



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**PROSTAT KANSER EKSOZOM VE
İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ İÇİN OPTİK VE
ELEKTROKİMYASAL TABANLI BİYSENSÖR
PLATFORMLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

ELİF ÇALIK KAYIŞ

ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

OCAK 2026



**PROSTAT KANSER EKSOZOM VE İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ İÇİN
OPTİK VE ELEKTROKİMYASAL TABANLI BİYSENSÖR
PLATFORMLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Elif ÇALIK KAYIŞ

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2026

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif ÇALIK KAYIŞ

12/12/2026

PROSTAT KANSER EKSOZOM VE İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ İÇİN OPTİK
VE ELEKTROKİMYASAL TABANLI BİYOSENSÖR PLATFORMLARININ
GELİŞTİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Elif ÇALIK KAYIŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2026

ÖZET

Bu tez çalışmasında, eksozom ve IgG için yenilikçi ve hassas biyosensör platformları geliştirilmiştir. Çalışmada, çevre dostu kağıt tabanlı Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS) platform kullanılarak eksozom tayini gerçekleştirilmiştir. Kağıt platformlar nanostar şeklinde altın nanopartiküllerle modifiye edilip anti-CD9 antikoru ile konjuge edilmiştir; bu sayede eksozomlar kağıt platform yüzeyinde etkin şekilde yakalanabilmiştir. Sandviç yapısında immünoassay tasarımı, AuNÇ@DTNB@anti-CD9 YZRS etiketi ile gerçekleştirilmiş ve tek damla modeli kullanılarak sadece 2.0 µL numune ile analiz yapılmıştır. Geliştirilen tek damla kağıt tabanlı YZRS immüno analiz çalışması, $1,0 \times 10^3$ ile $1,0 \times 10^9$ eksozom partikül/mL arasında doğrusal bir aralık göstermiş ve korelasyon katsayısı (R^2) 0,9903 olarak bulunmuştur. Tespit limiti $9,9 \times 10^1$ eksozom partikül/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, yapay idrar örneklerine konsantrasyonu bilinen eksozom eklenerek çalışılmıştır ve sistemin doğruluğu ortalama %95,1 geri kazanım değeri elde edilmiştir. İkinci olarak, eksozomların örneklerden etkin izolasyonunu sağlamak amacıyla manyetik nanopartikül-mikroçip tabanlı bir biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörün analitik performansı, $1,0 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^{10}$ partikül/mL aralığında geniş doğrusal aralık, $0,14 \times 10^1$ partikül/mL düşük tespit limiti ve yüksek korelasyon ($R^2 = 0,997$) ile değerlendirilmiştir. Son olarak, yatay akışlı test şeridi üzerinde IgG tayini için geliştirilen elektrokimyasal yöntemde, AuNP'lerden elde edilen sinyalleri kantitatif olarak ölçülmüş ve İnsan IgG tayininde yüksek duyarlılık sağlamıştır (Tespit limiti = 0,8 ng/mL). Elde edilen sonuçlar, geliştirilen YZRS tabanlı ve elektrokimyasal biyosensör platformlarının, biyolojik örneklerde hızlı, hassas ve güvenilir analiz imkânı sunduğunu göstermektedir.

Bilim Kodu : 1.004
Anahtar Kelimeler : Prostat kanser, eksozom tayini, İmmünoglobülin G, YZRS, elektrokimyasal biyosensör
Sayfa Adedi : 100
Danışman : Prof. Dr. Uğur TAMER
İkinci Danışman : Prof. Dr. Hakan ATEŞ

DEVELOPMENT OF OPTICAL AND ELECTROCHEMICAL-BASED BIOSENSOR
PLATFORMS FOR PROSTATE CANCER EXOSOME AND IMMUNOGLOBULIN G
DETERMINATION

(Ph. D. Thesis)

Elif ÇALIK KAYIŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2026

ABSTRACT

In this thesis, innovative and sensitive biosensor platforms were developed for the detection of exosomes and IgG. Exosome determination was performed using an environmentally friendly paper-based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) platform. The paper substrates were modified with gold nanostar nanoparticles and conjugated with anti-CD9 antibodies, enabling efficient capture of exosomes on the paper surface. A sandwich-type immunoassay was designed using an AuNS@DTNB@anti-CD9 SERS tag, and analyses were carried out using a single-drop model with only 2.0 µL of sample. The developed single-drop paper-based SERS immunoassay exhibited a linear response in the range of 1.0×10^3 to 1.0×10^9 exosome particles/mL, with a correlation coefficient (R^2) of 0.9903. The limit of detection was determined to be 9.9×10^1 exosome particles/mL. Accuracy of the system was evaluated by spiking artificial urine samples with known concentrations of exosomes, yielding an average recovery of 96.7%. Secondly, a magnetic nanoparticle–microchip-based biosensor was developed to enable efficient isolation of exosomes from samples. The analytical performance of the biosensor demonstrated a wide linear range of 1.0×10^2 to 1.0×10^{10} particles/mL, a low detection limit of 0.14×10^1 particles/mL, and a high correlation coefficient ($R^2 = 0.997$). Finally, in the electrochemical method developed for IgG determination on a lateral flow test strip, signals obtained from AuNPs were quantitatively measured, providing high sensitivity for human IgG detection (limit of detection = 0.8 ng/mL). Overall, the results demonstrate that the developed SERS-based and electrochemical biosensor platforms offer rapid, sensitive, and reliable analytical capabilities for biological samples.

Science Code	: 1.004
Key Words	: Prostate cancer, exosome detection, Immunoglobulin G, SERS, electrochemical biosensor
Page Number	: 100
Supervisor	: Prof. Dr. Uğur TAMER
Co-Supervisor	: Prof. Dr. Hakan ATEŞ

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca beni her zaman destekleyen, motivasyonumun düştüğü anlarda yanımda olarak yeniden motive olmamı sağlayan, merak ettiğim konuları paylaştığımda benimle birlikte aynı ilgi ve heyecanı duyan, akademik duruşu ve rehberliğiyle daima örnek olan ve her şeyden önemlisi bu yolda ilerleyebileceğime yürekten inanan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Uğur Tamer'e ,

Laboratuvarda öğrendiğim pek çok şeyi borçlu olduğum; bana sorgulamayı, üretmeyi ve düşünmeyi öğreten; bir gün bambaşka bir laboratuvarda, kimseye bağlı kalmadan tek başıma nasıl çalışabileceğimi gösteren; desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Hilal Torul'a,

Doktora çalışmam sürecinde, tezimi bir ileri boyuta taşımam konusunda bana laboratuvar imkânlarını cömertçe sunan ve ziyaretçi doktora öğrencisi olarak grubunda çalışma fırsatı verdiği için minnettar olduğum, araştırma vizyonu, akademik disiplini ve bilimsel yaklaşımı ile örnek olan, bakış açımı geliştirmemde önemli katkılar sağlayan Prof. Dr. Arben Merkoçi'ye,

Bu süreç boyunca deneylerim konusunda bana rehberlik eden ve birçok açıdan gelişimimi samimiyetle destekleyen Dr. Daniel Quesada-Gonzalez'e,

Her başarıyı paylaştığımda beni içtenlikle tebrik eden; rehberliği, samimiyeti ve destekleyici yaklaşımıyla her zaman yanımda olan ikinci danışman hocam Prof. Dr. Hakan Ateş'e,

Tüm süreçlerimde yanımda olarak desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Özcan Yalçinkaya'ya,

Prof. Dr. Nusret Ertaş, Prof. Dr. Hayriye Eda Şatana Kara, Ar. Gör. Dr. Hüma Yılmaz hocalarım başta olmak üzere Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarımızda birbirimize destek olduğumuz, birlikte öğrenip birlikte yorulduğumuz; hem emeklerimizi hem de güzel anılarımızı paylaştığımız değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Merve Çalımcı'ya, Eczacı Emine Yıldırım'a ve Büşra Karataş'a,

Bilgi birikimini her zaman benimle paylaşan, yol gösteren değerli hocam Dr.Tuğba Tezcan’a,

Yürütücülüğünü yapmış olduğum 1002-B Acil Destek Modülü (124S786) projesi için , 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı için ve 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna, almış olduğum YÖK 100/2000 bursumdan dolayı da Yükseköğretim Kuruluna,

Laboratuvar imkanlarını ve bilgi birikimini her zaman benimle paylaşan arkadaşım Dr.Öğr.Üyesi Doğukan Doyduk’a,

Hayatımın tüm süreçlerinde her zaman yanımda olan beni destekleyen arkadaştan öte kardeşlerim olan Safiye Çakır ve Furkan Çakır’a,

Bu süreçte dünyaya gelen kızım Zeynep İlbilge’nin bakımını üstlenen, sayelerinde çalışmalarına devam edebildiğim özellikle desteğini hiçbir zaman unutamayacağım kız kardeşim Esra Çalık başta olmak üzere, biricik anne ve babam’a, ablam Nurhan Çalık’a, kız kardeşlerim Kevser Çalık ve Sema Çalık Peker’e, çalışmalarım sırasında arayıp bana neşe katan biricik abim Hasan Çalık’a, varlıklarıyla hayatıma neşe katan Ali’m ve Keremim’e,

Çalışmalarım boyunca çılgınca fikirlerimi bile tebessümle destekleyen, bana benden fazla güvenen, hem akademik hem psikolojik gelişmemde katkı sağlayan biricik eşim Ar.Gör. Ahmet Furkan Kayış’e,

Çalışmalarım boyunca en zor olan, seni bırakıp okula gitmekti. Ancak umuyorum ki bu süreçte hayatıma kattığım vizyon, ileride senin hayatına daha geniş bir bakış açısı sunar. Tek gayem; hayatını mutlu, huzurlu ve kendin olarak sürdürebilmen. Katlandığım pek çok zorluğun temelinde bu amaç vardı. Bu yolculukta en büyük teşekkür, her şeyden önce sana, canım kızım Zeynep İlbilgem’e.

teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Prostat Kanseri	5
2.2. Hücre Dışı Veziküller	5
2.2.1. Eksozomlar	6
2.3. İmmünoglobulinler.....	10
2.3.1. İmmünoglobulin G	12
2.3.2. İmmünoglobulin G ile kanser ilişkisi	12
2.4. Biyosensörler.....	12
2.4.1. Biyosensörlerin çeşitleri	13
2.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller.....	16
2.5.1. Manyetik demir oksit nanopartiküller	16
2.5.2. Altın nanopartiküller.....	17
2.6. Yatay Akışlı İmmunoassay Test Şeritleri	18
2.7. Elektrokimyasal Yatay Akışlı İmmunoassay Test Şeritleri	21
2.7.1. Diferansiyel puls voltametri.....	21
2.8. Mikroçip Sistemleri.....	22

	Sayfa
2.9. Raman Spektroskopisi.....	24
2.9.1. Raman spektroskopisinin temelleri	25
2.9.2. Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi	26
2.9.3. Kullanılan YZRS platformları	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereç	31
3.1.1. Kimyasallar.....	31
3.1.2. Kullanılan cihazlar	32
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Kağıt tabanlı platform kullanılarak eksozom tayini ve YZRS uygulamaları.....	33
3.2.2. Manyetik nanopartikül kullanarak mikroçip ve YZRS tabanlı eksozom tayini.....	37
3.2.3. Elektrokimyasal yatay akış analizi kullanarak IgG tayini	41
4. BULGULAR	47
4.1. Kağıt Tabanlı Platform Kullanılarak Eksozom Tayini ve YZRS Uygulamaları	47
4.2. Manyetik nanopartikül kullanarak mikroçip ve YZRS tabanlı eksozom tayini..	66
4.3. Elektrokimyasal Yatay Akış Analizi Kullanarak IgG Tayini	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Eksozom tayini için kâğıt YZRS platformlarının gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları	65
Çizelge 4.2. Eksozom tayini için kâğıt YZRS platformlarının ticari ekran baskılı elektrotlarla karşılaştırılması (n = 3)	65
Çizelge 4.3. Konsantrasyonu bilinen eksozom standartlarının yapay idrar örneklerine eklenmesiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları (n = 3).....	66
Çizelge 4.4. Eksozom tayini için üç farklı seriye ait kantitatif parametreler ve istatistiksel veriler	71
Çizelge 4.5. Eksozom tayini için YZRS tabanlı pasif mikroçip sensörün gün içi ve günler arası doğruluk sonuçları	73
Çizelge 4.6. Konsantrasyonu bilinen eksozom standartlarının yapay idrar örneklerine eklenmesiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları (n = 3).....	75

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Prostat dokusunda normal, PIN, lokalize ve metastatik kanser evrelerinin histolojik görünüşleri.....	5
Şekil 2.2. Eksozomların şekilsel görüntüsü	7
Şekil 2.3. IgG molekülünün şekilsel gösterimi	11
Şekil 2.4. IgG'nin alt sınıflarının şekilsel gösterimi	11
Şekil 2.5. Biyosensörlerin şematik gösterimi	13
Şekil 2.6. Elektrokimyasal biyosensörün çalışma prensibine ait şematik gösterim	15
Şekil 2.7. Kağıt tabanlı yatay akışlı immunoassay test şeridinin yapısı	19
Şekil 2.8. Diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği	22
Şekil 2.9. A) (i) Mikro akışkan çipin üretim aşamaları. (ii) Mikro akışkan çipin genel yapısı, B) (i) Daha önce kullanılan mikro akışkan çipin bir örneği, (ii) ve (iii) Mikro akışkan çipin ilk akış testi sonuçları	24
Şekil 2.10. a) Chandrashekhara Venkata Raman, b) ilk Raman spektrometresi	25
Şekil 2.11. Küresel metalik nanoparçacıklar üzerindeki yüzey plazmonlarının şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.1. Kağıt elektrotun üretim prosedürünün şematik gösterimi	34
Şekil 3.2. A) Kağıt tabanlı YZRS platformunun üretiminin şematik gösterimi, B) Hazırlanan kağıt tabanlı YZRS platformu kullanılarak eksozom tayini için tek damla immünoassay prosedürünün şematik gösterimi	37
Şekil 3.3. A) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}@\text{Eksozom}$ konjugatının hazırlanması, B) $\text{AuNC}@\text{DTNB}@\text{anti-CD9}$ konjugatının hazırlanması, C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}@\text{Eksozom}@\text{AuNC}$ sandviç immünoassay yapısının oluşumunu gösteren şekilsel gösterim	41
Şekil 3.4. Geliştirilen elektrokimyasal yatay test şeridinin şekilsel görüntüsü.....	44
Şekil 4.1. Anti-CD9 konsantrasyonu optimizasyonuna dayalı olarak üç farklı eksozom konsantrasyonundaki eksozom örneklerinin YZRS sinyal şiddetleri.....	47
Şekil 4.2. İki farklı eksozom konsantrasyonu için YZRS sinyal şiddeti üzerinde A) beş farklı inkübasyon süresinin ve B) üç farklı inkübasyon sıcaklığının etkisinin incelenmesi	48

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. HAuCl ₄ çözeltisinin konsantrasyon optimizasyonu sonucunda farklı yüzeylerden elde edilen DTNB'nin YZRS sinyal şiddetleri.....	49
Şekil 4.4. A) Farklı HAuCl ₄ konsantrasyonları ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş KE platformunun döngüsel voltamogramları, B) sistemden geçen yük miktarı, C) Randles-Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanan KE platformlarının elektrokimyasal yüzey alanları, D1-D4) Farklı HAuCl ₄ konsantrasyonları ile modifiye edilmiş KP SEM görüntüleri: D1) 0,00625 M, D2) 0,0125 M, D3) 0,0125 M, D4) 0,05 M HAuCl ₄	50
Şekil 4.5. A) Optimal koşullar altında oluşan AuNP filmine ait yüksek çözünürlüklü SEM görüntüsü, B) Karbon ve altın nanostarların SEM kesit görüntüsü, C) Karbon tabakasının kalınlığını gösteren SEM görüntüsü, D) Karbon tabakası üzerindeki altın nanostarların kalınlığını gösteren SEM görüntüsü	52
Şekil 4.6. Farklı HAuCl ₄ konsantrasyonlarında elektrokimyasal AuNP biriktirilmesi sonrası KE'nun fotoğrafları; KP1) 0,05 M, KP2) 0,025 M, KP3) 0,0125 M ve KP4) 0,00625 M HAuCl ₄	53
Şekil 4.7. A) 11-MUA modifikasyonunda farklı konsantrasyonların, B) değişen alkol içeriğinin NC membranın çözünmesine etkisini gösteren fotoğraflar	54
Şekil 4.8. A) AuNÇ ve AuNK kullanılarak elde edilen DTNB'nin YZRS sinyal şiddetleri, B) DTNB modifikasyonu öncesi (sol) ve sonrası (sağ) AuNS görüntüleri.....	55
Şekil 4.9. A) UV-Vis spektrumu ve B) Çubuk şeklindeki altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	55
Şekil 4.10. Altın nanoçubuk sentezinde kullanılan 0,01 M altın çözeltisi miktarları sırasıyla 100,0 µL (A), 250,0 µL (B), 500,0 µL (C), 750,0 µL (D), 1000,0 µL (E) olarak incelenmiş ve çözeltilerin fotoğrafı (F) gösterilmiştir	57
Şekil 4.11. Değişen AuNÇ miktarlarına karşı elde edilen DTNB'nin YZRS sinyal şiddetleri.....	58
Şekil 4.12. Farklı oranlardaki (0.01%, 0.05%, 0.1% ve 0.5%) Tween-20 çözeltilerinin DTNB'nin Raman sinyal şiddeti üzerindeki etkisi	59
Şekil 4.13. Farklı objektif lensler kullanılarak kâğıt YZRS platform üzerinde 1.0×10 ⁶ eksozom partikül/mL konsantrasyonundaki eksozom örneğinin YZRS sinyalleri.....	60
Şekil 4.14. Anti-CD9@DTNB@AuNÇ'ın stabilitesini değerlendirmek için elde edilen YZRS şiddeti.....	60
Şekil 4.15. Eksozom standartlarının CTEM görüntüleri	62

