi 2020 - , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Araştırmacı

7-İnsülin kullanan diyabetik ve gestasyonel diyabetli annelerden CS ile doğan term bebeklerin ve annelerinin kanlarında p-cresol ve indoxyl sülfat ve dışkıda Bifidobacterium miktarının karşılaştırılması ve mikrobiyotanın değerlendirilmesi 2020 - , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Devam Ediyor, Araştırmacı

8-Diyabetik ayak izleminde biyobelirteç olarak p-Kresol Sülfat, İndoksil Sülfatın ve fenil pirüvik asitin tayini 2020 - , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Beklemede, Araştırmacı

9-Propolisin kolon kanseri hücrelerinde Voltaj kapılı sodyum kanalları üzerine etkisi 2019 - 2022, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Tamamlandı, Araştırmacı

10-Eritrosit GALT enzim aktivitesinin belirlenmesi için LC MS/MS metodu geliştirilmesi optimizasyonu ve validasyonu 2019 - 2020, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Tamamlandı, Araştırmacı

11-Tükürükte Kortizol Tayini İçin Elektrokimyasal Sensör Sistemi Geliştirilmesi 2019 - 2019, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Tamamlandı, Araştırmacı

12-LÖKOSİT SİSTİN DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ İÇİN BİR LC MS/MS METODU GELİŞTİRİLMESİ ,2016 - 2017, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Tamamlandı, Araştırmacı

13-Organik Çözgene Dayanıklı Bakteri Temelli Mikrobiyal Biyosensör Ve Moleküler Damgalanmış Polimer Tabanlı Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi Karakterizasyonu Ve Bazı Steroidlerin Tayininde Kullanılması, 2015 - 2018, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, Ar-ge Projesi, Tamamlandı, Araştırmacı

14-Nanoteknolojik İmmobilizasyon Yöntemlerine Dayalı Yeni Mikrobiyal Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi Ve Katekolaminlerin Tayinine Adaptasyonu,2013 - 2015, TÜBİTAK Projesi, Diğer, Tamamlandı, Bursiyer

15-Pirüvik Asit –Laktik Asit Tayinine Yönelik Prokaryotik Hücre Temelli Mikrobiyal Biyosensör Tasarımı, 2009 - 2010, TÜBİTAK Projesi, Ar-ge Projesi, Tamamlandı, Yürütücü

Makaleler

1. Development An Amperometric Microbial-Enzyme Hybrid Cholesterol Biosensor Based On Ionic Liquid MWCNT Carbon Paste Electrode, SCI İndekslerine Giren Dergi, ELECTROANALYSIS, 33, 2381 - 2391, 2021

2. LC-MS/MS measurement of leukocyte cystine; effect of preanalytic factors., SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi, Talanta, 209, 120558 - 120558,2020

3. Non-invasive cortisol detection in saliva by using molecularly cortisol imprinted fullerene-acrylamide modified screen printed electrodes, SCI İndekslerine Giren Dergi, Talanta, 206, 120225 - 120225, 2020

4. The decision-making levels of urine tetrasaccharide for the diagnosis of Pompe disease in the Turkish population., SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi, Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM, 33, 391 - 395, 2020

5. Biotransformation of Propolis Phenols by *L.plantarum* as a Strategy for Reduction of Allergens, SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi, Food Science And Biotechnology, 27, 1727 - 1733, 2018
6. The effect of temperature and light intensity during cultivation of *Chlorella miniata* on antioxidant, anti-inflammatory potentials and phenolic compound accumulation, ESCI İndekslerine Giren Dergi, BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, 14, 366 - 374, 2018
7. Evaluation of the first Turkish in vitro diagnostic symposium, SCI İndekslerine Giren Dergi, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI, 42, 93 - 96, 2017
8. Simultaneous Determination of Epinephrine and Dopamine by Using *Candida tropicalis* Yeast Cells Immobilized in a Carbon Paste Electrode Modified with Single Wall Carbon Nanotube, SCI İndekslerine Giren Dergi, ELECTROANALYSIS, 29, 1976 - 1984, 2017
9. 1. Türkiye in vitro diagnostik sempozyumunun değerlendirilmesi, SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi, Turkish Journal Of Biochemistry-Türk Biyokimya Dergisi, 42, 93 - 96, 2016
10. A microbial biosensor based on *Lactobacillus delbruecki* sp bacterial cells for simultaneous determination of lactic and pyruvic acid, SCI İndekslerine Giren Dergi, FOOD CHEMISTRY, 169, 197 - 202, 2015
11. MWCNT-cysteamine-Nafion modified gold electrode based on myoglobin for determination of hydrogen peroxide and nitrite, SCI İndekslerine Giren Dergi, BIOELECTROCHEMISTRY, 101, 126 - 131, 2015
12. Design of a multiwalled carbon nanotube-Nafion-cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination, SCI İndekslerine Giren Dergi, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 444, 8 - 15, 2014