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. A) Farklı konsantrasyonlardaki eksozomların kantitatif değerlendirilmesi için DTNB'nin YZRS spektrumları, B) 1330 cm ⁻¹ 'de DTNB'nin YZRS sinyal şiddetlerindeki değişimlere dayanarak elde edilen ve 1,0×10 ³ – 1,0×10 ⁹ partikül/mL aralığındaki eksozom konsantrasyonlarını gösteren kalibrasyon grafiği	63
Şekil 4.17. PBS içinde hCG, rEPO, hLH, sistein, glikoz, IgG, albümin, dopamin, fenilalanin ve eksozomların YZRS şiddetleri; ayrıca idrar matriksi ve idrar matriksine eklenen 1.0×10 ⁶ partikül/mL standart eksozomların anti-CD9/AuNPs@PS biyosensörü ile ölçülen YZRS şiddetleri	64
Şekil 4.18. Sentezlenen Fe ₃ O ₄ @AuNP'lerin fotoğrafı	67
Şekil 4.19. A)Fe ₃ O ₄ 'e ait FT-IR spektrumu, B) Fe ₃ O ₄ @AuNP'e ait FT-IR spektrumu, C)Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ @AuNP'e ait UV-Vis spektrumu	68
Şekil 4.20. 1.0 × 10 ⁸ eksozom partikül/mL ile objektif lenslerin (A), veri toplama süresinin (B) ve lazer güç seviyesinin (C) YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisini gösteren grafik.....	69
Şekil 4.21. 1.0 × 10 ⁶ eksozom partikül/mL kullanılarak anti-CD9 konsantrasyonlarının YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisini gösteren grafik.....	70
Şekil 4.22. A) Farklı eksozom konsantrasyonlarında eksozomların kantitatif değerlendirmesi için DTNB'nin YZRS spektrumları, B) 1330 cm ⁻¹ dalga sayısındaki DTNB YZRS sinyal şiddetindeki değişimlere dayanarak ve eksozom konsantrasyon aralığı (1.0 × 10 ² – 1.0 × 10 ¹⁰ partikül/mL) temel alınarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	71
Şekil 4.23. PBS içindeki hCG, rEPO, hLH, sistein, glikoz, IgG, albümin, dopamin, fenilalanin ve eksozomların yanı sıra idrar matriksine eklenen standart eksozomlar varlığında elde edilen YZRS sinyal şiddetleri.....	72
Şekil 4.24. SpeedBeads manyetik karboksilat modifiye nanopartiküller ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerin YZRS sinyal şiddetleri üzerindeki etkisini gösteren grafik.....	73
Şekil 4.25. A) Pasif mikroçip sensörün görüntüsü, B) Son odacığı altın plaka enregre edilmiş pasif mikroçip sensörün görüntüsü, C) Son odacığı altın plakalı ve altın plakası olmayan pasif mikroçip sensörlere immünoassay yöntemi uygulandıktan sonra elde edilen YZRS sinyal şiddeti	74
Şekil 4.26. Sitrat kaplı küresel altın nanopartiküllere ait UV-Vis spektrumu ve nanopartiküllerin 50 nm ölçekteki TEM görüntüsü.....	76
Şekil 4.27. A) Konjugasyon çözeltisi olarak 10 mM pH 7.4 PBS içerisinde %10 sukroz kullanıldığında elde edilen sonuçlar, B) Konjugasyon çözeltisi olarak %5 sukroz, %1 BSA ve %0.5 Tween-20 içeren 10 mM pH 7.4 PBS kullanıldığında elde edilen sonuçlar	77

Şekil	Sayfa
Şekil 4.28. Optimizasyon çalışmalarında değerlendirilmiş olan elektrokimyasal parametreleri gösteren grafikler A) dengeleme süresi, B) uygulanan darbe potansiyeli, C) tarama hızı ve D) uygulanan darbe süresi sonuçları.....	78
Şekil 4.29. Hidroklorik asit konsantrasyonunun optimizasyonunu gösteren grafik	79
Şekil 4.30. Kağıt elektrot, numune pedi, konjugasyon pedi ve adsorban pedinin bir araya getirilmesiyle oluşturulan 15 mm genişliğindeki elektrokimyasal yatay akış test stripti.....	80
Şekil 4.31. A) 5–1000 ng/mL aralığındaki insan IgG derişimlerine ait voltamogramlar, B) Şekil A'dan elde edilen elektrokimyasal yatay akış analizine ilişkin kalibrasyon grafiğı, C) ImageJ ile analiz edilerek elde edilen kalibrasyon eğrisi, D) Şekil C'den türetilen kalibrasyon grafiğı	81
Şekil 4.32. Geliştirilen elektrokimyasal yatay akış test şeritlerinin görüntüsü.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

μL	Mikrolitre
dak	Dakika
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ms	Milisaniye
nm	Nanometre

Kısaltmalar

Açıklamalar

Au	Altın
AuNÇ	Altın nanoçubuk
AuNP	Altın nanopartiküller
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
CTAB	Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) (5,5'-Ditiyobis-(2nitrobenzoikasit))
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-Etilkarbodimid Hidroklörür
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu
ELISA	Enzime Bağlı İmmunosorbent Testi
EV	Ekstraselüler Vezikül (Extracellular Vesicle)
Fe@Au MNP	Altın kaplı demir manyetik nanopartikül
IgG	Immunoglobulin G
İTK/TLC	İnce Tabaka Kromatografisi

Kısaltmalar	Açıklamalar
KE	Kağıt elektrot
LFIA	Lateral flow immunoassay (Yatay akışlı immunoassay)
LOD	Teşhis Limiti
LOQ	Tayin Limiti
MES	2-(N-Morfolino)etanesulfonik asit
MNP	Manyetik nanopartikül
MUA	11-Merkaptoundekanoik asit
NC	Nitroselüloz
NHS	N-Hidroksisülfo- Süksinimid Sodyum Tuzu
NTA	Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Analysis)
PBS	Fosfat tamponu
PMMA	Poli(metilmetakrilat)
RE	Referans Elektrot
SD	Standart Sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
UV-Vis	Ultraviolet-visible (Mor ötesi-görünür)
YZRS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Kanser, normal hücrelerle kıyaslandığında, sürekli büyüme ve çoğalma eğilimi gösteren anormal hücrelerden oluşan bir topluluktur. Bu anormal hücreler çevre dokularında en az bir bazal membran bölgesini seçerek bu bölgelere yayılım gösterir. Seçilen bu dokuda büyür ve daha uzak dokulara hızlıca yayılım gösterebilir. Bir lezyonun kanser olarak tanımlanabilmesi için yalnızca bir özelliğe sahip olması değil, bu özelliklerin tümüne birden sahip olmasına bağlıdır. Yani, kanserin tanımı yalnızca hızlı büyüme değil; aynı zamanda çevre dokulara yayılma, bazal membranı aşma, mezenşimde büyüme ve metastaz yapabilme gibi bir dizi özelliğin toplamıdır (Clark, 1991) . Küresel Kanser Gözlem Verisi (GLOBOCAN) 2022 verilerine göre, erkek popülasyonunda en sık görülen kanser türleri prostat, akciğer ve kolorektal kanserlerdir. Prostat kanseri (PK), dünya genelinde erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir; ancak PK'nın oluşumu ve metastazının altında yatan kesin mekanizmalar hâlâ tam olarak bilinmemektedir. Birçok çalışma, tümör mikroçevresinin, tümörlerin oluşumu ve gelişimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir (Zhang ve diğerleri, 2025).

Kanser, günümüzde görülme sıklığı giderek artan ve başlıca ölüm nedenlerinden biri haline gelen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bununla birlikte, tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler sayesinde kanser hastalarının yaşam süreleri ve sağkalım oranlarında belirgin artışlar gözlenmektedir (Butow, Fardell ve Smith, 2015). Türkiye'de 2014 yılında gerçekleştirilen bir tarama çalışmasının raporlarına göre, kanser tanısı alan bireylerin %51,6'sının hayatta kaldığı belirlenmiştir (Gültekin, Boztaş ve Utku, 2014). Kanserinin erken teşhisi sayesinde uygulanan tedavinin başarısının artması, hastanın hayatta kalma süresinin uzaması, herhangi bir metastaz olmadan tedaviye başlanması ve bu sayede hastanın yaşam kalitesinin korunması sağlanabilmektedir. Bu nedenle kanserin herhangi bir metastaza uğramadan teşhis edilebilmesi oldukça önemlidir. Son yıllarda, biyolojik sıvılarda bulunan ekstraselüler veziküller, potansiyel kanser biyobelirteçleri olarak büyük ilgi görmektedir.

Ekstraselüler veziküller (EV'ler), canlı hücreler tarafından salınan, genellikle nano ile mikrometre arası boyutlarda değişen küçük ölçekli parçacıklardır. Bu yapılar biyolojik sıvılarda ve hücre kültürü süpernatantlarında bulunmaktadır. EV'ler, boyutları ve biyogenez mekanizmalarına göre üç ana sınıfa ayrılır: apoptotik cisimcikler (1000–5000 nm), mikroveziküller (MV'ler veya ektozomlar, 150–1000 nm) ve eksozomlar (40–150 nm).

EV'ler, tetraspaninler, enzimler ve vezikül taşıyım proteinleri gibi proteinlerin yanı sıra, mRNA, miRNA ve zaman zaman DNA gibi çeşitli nükleik asitleri çevreleyen lipid çift katmanlı bir zar yapısından oluşur. Ayrıca, hücre tanıma süreçlerinde görevli lipitler ve karbonhidratlar ile sitokinler, büyüme faktörleri gibi biyolojik olarak aktif molekülleri de içerirler. Tetraspanin ailesinde CD9, CD63, CD81, CD82 ve TSPAN8 dahil yaklaşık 33 sabit üye bulunur. CD9, CD63 ve CD81 gibi tetraspaninler eksozom zarlarında bol miktarda bulunurken, ektozom zarları daha düşük oranda tetraspanin içerir ancak reseptörler, glikoproteinler ve metalloproteinazlar gibi diğer proteinleri bolca bulundurur. Öte yandan, apoptotik cisimcikler ideal olarak, çekirdeğe özgü parçalarla birlikte mitokondri, golgi aygıtı, ribozomlar ve endoplazmik retikulum gibi organelleri içerir. Farklı EV türleri bazı ortak bileşenlere sahip olsa da, her birinin diğerlerinden ayırt edici kendine özgü biyobelirteçleri vardır. Son zamanlarda yapılan yayınlar, prostat kanseri hücrelerinden türeyen eksozomların, idrar örnekleri yoluyla hastalığın invazif olmayan (non-invaziv) takibi ve erken teşhisi için potansiyel taşıdığını vurgulamaktadır. CD9, EV'lerin yüzeyinde yaygın bulunduğundan, eksozom tespiti için sıkça hedeflenmektedir (Kayış ve diğerleri, 2025).

Antikorlar, diğer adıyla immünoglobulinlerin (Ig), antijenleri (örneğin bakteri veya virüsleri) tek tek bağlayıp ortadan kaldırmak ve hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla proteinlere bağlanarak hücre aktivasyonu yoluyla iletişimi sağlamak gibi görevleri vardır (Schroeder Jr ve Cavacini, 2010a). İmmünoglobulinler temel olarak kendi içerisinde 5' e ayrılır. Bunlar; IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE olarak sınıflandırılırlar (Vidarsson ve diğerleri, 2014). İmmünoglobulinler kendi içlerinde kıyaslandığında, IgG serumda ve dokularda en fazla bulunan globulin türüdür (Jefferis ve Lefranc, 2009).

Eksozomlar protein, lipid ve nükleik asit gibi yapıları hücrelere taşıyarak hücreler arası iletişimi sağlarken, IgG antikorları ise bağışıklık sisteminin adaptif kısmında görev yaparak antijenleri tanır ve immün yanıtı başlatır. Ve böylece her ikisi de bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde görevlidir. Eksozomlar ve IgG, vücutta meydana gelen enfeksiyon veya tümör oluşumlarında, kanserin ilerleme düzeyi hakkında bilgi sağlayabilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır.

Biyomoleküllerin doğru ve etkin şekilde tespiti için geliştirilen yeni nesil biyosensörler, klasik yöntemlere kıyasla daha kısa sürede, daha az örnek hacmiyle ve daha yüksek

duyarlılıkla sonuç verebilmektedir. Bu bağlamda, Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi ve elektrokimyasal tabanlı sensör platformlar, yüksek hassasiyetleri ve düşük tespit limit değerleri sayesinde öne çıkmaktadır. YZRS, yüzey plazmon ve Raman aktif etiket kullanarak, etiketin parmak izi spektrumlarını takip ederek tanımlanmasını sağlarken, elektrokimyasal sensörler de spesifik bağlanma olaylarını hızlı ve kantitatif olarak tespit edebilme avantajı sunmaktadır.

Tez çalışmasının ilk bölümünde, idrar örneklerinde eksozom tespiti için yeni bir kağıt tabanlı YZRS platformu geliştirilmiştir. Kağıt YZRS yüzeyleri, eksozomların yakalanmasını kolaylaştırmak amacıyla nanoyıldız biçimli altın nanopartiküller (AuNP) ile elektrokimyasal olarak modifiye edilmiştir. Eksozomların yüzeyinde yüksek miktarda bulunan CD9 proteini üzerinden yakalamak için, kağıt yüzeyler üzerine anti-CD9 immobilize edilerek, eksozom tayini amacıyla immünoassay tabanlı bir YZRS stratejisi kullanılarak tanımlanmıştır. Plazmonik özellikleriyle bilinen altın nanoçubuklar (AuNÇ), yüksek YZRS sinyal şiddeti elde etmek için sandviç tipi immünoassay yapısında YZRS etiketleri olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, yapay idrar örneklerine konsantrasyonu bilinen eksozom standardı eklenerek çalışılmıştır ve sistemin doğruluğu ortalama %95,1 geri kazanım değeri elde edilmiştir. CD9 tespiti için anti-CD9 antikörlerinin kullanıldığı immünoreaksiyonlar aracılığıyla, eksozomlar pH 7.4 PBS ortamında başarıyla saptanmıştır. YZRS testi, CD9 yüzey antijenlerini başarıyla tespit etmiş ve bu yöntemin çeşitli biyolojik örneklerde eksozom tayini için yüksek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur (Kayaş ve diğerleri, 2025).

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, prostat kanseri tanısında eksozom kaynaklı biyobelirteçlerin kullanımını araştırmak ve bu biyobelirteçlerin tespiti için mikroakışkan çip tabanlı sistemler kullanılarak hassas, güvenilir ve non-invaziv bir yöntem geliştirilmiştir. Karmaşık matrikslerden eksozom izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla, manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4) sentezlenmiş ve YZRS sinyalini artırmak için altın ile kaplanarak $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ yapısı elde edilmiştir. Yüksek YZRS sinyal şiddeti sağlamak için, plazmonik özelliklere sahip altın nanoçubuk, sandviç tipi immünoassay yapısında YZRS etiketleri olarak kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğini doğrulamak amacıyla, konsantrasyonu bilinen eksozom standartları yapay idrar örneklerine eklenmiş ve doğruluk çalışması gerçekleştirilmiştir. Anti-CD9 antikörleri aracılığıyla gerçekleşen immün reaksiyonlar sonucunda, eksozomlar pH 7.4 PBS ortamında başarıyla tayin edilmiştir.

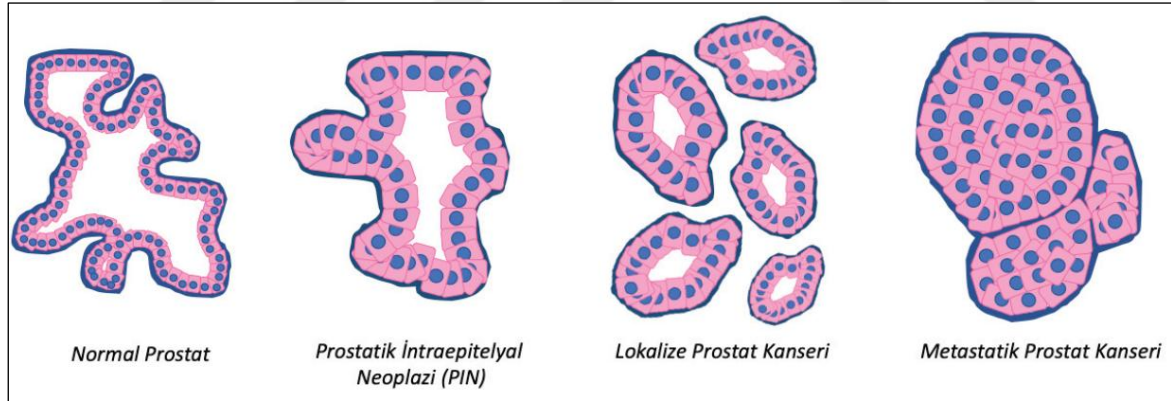
Tez çalışmasının üçüncü bölümünde, karbon ve gümüş boya tabanlı elektrotlar, yatay akış immünoassay (LFIA) sistemine entegre edilerek, geliştirilen platformun elektrokimyasal ölçüm sistemiyle değerlendirilmesiyle IgG tayini gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, çalışma elektrodu üzerinde yakalanan IgG proteinin bağlı olduğu altın nanopartiküllerin asidik ortamda protonlanması ve buna bağlı olarak da indirgenme potansiyelinin elektrokimyasal olarak takip edilmesiyle analiz gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, prostat kanseri eksozomların tespitine yönelik hem YZRS, hem de pasif mikroçip temelli iki farklı biyosensör sistemi ayrıca immünoglobulin G tayinine yönelik elektrokimyasal yatay akış analiz tabanlı biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu biyosensör sistemlerinin geliştirilmesinde, yüzey modifikasyonları, özgül bağlayıcı ajanlar olarak antikorlar kullanılarak nanomalzeme kullanımı ve gerçek örnek hazırlama süreçleri detaylı şekilde ele alınmıştır. Geliştirilen platformların analitik performansları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, seçicilik, hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve uygulama potansiyelleri araştırılmıştır. Bu tez çalışması, prostat kanseri ve kötü bağışıklık sistemi gibi ciddi ve yaygın bir sağlık problemleri için yenilikçi, hızlı ve güvenilir tanı yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamayı hedeflemektedir. Aynı zamanda geliştirilen biyosensör sistemleri, farklı hastalıklara özgü eksozomların ve farklı immünoglobülinlerin tespiti için de temel teşkil edecek şekilde genişletilebilir bir yapıya sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Prostat, erkek üreme sisteminin başlıca yardımcı bezidir. Prostat bezi, pelviste yer alan, ceviz büyüklüğünde, kapsülle çevrili, kas ve bez dokusundan oluşan, salgı üretme özelliğine sahip bir organdır. Prostat bezinin içinden üretra ve ejakülatuar kanal olmak üzere iki adet kanal geçmektedir. Üretra, mesaneden başlayarak prostatın içinden geçen ve idrar ile semen'in vücuttan atılmasını sağlayan kanaldır (Wu ve De Cicco, 2020). Ejakülatuar kanal ise seminal sıvıların üretraya taşınmasından sorumludur. Prostat bezinin içerisinde yaklaşık 50 adet tübüloalveolar yapıda küçük bez bulunur. Bu bezler, sekresyondan sorumlu özelleşmiş hücre topluluklarından oluşur. Bu hücre gruplarının genetik faktörler veya çeşitli çevresel etkenler sonucunda kontrolsüz biçimde çoğalması ve yayılması, prostat kanserinin gelişimine yol açmaktadır. Histolojik açıdan incelendiğinde; prostat kanseri normal dokuya göre prostatik intraepitelyal neoplaziye (PIN) dönüşüm gösterirken hastalık ilerledikçe lokal ve metastatik evrede belirgin fenotipik değişiklikler göstermektedir (Erzurumlu, 2021).