13. Ionic liquid modified carbon paste electrode and investigation of its electrocatalytic activity to hydrogen peroxide, SCI İndekslerine Giren Dergi, BULLETIN OF MATERIALS SCIENCE, 37, 617 - 622, 2014

Bildiriler

1. A fast and convenient UPLC - MSMS method for routine analysis of GALT activity from dried blood spot., BCLF, Emerging Sources Citation Index (ESCI), 44, 67 - 67, 27.10.2019 - 31.10.2019

2. A specific, sensitive, simplified and fast LC– MS/MS method for plasma Lyso-GB3 levels, 44th FEBS Congress, Scopus, 9, 65 - 431, 06.07.2019 -11.07.2019

3. The decision making levels of urine tetrasaccharide for diagnosisof Pompe disease, EUROMEDLAB2019, Pubmed, 0 - 0, 23.05.2019 - 25.05.2019

4. Validation of a new LC-MS/MS method for serum/saliva cortisol measurement and comparison with commercial ELISA/CLIA methods, 23rd IFCCEFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab), WoS, 493, 0 - 0, 19.05.2019 - 23.05.2019

5. DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED BIOSENSOR SYSTEM FOR DETERMINATION OF PREDNISOLON, TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi/TBS International Biochemistry Congress, 0 - 0, 26.10.2018 - 30.10.2018

6. DEVELOPMENT OF UPLC MS MS METHOD BASED FOR THE DETERMINATION OF CORTISOL IN HUMAN SERUM AND SALIVA, TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi/ TBS International Biochemistry Congress, 0 - 0, 26.10.2018 - 30.10.2018

7. Evaluation of anti-inflammatory potential and LC-MS/MS analysis of different standards, International Congress of Agriculture, Environment and Health (ICAEH), 0 - 0, 26.10.2018 - 28.10.2018

8. Mikroalg Ekstrelerinin LC MS MS Çalışmalarında Fenolik Bileşikler için Uygun Standardizasyon Yönteminin Belirlenmesi, Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, 0 - 0, 26.10.2018 - 28.10.2018
9. Propolisteki Fenolik İçeriklere Coğrafi Orijinin Etkileri, International Congress of Agriculture, Environment and Health (ICAEH), 816 - 827, 26.10.2018
10. Development an amperometric microbial-enzyme hybrid cholesterol biosensor based on ionic liquid MWCNT carbon paste electrode, 43rd FEBS Congress, 0 - 0, 07.07.2018 - 12.07.2018
11. Correlation of Vitamin D Status with Obesity Among Young Male Workers, 25th European Congress on Obesity, 11, 186 - 186, 23.05.2018 - 26.05.2018
12. Düünden Bugüne EÜTF Çocuk Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları BD Lizozomal Depo Hastalıkları Tanı Laboratuvarı Verileri, VI. Uluslararası katılımlı Lizozomal hastalıklar kongresi, 31 - 31, 11.04.2018 -
13. LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITIES OF CHILDREN ARE HIGHER THAN ADULTS: A CHALLENGE FOR REFERENCE INTERVALS /CUT OFF LIMITS, ICPLM, 0 - 0, 20.10.2017 - 22.10.2017
14. Effect of different extraction techniques on antiinflammatory activity of propolis, International Biochemical congress, 42, 0 - 0, 19.09.2017 - 23.09.2017
15. The effect of cultivation conditions on antioxidant-antiinflammatory capacities and phenolic compounds content of *Chlorella miniata* extracts, International Biochemical Congress, 42, 0 - 0, 19.09.2017 - 23.09.2017
16. Investigation of utility of homocystine as an internal standard for the determination of leukocyte cystine level by LC MS MS method, 42nd Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS) on From Molecules to Cells and Back, WoS, 284, 335 - 335, 10.09.2017 - 14.09.2017

17. Effect of The Extraction Methods on Antiinflammatory Activity of Propolis, 5 th International Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress, 0 - 0, 01.11.2016 - 05.11.2016
18. Development and validation of an ultra performance liquid chromatographic tandem mass spectrometry UPLC MS MS method for determination of cystine in leukocytes, EFLM, 0 - 0, 24.09.2016 - 27.09.2016
19. Study of blood collection and sample preparation for analysis of leukocyte cystine level by LC MS MS method, EFLM, 0 - 0, 24.09.2016 -27.09.2016
20. Simultaneous determination of epinephrineand dopamine by using Candida tropicalisyeast cells immobilized in a carbon pasteelectrode CPE modified with single wallcarbon nanotube SWCNT, 41st FEBS Congress, 0 - 0, 03.09.2016 - 08.09.2016
21. How preeclampsia affects oxidant status and antiinflammatory potential of breast milk?, 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, WoS, 283, 173 - 173, 03.09.2016 - 08.09.2016
22. The 1st Turkish in vitro diagnostic symposium evaluation, 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, WoS, 283, 276 - 276, 03.09.2016 - 08.09.2016
23. Phenolic content and potential anti-inflammatory effects of Myrtus communis L. products, 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, WoS, 283, 74 - 74, 03.09.2016 - 08.09.2016
24. Myrtus communis L. Çaylarının Potansiyel Anti-inflammatuar Etkileri, XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 44 - 44, 03.11.2015 –

Kitapta bölümler

1. İleri Mitokondriyel Tıp, Mitokondri ve Kalp Hastalığı, Celsus Kitabevi, Mesleki Kitap, 249 - 267, 2019

2. Biosensors Micro and Nanoscale Applications, Molecularly Imprinted Sensors — New Sensing Technologies, INTECH, Diğer, Ders Kitabı, 85 - 108, 2015

Bilimsel yayınlarda hakemlikler

1. SCI-E Kapsamındaki Dergi, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2020
2. SCI-E Kapsamındaki Dergi, CURRENT ANALYTICAL CHEMISTRY, 2018
3. Diğer Dergiler, Current Biomarkers, 2018
4. SCI-E Kapsamındaki Dergi, ELECTROANALYSIS, 2017
5. Diğer Dergiler, Current Diabetes Reviews, 2016

Bilimsel kuruluşlardaki üyelikler

1. Mesleki Dernek, Türk Biyokimya Derneği, Üye, Türkiye, 2015 –
2. Mesleki Dernek, Türk Biyokimya Derneği, Sayman, Türkiye, 2021 –

Ödüller

1. Kongre, Konferans, Festival veya Sempozyum Kurullarınca Verilen Ödül, En İyi Poster 2.lık Ödülü, Bilimsel/mesleki Çalışmalardan Alınan Ödül, Uluslararası Biyokimya Kongresi, 2018
2. Diğer, En iyi poster ödülü - Best poster award, Diğer Ödüller, 5Th Eflm-Uems European Joint Congress İn Laboratory Medcine, 2018

Burslar

1. Diğer, EFLM Bursaries for Young Scientists, İtalya, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2022 - 2022
2. Diğer, FEBS Kongre Bursu, Türkiye, FEBS, 2019 - 2019

3. Diğ er, Young Scientist, Türkiye, FEBS (Federation of Biochemical Society), 2018 - 2018

4. Diğ er, Kongre bursu, Türkiye, FEBS (Federation of Biochemical Society), 2017 - 2017

Kongre ve sempozyumlar

1. Kongre, 3. İ n Vitro Diyagnostik Sempozyumu "Metabolik Hastalıklar", 3. İ n Vitro Diyagnostik Sempozyumu "Metabolik Hastalıklar", Katılımcı, Türkiye, 2018

2. Kongre, 43rd FEBS Congress, 43rd FEBS Congress, Katılımcı,  ek Cumhuriyeti, Praha, 2018

3. Kongre, International Biochemistry Congress (Uluslararası Biyokimya Kongresi), International Biochemistry Congress (Uluslararası Biyokimya Kongresi), Katılımcı, Türkiye, İ zmir, 2018

4. Kongre, Redox-omic Technologies and their Application in Health and Disease, Redox-omic Technologies and their Application in Health and Disease, Katılımcı, Yunanistan, 2018

5. Kongre, 2. İ n Vitro Diyagnostik Sempozyumu "Biyobelirteçler", 2. İ n Vitro Diyagnostik Sempozyumu "Biyobelirteçler", Katılımcı, Türkiye, 2017

6. Kongre, 42nd FEBS Congress, 42nd FEBS Congress, Katılımcı, İ srail, Yerushalayim, 2017

7. Kongre, 1. İ n Vitro Diyagnostik Sempozyumu, 1. İ n Vitro Diyagnostik Sempozyumu, Katılımcı, Türkiye, İ zmir, 2016

8. Kongre, 4th EFLM-UEMS Congress, 4th EFLM-UEMS Congress, Katılımcı, Polonya, Warszawa, 2016

9. Kongre, 1. Ulusal Biyosensör Kongresi, 1. Ulusal Biyosensör Kongresi, Katılımcı, Türkiye, Tekirdağ, 2014

10. Kongre, 44th World Chemistry Congress, 44th World Chemistry Congress, Katılımcı, Türkiye, İstanbul, 2013
11. Kongre, 6th Black Sea Conference on Analytical Chemistry, 6th Black Sea Conference on Analytical Chemistry, Katılımcı, Türkiye, Trabzon, 2013
12. Kongre, 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, Katılımcı, Türkiye, İzmir, 2011