Şekil 2.1. Prostat dokusunda normal, PIN, lokalize ve metastatik kanser evrelerinin histolojik görünüşleri (Erzurumlu, 2021)

2.2. Hücre Dışı Veziküller

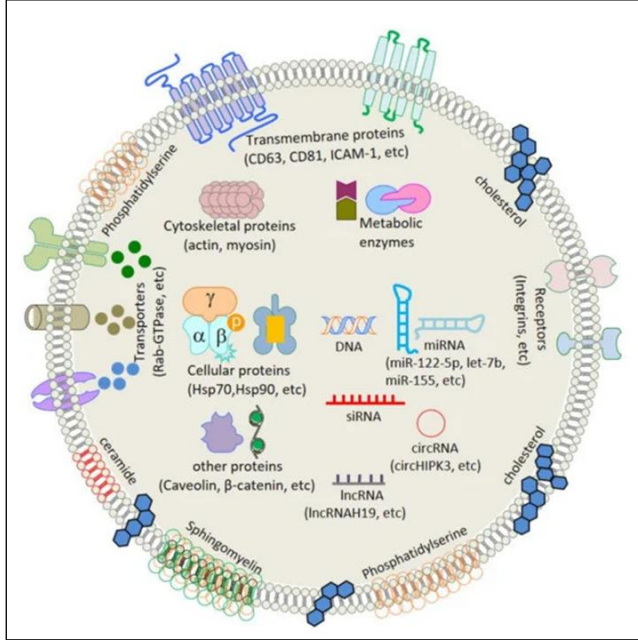
Hücre dışı veziküller (EV'ler), canlı hücreler tarafından salgılanan ve genellikle nano ile mikrometre aralığında değişen boyutlara sahip küçük ölçekli parçacıklardır (Malhotra ve diğerleri, 2021). Bu veziküllerin biyolojik sıvılarda ve hücre kültürü süpernatantlarında bulunduğu bilinmektedir. EV'ler, boyutları ve biyogenez mekanizmalarına göre üç ana

sınıfa ayrılır: apoptotik cisimcikler (1000–5000 nm), mikroveziküller (MVs veya ektosomlar, 150–1000 nm) ve eksozomlar (40–150 nm) (Jeppesen ve diğerleri, 2019; Szwedowicz ve diğerleri, 2022). EV’ler, lipid çift tabakasından oluşan ve tetraspaninler, enzimler, vezikül taşıma proteinleri gibi çeşitli proteinleri; mRNA, miRNA ve bazen DNA gibi nükleik asitleri; ayrıca hücre tanıma için karbonhidratları ve sitokinler ile büyüme faktörleri gibi biyoaktif molekülleri içeren yapılardır (Ginini, Billan, Fridman ve Gil 2022; Van der Koog, Gandek ve Nagelkerke, 2022). Tetraspaninlerin CD9, CD63, CD81, CD82 ve TSPAN8 gibi yaklaşık 33 kararlı üyesi bulunur (Brzozowski ve diğerleri, 2018). CD9, CD63 ve CD81 gibi tetraspaninler eksozom zarlarında bol miktarda yer alırken; ektosom zarlarında tetraspanin miktarı daha düşük olup reseptörler, glikoproteinler ve metalloproteinazlar gibi farklı proteinler daha fazladır (Meldolesi, 2021; Ondrušek ve diğerleri, 2023). Öte yandan apoptotik cisimcikler, ideal bir yapıda benzersiz nükleer bileşenlerle birlikte mitokondri, Golgi aygıtı, ribozomlar ve endoplazmik retikulum gibi organelleri içermektedir (Gregory ve Rimmer, 2023). Her ne kadar farklı EV türleri bazı ortak bileşenler taşısa da her bir EV tipi diğerlerinden ayrılmasını sağlayan kendine özgü biyobelirteçlere sahiptir.

2.2.1. Eksozomlar

Eksozomlar ilk olarak koyun retikülositlerinde, retikülositlere özgü sitozolik bileşenler içeren küçük veziküller olarak tanımlanmıştır. Başlangıçta sadece eritrosit olgunlaşmasının “atık ürünleri” olarak değerlendirilmişlerdir; ancak sonraki çalışmalar eksozomların hücreler tarafından aktif olarak salgılanan, hücre dışı veziküllerin ayrı bir sınıfı olduğunu ortaya koymuştur. Bu veziküller endozomal yoldan köken alır ve dört ana aşamada oluşur. Bunlar; membran tomurcuklanması, invajinasyon, multiveziküler cisim oluşumu ve sekresyondur. Yapısal olarak eksozomlar küresel, yassı ya da fincan benzeri morfolojilere sahiptir ve çapları genellikle 40–150 nm arasında değişir. Son yıllarda eksozomların kan, idrar, tükürük, torakoabdominal sıvı, beyin omurilik sıvısı, safra, süt, gözyaşı ve semen gibi çeşitli insan vücut sıvılarında bulunduğu tespit edilmiştir (Guerrini ve diğerleri, 2021; Kayış ve diğerleri, 2025). Son çalışmalar, prostat kanseri hücrelerinden türetilen eksozomların idrar örnekleri üzerinden hastalığın non-invaziv takibi ve erken tespiti için önemli potansiyel taşıdığını vurgulamıştır. CD9, EV yüzeyinde yaygın olarak bulunması nedeniyle eksozom tespiti için sıklıkla hedeflenen bir proteindir (Lee ve diğerleri, 2022; Zadka ve diğerleri, 2020). CD9 eksozom yüzeyinde bol miktarda bulunan tetraspanin proteinlerinden biridir. CD9’un

yüksek bolluğu, eksozomların tespiti ve izolasyonu için güvenilir bir biyobelirteç olmasını sağlar. CD9 her ne kadar mikroveziküller ve apoptotik cisimciklerde de bulunsada özellikle eksozomlarda zenginleşmiş şekilde bulunmaktadır (Giovannelli ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.2. Eksozomların şekilsel görüntüsü (Jan ve diğerleri, 2021)

Eksozomların görevleri

Eksozomlar hücreler arası iletişim ve homeostazın sağlanmasında önemli görevlere sahiptir (Zhang ve diğerleri, 2019). Hücre dışı veziküller biyolojik süreçlerdeki temel rolleri nedeniyle hastalık patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (İnanır ve Ekici, 2020). Ek olarak, eksozomlar bağışıklık sistemi içindeki iletişimde yer alması sebebiyle hem bağışıklık uyarıcı hem de engelleyici etkilerle modülasyonda yer almaktadır (Théry ve diğerleri, 2002). Eksozomlar, nükleik asitlerin (DNA, mRNA, miRNA) (Chiriacò ve diğerleri, 2018), proteinlerin ve lipidlerin kargo konteyneri çekirdekleri (Johnstone ve diğerleri, 1987) aracılığıyla taşıma işlemlerini gerçekleştirerek hücreden hücreye iletişimde kritik bir rol oynarlar. Eksozomlar ayrıca hem enfeksiyonun önlenmesinde hem de bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde görev alır (Aheget ve diğerleri, 2020). Örneğin anne sütündeki miRNA içeren bağışıklık fonksiyonları ile eksozomların sağlıklı doğum sonrası büyümeyi desteklemesi arasında bir ilişki bulunmaktadır (Mathivanan ve diğerleri, 2010). Normal ve patolojik hücrelerde hücreler arası iletişim sürecini incelemeye yönelik çalışmalar eksozomlara olan ilgiyi büyük ölçüde arttırmıştır. Bunun en önemli nedeni, kanser

hücrelerinin oluşturduğu faktörlerin eksozomlar tarafından salınmasıdır çünkü eksozomlar neoplazi, tümör büyümesi ve metastazı, paraneoplastik sendromlar ve tedaviye direnç üzerinde etkilidir (Kastelowitz ve Yin, 2014). Ayrıca kanser hastalarının (prostat, akciğer, mide gibi) kan örneklerinde sağlıklı bireylere göre eksozom düzeyi oldukça yüksektir (Commisso ve diğerleri, 2013; Delorme-Axford ve diğerleri, 2013).

Eksozomların kanserdeki rolü

Kanser progresyonu ile ilgili güncel teorilere göre bir primer tümör, metastaz gerçekleşmeden çok önce subklinik veya mikroskobik düzeyde gelişir. Bir kanserin klinik olarak tespit edilebilir hâle gelmesi için yaklaşık 1 cm³ büyüklüğe ulaşması gerekir ki bu, yaklaşık 10⁹ hücreye karşılık gelir (Guerrini ve diğerleri, 2021; Kayış ve diğerleri, 2025). Eksozomlar yalnızca tümör tanısında biyobelirteç olarak değil, aynı zamanda tümör tedavisi için potansiyel hedefler olarak da kullanılabilir (Yang ve diğerleri, 2022). Yaygın olarak kabul edilen görüşe göre primer tümörler, uzak bölgelere yayılmadan önce diğer organların hücre ve dokuları ile çevre mikroçevreyle iletişim kurarak metastatik nişi hazırlarlar. Bu yatay hücreler arası iletişim eksozomlar tarafından sağlanır. Dolayısıyla eksozomların hücrelerde doğru ve hızlı tespiti, kanserin erken tanısına olanak sağlar. Bu durum eksozom tespitine yönelik yüksek duyarlılığa sahip, hızlı ve güvenilir sensörlere duyulan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Eksozomlardaki lipid çift tabakasının ortalama kalınlığı yaklaşık 5 nm'dir ve bu özellik çökme katsayılarının protein agregatlarından önemli ölçüde farklı olmasına yol açar (Zhang ve diğerleri, 2018a). Prostat kanserinde tümör metastazının tespiti başarılı bir tedavi için kritik önem taşır. Metastazın başlamasıyla CD9 ve CD151 ekspresyon seviyelerinde değişiklikler meydana geldiği gözlenmiştir. Bu durumda hücre adezyonu ve sinyallemede kritik rol oynayan CD9 seviyelerinde belirgin bir azalma, buna karşılık hücrel aktivasyon belirteci olan CD151 seviyelerinde artış görülür. Bu nedenle bu biyobelirteçlerin ekspresyon seviyelerinin izlenmesi tümör mikroçevresine ilişkin değerli bilgiler sağlayabilir (Brzozowski ve diğerleri, 2018; Ludwig ve diğerleri, 2021). Prostat kanserinde EV izolasyonu ve analizine yönelik araştırmalar, CD9'un eksozom tanımlaması ve karakterizasyonu için yaygın bir belirteç olduğunu göstermektedir (Allelein ve diğerleri, 2022). Bu bilgiler ışığında CD9 pozitif eksozomların prostat kanseri tanısında, hastalık ilerlemesinin izlenmesinde ve metastazın belirlenmesinde değerli bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Eksozom tayin yöntemleri

Günümüzde kullanılan eksozom izolasyon yöntemleri; ultrasantrifügasyon, yoğunluk gradyanlı santrifügasyon, ultrafiltrasyon, çöktürme (örneğin polietilen glikol, PEG) ve immünoizolasyon olarak sınıflandırılabilir (Zhang ve diğerleri, 2018b). Bu yöntemlerin her birinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Ayrıca sık kullanılan bir diğer izolasyon yaklaşımı da hedef analite özgü antikorlarla modifiye edilmiş manyetik boncukların kullanılmasıdır. Bu boncuklar karmaşık matrislerden analitin seçici şekilde ekstraksiyonuna olanak sağlar (Chen ve Qiu, 2025; Shin ve diğerleri, 2025). Son çalışmalar, ilaç salınım sistemlerinde eksozomların ilaç yükleme verimliliğinin değerlendirilmesi için YZRS tabanlı yöntemlerle izlenebileceğini göstermiştir (Liu ve diğerleri, 2025). Mikroakışkan-YZRS tabanlı yaklaşımlarda eksozom biyobelirteçlerinin profillemesi ve kanser gibi hastalıkların erken tanısında kullanılması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Han ve diğerleri, 2022; Ho ve diğerleri, 2024; Jia ve diğerleri, 2024; Ma ve diğerleri, 2025). Entegre mikroakışkan-YZRS sistemleri yüksek duyarlılıklı eksozom tayini ve sinyal güçlendirmesi sağlar. Elektrokimyasal mikroçip tabanlı yöntemler ise nanoveziküllerin hızlı yakalanması ve analiz edilmesi için etkili çözümler sunar (Shi ve Esfandiari, 2020). Ayrıca üç boyutlu YZRS tabanlı biyosensörler, kanser kaynaklı eksozomların seçici tayinine olanak sağlarken; manyetik boncuk zenginleştirme veya termoforetik konsantrasyon gibi teknikler eksozomların verimli izolasyonu ve etiketsiz tespitine imkân tanır (Al Mannai ve diğerleri, 2022; Guo ve diğerleri, 2024; Shin ve diğerleri, 2025).

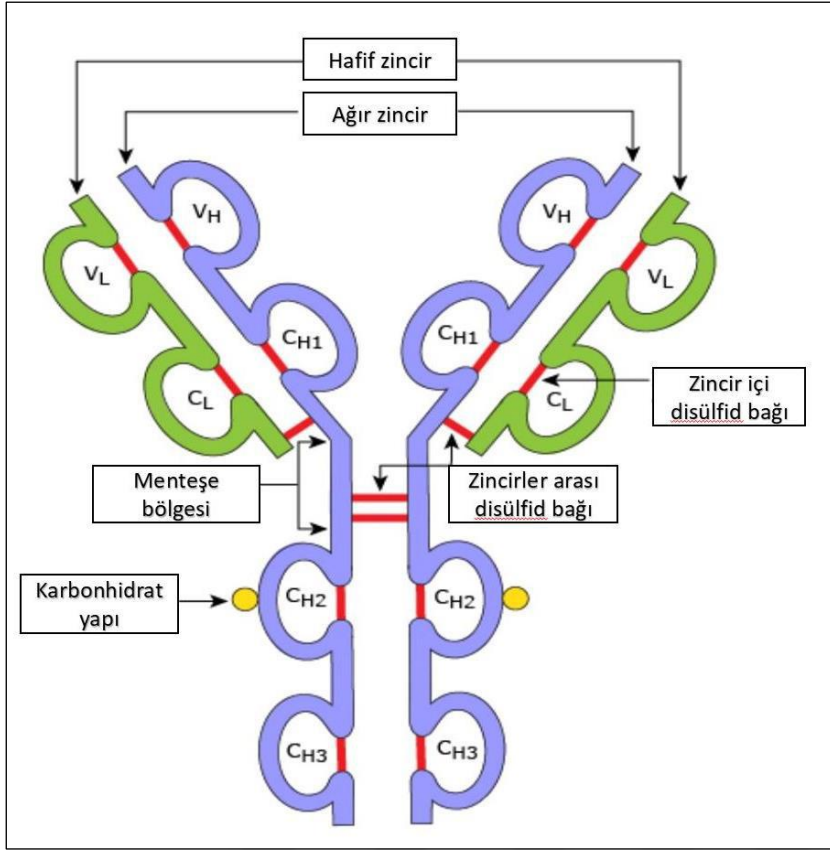
Son zamanlarda, tetraspanin proteinleri (CD9, CD81, CD63) ve hastalık ilişkili proteinleri hedefleyen yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip immünolojik esaslı yeni eksozom tespit teknikleri geliştirilmiştir. Floresans (Ding ve diğerleri, 2023), yüzey plazmon rezonansı (SPR) (Kowalczyk ve diğerleri, 2023), nükleer manyetik rezonans (Ullah ve diğerleri, 2021), elektrokimyasal (da Fonseca Alves ve diğerleri, 2024) ve elektro-kemilüminesans (Xiong ve diğerleri, 2022) gibi yöntemler CD9 tespiti için rapor edilmiştir. Bu yöntemler, eksozom protein tanımlamasına yönelik geleneksel yaklaşımlara kıyasla önemli gelişmeler sağlamıştır. Bunlara ek olarak, farklı YZRS substratlarının kullanıldığı Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (YZRS) teknikleri de çoklu analiz yapabilme ve yüksek duyarlılık özellikleri sayesinde eksozom tespitinde büyük ilgi görmektedir (Li ve diğerleri, 2022). Soy metal nanoparçacıkları (Au, Ag, Cu) YZRS substratı olarak yaygın

şekilde kullanılmakta olup, 2D ve 3D yapıların metal nanoparçacıkları ile birleştirildiği hibrit sistemler de son dönemde rapor edilmiştir (Guerrini ve diğerleri, 2021; Li ve diğerleri, 2022).

Eksozomlar genellikle süspansiyon içerisindeki konsantrasyonlarının belirlenmesi için Nanoparçacık İzleme Analizi (NTA) kullanılarak analiz edilir. Ancak NTA, cihaz kalibrasyonu ve parametre ayarlarında standardizasyon eksikliği nedeniyle sınırlı tekrarlanabilirlik göstermektedir. NTA ile elde edilen konsantrasyon ve boyut verilerinin spesifik moleküler karakterizasyon yöntemleriyle desteklenmesi gerekir. Bu amaçla Western blot (WB) ile protein belirteçleri veya ELISA ile antijen tayini yapılabilir. Ancak WB, düşük duyarlılığı ve tümör hücrelerinin erken evrede salgıladığı düşük eksozom konsantrasyonlarını tespit edebilmek için yüksek örnek hacmine ihtiyaç duyması nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Alternatif olarak akış sitometrisi kullanılabilir, ancak klasik akış sitometrisi küçük eksozomları yüksek duyarlılıkla çözümlemede yetersiz kalmaktadır (Liu ve diğerleri, 2021).

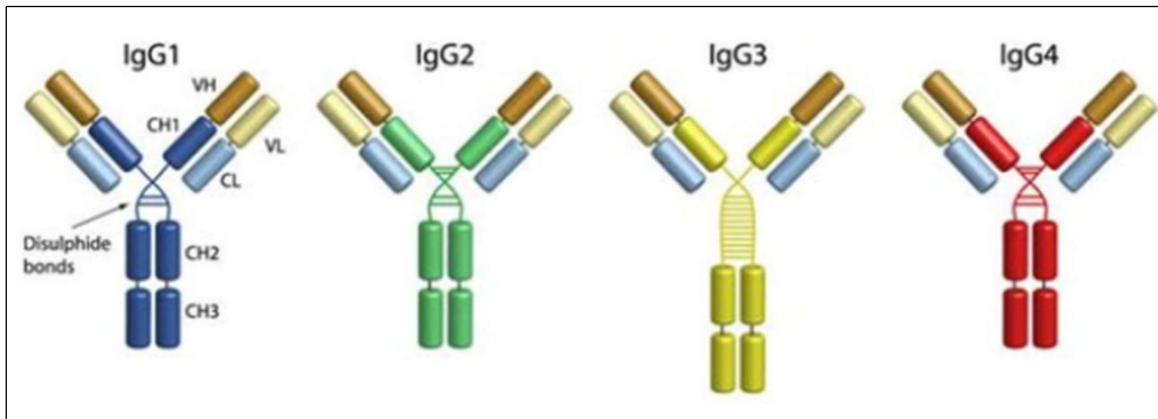
2.3. İmmünoglobulinler

Tüm antikorlar, immünoglobulin protein sınıfının üyeleridir ve B lenfositlerinden türetilen plazma hücreleri tarafından oluşturulur (Hoda, 2019). İmmünoglobulinler, 2 tane hafif zincir (light, L) ve 2 tane ağır zincirin (heavy, H) birleşmesinden oluşan glikoproteinlerdir. L ve H zincirleri birbirlerine disülfid bağlarla bağlanır. L ve H zincirlerinin her biri sabit (C) ve değişken (V) bölgeler içermektedir. L zincirinin tamamı ve H zincirinin son yarım kısmı yani değişken (V) bölgeler birlikte antijen bağlayan bölge olarak bilinen “Fab” bölgesini oluşturmaktadır. Ağır zincirlerin geri kalan kısmı yani sabit (C) bölgeler ise kompleman aktivasyonu, hücre yüzey almaçlarına bağlanma gibi biyolojik aktivite gösteren “Fc” bölgesidir (Warren, 2016) (Şekil 2.3). İmmünoglobulinler, insan vücudunda iki formda bulunurlar. Bunlar salgılanmış ve membrana bağlı immünoglobulinlerdir. Salgılanan formu genellikle plazma hücreleri tarafından üretilir ve mikroorganizmaları nötralize etme, kompleman sistemini aktive etme gibi görevleri yerine getirir. Membrana bağlı form ise B lenfosit yüzeyinde reseptör görevi görür, antijenleri tanır ve bunlara bağlanmayı sağlar (Borghesi ve Milcarek, 2006).



Şekil 2.3. IgG molekülünün şekilsel gösterimi (Özütemiz Tutanç, 2025)

Immunoglobulinler ağır zincir yapılarına göre 5 farklı şekilde bulunmaktadır. Bunlar; IgM, IgD, IgG, IgE, IgA dır. IgG molekülü ise; kendi içerisinde dört alt sınıfa ayrılır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. IgG'nin alt sınıflarının şekilsel gösterimi (Lambert ve Finlay, 2014)

2.3.1. İmmünoglobulin G

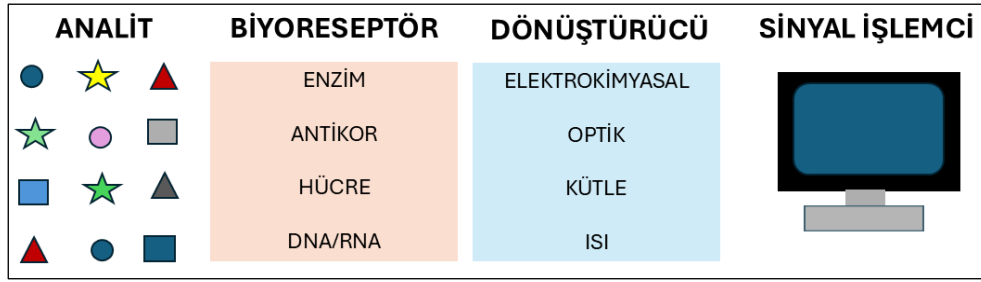
İmmünglobulinlerin ana sınıfı olan IgG, tüm serum immünglobulinlerinin yaklaşık dörtte üçünü oluşturur. Ortalama yarı ömrü 21 gündür ve moleküler ağırlığı 150 kilodaltondur (kDa) (Jefferis ve Lefranc, 2009). IgG molekülü ağır zincirindeki sabit bölgelerin yapısal, işlevsel ve antijenik farklılıklarına dayanarak sağlıklı bir insan serumunda bulunma oranına göre IgG1 (%61), IgG2 (%32), IgG3 (%4) ve IgG4 (%3) olarak dört alt sınıfa ayrılır (Schroeder Jr ve Cavacini, 2010b). Bu alt sınıflar, farklı antijenlere karşı bağışıklık yanıtlarında ve patojenlere karşı savunmada çeşitli roller üstlenir. IgG plasenta bariyerini geçerek ekstrasöziküler alanlara nüfuz edebilir.

2.3.2. İmmünoglobulin G ile kanser ilişkisi

IgG antikorlarının temel özelliklerinden biri, hedef hücreleri yok etme kapasitesidir. Bu özellikleri genel olarak antikor bağımlı hücresel sitotoksite (ADCC) olarak adlandırılır. Hedef hücreleri öldürebilme yeteneği, sitotoksik antikorları birçok malign, otoimmün ve enfeksiyon hastalığının tedavisinde standart yaklaşım hâline getirmiştir (Wöhner ve Nimmerjahn, 2025). IgG, patojenlere karşı savunmada bağışıklık sisteminde rol alan çok yönlü bir antikordur.

2.4. Biyosensörler

Biyosensör teknolojileri, biyolojik molekülleri yüksek duyarlılık ve özgüllükle tespit etmek üzere tasarlanmış geniş bir analitik yaklaşımı temsil eder. Bu teknolojiler, hedef analitleri tanımlamak için çeşitli biyolojik tanıma bileşenlerinden yararlanarak, birçok farklı tanı ve izleme sisteminin temelini oluşturur. Biyosensörler, biyolojik tanımayı ölçülebilir sinyallere dönüştürerek, spesifik biyolojik analitlerin tespit edilmesi için tasarlanmış analitik cihazlardır. Bu cihazlar, enzimler, antikorlar veya nükleik asitler gibi biyolojik tanıma bileşenlerinin analitle olan etkileşimlerini ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir dönüştürücü ile birlikte çalışırlar (Kim ve diğerleri, 2023; Mohankumar ve diğerleri, 2021; Perumal ve Hashim, 2014). Doğru, hızlı ve hassas ölçümler sağlayabilme özellikleri sayesinde biyosensörler, tıp, çevresel izleme ve gıda güvenliği gibi birçok alanda uygulama bulmaktadır (Shafiee ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.5. Biyosensörlerin şematik gösterimi

2.4.1. Biyosensörlerin çeşitleri

Biyosensörler, biyo algılayıcı (biyoreseptör) ve dönüştürücüye bağlı olarak sınıflandırılabilir. Biyo algılayıcının türüne göre mikroorganizma, nükleik asit, enzim, antikor, reseptör gibi sınıflandırmalar yapılabilir. Kullanılan dönüştürücünün türüne bağlı olarak ise elektrokimyasal, optik ve kütle tabanlı biyosensörler olarak sınıflandırılabilir. Biyosensörler içerisinde en yaygın olan türler optik ve elektrokimyasal biyosensörler olarak bilinmektedir (Goumas ve diğerleri, 2025).

Optik biyosensörler

Klinik kullanım için geliştirilen ilk optik biyosensörlerden biri, 1957 yılında ticarileştirilen idrar örneklerinde glikoz analizini sağlayan test şerididir. Bu sensör, glikoz oksidaz ve peroksidazın birlikte immobilize edildiği bir selüloz ped kullanarak glikozun oksidasyonunu katalize eder ve yarı-nicel idrar glikoz ölçümü için görsel olarak tespit edilebilen mavi bir renk üretir (Free ve diğerleri, 1957). Optik dönüştürücüler, bir biyokatalizör ile hedef analit arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan optik özellik değişikliklerini algılar ve floresans şiddeti, ışık Emilimi, yansıma, kemilüminesans, kırılma indisi ve Raman saçılması gibi değişkenleri inceler. Optik biyosensörler genel olarak beş ana başlık altında incelenir. Bunlar; kolorimetrik biyosensörler, floresans biyosensörler, optik fiber biyosensörler, YZRS biyosensörler ve fotonik kristal biyosensörlerdir (Goumas ve diğerleri, 2025).

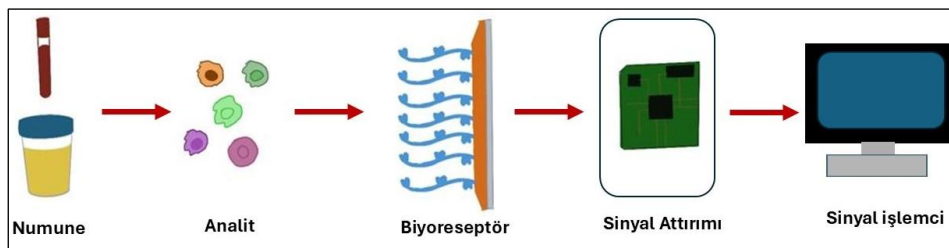
Kolorimetrik biyosensörler, biyokimyasal bir reaksiyon sonucu destek materyalinin renginde meydana gelen değişiklikleri tespit ederek çalışır. Bu değişiklik, materyalin ışık Emilimi veya yansımısını değiştirir ve böylece gözle görülebilir hâle gelir. Kolorimetrik sensörler, sensörün optik özelliklerini (absorpsiyon veya yansıma) kullanarak yapısal bir

renk üretir ve bu renk analitin tespit sinyali olarak kullanılır. Sensör yüzeyinde meydana gelen kırılma indisi değişikliklerinin izlenmesi; kullanım kolaylığı, düşük maliyet, saha analizine uygunluk ve gerçek zamanlı tespit gibi önemli avantajlar sunar (Liu ve diğerleri, 2021). Bu biyosensörler, biyokimyasal girdileri tanır ve bunları floresans yoğunluğu, dalga boyu değişimleri veya diğer enerji transfer mekanizmaları aracılığıyla optik çıktılara dönüştürür (Lyons ve diğerleri, 2023). Optik Fiber Biyosensörler 1970'lerde optik fiber teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, basit ışık iletim araçlarından tıbbi görüntüleme ve diğer alanlarda kullanılan kapsamlı cihazlara dönüşmüştür. Bir diğer optik sensör ise YZRS biyosensörleridir. Raman saçılması, ilk kez 1928'de gözlemlenen ve moleküler titreşimlerle ilişkili, farklı frekanslarda saçılan, elastik olmayan ışık etkileşimidir. Spontan Raman sinyali zayıftır; bu nedenle YZRS, metalik nanoyapılar aracılığıyla sinyal gücünü artırır (Serebrennikova ve diğerleri, 2021). YZRS tabanlı tayinler doğrudan (etiketsiz) ya da dolaylı (etiketli) olarak analizi mümkün kılar. Doğrudan YZRS ölçümü, nanoyapılı substratlar üzerindeki biyomoleküllerin Raman spektrumunu analiz eder. Dolaylı tespit ise; Raman aktif YZRS nano etiketleri ile duyarlılık ve özgüllüğü artırır. Bu sayede YZRS tabanlı yöntemler geliştirilir. YZRS, mikroakışkan sistemler, elektrokimyasal, floresans, PCR ve LFIA teknolojileri ile birlikte kullanılabilir. Fotonik kristal biyosensörler ise; bir, iki veya üç boyutta periyodik olarak değişen, dielektrik fonksiyona sahip malzemelerdir. Bu yapılar ışığı etkili şekilde hapseder (Fenzl ve diğerleri, 2014).

Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik veya kimyasal hedefleri elektrokimyasal etkileşimler yoluyla tespit etmek için tasarlanmış, yaygın olarak kullanılan analitik cihazlardır. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne (IUPAC) göre elektrokimyasal bir biyosensör, biyolojik tanıma elemanı kullanarak seçici, nicel veya yarı-nicel analitik veri sağlayan, bütünleşik bir algılayıcı-dönüştürücü sistemidir (Thévenot ve diğerleri, 2001). Bu sensörler, biyokimyasal etkileşimleri elektrik sinyallerine dönüştürerek çalışır ve bu sinyaller işlenerek analiz edilir. Sensörlerin etkinliği; analit, biyotanıma elemanı, dönüştürücü, sinyal güçlendirme ve işleme birimi ile veri görüntüleme sistemi gibi çeşitli temel bileşenlerin koordineli şekilde çalışmasına bağlıdır. Bu bileşenlerin her biri algılama sürecinde kritik bir rol oynar (Baryeh ve diğerleri, 2017; Cui ve diğerleri, 2019; Grieshaber ve diğerleri, 2008; Kalita ve diğerleri, 2023) . Tipik bir elektrokimyasal biyosensör, analit, biyotanıma elemanı, dönüştürücü, sinyal güçlendirme ve işleme, veri

görüntüleme ve yorumlama sistemi olmak üzere beş ana bölümden oluşmaktadır. Analit, biyosensörün tespit etmek üzere tasarlandığı spesifik biyolojik veya kimyasal maddeyi ifade etmektedir. Virüsler, bakteriler, nükleik asitler, küçük biyomoleküller, ağır metaller, proteinler, kanser/hastalık biyobelirteçleri, çeşitli antikorlar gibi bileşikler analit olarak tayin edilebilmektedir. Analite uygun biyotanıma elemanlarının seçimi, tayin stratejilerinin doğru belirlenmesini sağlar ve böylece yüksek özgüllük ve güvenilir sonuçlar elde edilir. Biyotanıma elemanı, hedef analiti seçici bir şekilde tanımaktan ve onunla etkileşime girmekten sorumlu temel bileşendir. Genellikle enzimler veya antikorlar gibi doğrudan analite özgü bağlanma potansiyeli gösteren yapılardan oluşur. Bu etkileşimin özgüllüğü, hedef dışı moleküllerden kaynaklanabilecek girişimi en aza indirmek ve sensör doğruluğunu artırmak açısından oldukça önemlidir. Analit ile etkileşim sonrasında biyosensör, biyokimyasal veya elektrokimyasal bir değişime uğrar ve bu değişim, dönüştürücü tarafından elektriksel bir sinyale dönüştürülür. Dönüştürücü, analit ile biyotanıma elemanı arasında gerçekleşen biyokimyasal etkileşimleri elektrik sinyallerine dönüştürmede kritik bir rol oynar. Elektrokimyasal biyosensörlerde bu dönüşüm, voltametrik/amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik veya impedimetrik özellikler gibi elektriksel özelliklerdeki değişikliklerin ölçülmesiyle sağlanır. Kullanılacak dönüştürücü yönteminin seçimi, analitin yapısına ve istenen duyarlılık düzeyine bağlıdır. Dönüştürücü tarafından üretilen elektrik sinyali genellikle zayıftır ve doğru şekilde tespit edilebilmesi için güçlendirilmesi gerekir. Bir sinyal güçlendirici, alınan elektrokimyasal yanıtın şiddetini artırır ve analit derişimindeki çok küçük değişikliklerin bile tespit edilebilmesini sağlar. Güçlendirilen bu sinyal daha sonra anlamlı analitik verilerin elde edilmesi amacıyla hesaplama algoritmaları kullanılarak işlenir. İşlenen sinyal, biyosensörün kullanım amacına bağlı olarak sayısal değerler, grafikler veya voltamogramlar gibi kullanıcı tarafından okunabilir bir formata dönüştürülür. Veri görüntüleme sistemi, sonuçların kolayca yorumlanmasını sağlar ve kullanıcıların sensör çıktısına dayalı bilinçli kararlar verebilmesine imkân tanır (Arslan Çağlayan, 2025).



Şekil 2.6. Elektrokimyasal biyosensörün çalışma prensibine ait şematik gösterim

2.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji, Richard P. Feynman tarafından 1959 yılındaki “There is Plenty of Room at the Bottom” başlıklı en ünlü konferansı sırasında ilk defa ifade edildiğinden beri, bu alanda çok çeşitli gelişmeler meydana gelmiştir. Nanoteknoloji alanında nano ölçek mertebesinde çeşitli şekillerde materyaller üretilmiştir. Bir nanometre (nm) Uluslararası Birimler Sistemi (SI)’ne göre 10^{-9} metre uzunluğundaki birimi temsil etmektedir. Temelde nanomalzemeler en az bir boyutlu ve boyutları 1-1000 nm arasında değişen materyaller olarak tanımlanmaktadır, ancak genel olarak boyutları 1-100 nm aralığında olan malzemeler olarak belirtilmektedir (Lin ve diğerleri, 2025). Nanopartiküller (NP), boyutları 1-100 nm arasında değişen tek veya çok boyuta sahip partikül maddelerini içeren materyallerin geniş bir sınıfını içermektedir. Şekillerine bağlı olarak bu materyaller bir, iki ya da üç boyutlu olabilirler (Tiwari ve diğerleri, 2012). Boyutun, optik özellikler gibi maddelerin fiziko-kimyasal özelliklerini etkileyebildiği keşfedildiğinde bu materyallerin önemi fark edilmiştir. Nanopartiküller yüzeyi fonksiyonelleştirebilen küçük boyuttaki malzemelerdir. Nanopartiküller, morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Biyoanalitik sistemlerde en çok kullanılan nanopartikül çeşitleri olarak karbon temelli nanopartiküller (karbon nanotüpler vb.), metal nanopartiküller (Fe, Au ve Ag metallerinden oluşan nanopartiküller), yarı iletken nanopartiküller, polimerik nanopartiküller ve lipid temelli nanopartiküller olarak sınıflandırılabilirler.

2.5.1. Manyetik demir oksit nanopartiküller

Demir oksitler doğada en yaygın halde bulunan ve laboratuvarlarda kolaylıkla sentezlenebilen en yaygın bileşiklerdir. Son yıllarda hedeflenmiş ilaç salımı, manyetik rezonans görüntüleme, biyoalgılama, biyogörüntüleme gibi birçok teknolojik uygulamalara imkan sağlamasından dolayı demir oksit nanopartiküllerin sentezi yoğun olarak artmıştır. Manyetik demir oksit nanopartiküllerin üretiminin ucuz olması, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olması, biyoyumlu ve çevresel olarak güvenli olması nedeniyle, bu alandaki biyoyugulamaların sayısı oldukça dikkat çekmektedir. Çalışmalarda en sık kullanılan manyetik nanopartikül çeşitleri demir oksitler hematit (α -Fe₂O₃), magnetit (Fe₃O₄) ve maghemit (γ -Fe₂O₃) olarak bilinmektedir. Bu demir oksit nanopartikül türleri, eşsiz biyokimyasal, manyetik ve katalitik özellikleri nedeniyle teknik ve biyomedikal uygulamalar için uygunluk sağlayan önemli üstünlüklere sahiptirler.

Farklı morfolojilere sahip manyetik demir oksit nanopartiküller, çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenmektedir. Bu yöntemler; birlikte çöktürme, termal ayrışma, hidrotermal ve solvotermal sentez, sol-jel sentez, mikroemülsiyon, ultrason ışınlaması ve biyolojik sentezler olarak bilinmektedir. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılan yöntem birlikte çöktürme metodudur. Bu yöntem, oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıklarda inert atmosfer ortamında 2:1 molar oranında Fe^{+2} / Fe^{+3} içeren sulu çözeltiye, baz ilave edilmesi ile demir oksitlerin (γ - Fe_2O_3 veya Fe_3O_4) sentezlenmesinde kolay ve elverişli bir metottur (Farha ve diğerleri, 2024).

2.5.2. Altın nanopartiküller

Altın, milattan önce 5. yüzyıldaki keşfinden bu yana dünyadaki en önemli maddelerden biri olmuştur. Altın nanopartiküllerin boyutları 100 nm' ye kadar ulaşmaktadır. Nanopartikül şekilleri de fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Yapıları küresel olmayan altın nanopartiküller, küresel olanlara kıyasla anizotropik optik ve elektronik özellikler göstermektedir. Küresel olmayan altın nanopartiküllerden en bilineni altın nanoçubuktur. Altın nanoçubuk yapıların fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanılarak gerçekleştirilen birçok çalışma örneği mevcuttur (Cao ve diğerleri, 2012; Derebasi ve diğerleri, 2025; Kayış ve diğerleri, 2025).

Altın nanoçubukların sentez yöntemleri olarak yaş kimya, elektrokimyasal, sonokimyasal, solvotermal, mikrodalga destekli ve fotokimyasal indirgeme yöntemleri sayılabilir. Bu metodlarda suda çözünmüş altın (III) iyonları, çeşitli dış uyarıcılar varlığında sodyum borohidrür, askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar aracılığı ile altın (0)'a indirgenir. Altın nanoçubukların kolloidal büyümeleri için yaygın olarak kullanılmakta olan yüzey aktif maddelerden birisi setil trimetil amonyum bromür (CTAB)dür. Yüzey aktif maddeler nanoçubukların agregasyonunu önleyici ajanlar olarak işlev görmektedirler ve ayrıca miseller oluşturarak altın nanopartikülleri çubuk şeklinde büyümeye yönlendirirler. En yaygın metotlardan birisi çekirdek-aracılı büyüme olarak adlandırılır. Küçük altın nanopartikül çekirdekleri öncelikli olarak sulu CTAB çözeltisi içinde sodyum borohidrür ile kloraurik asidin indirgenmesi ile hazırlanır. Belirli miktardaki çekirdek çözeltisi, $Au(III)$ kompleks iyonunun $Au(I)$ kompleks iyonuna askorbik asit ile sulu CTAB çözeltisi ortamında indirgenmesi sonucunda elde edilen büyüme çözeltisine eklenir. Eklenen çekirdek

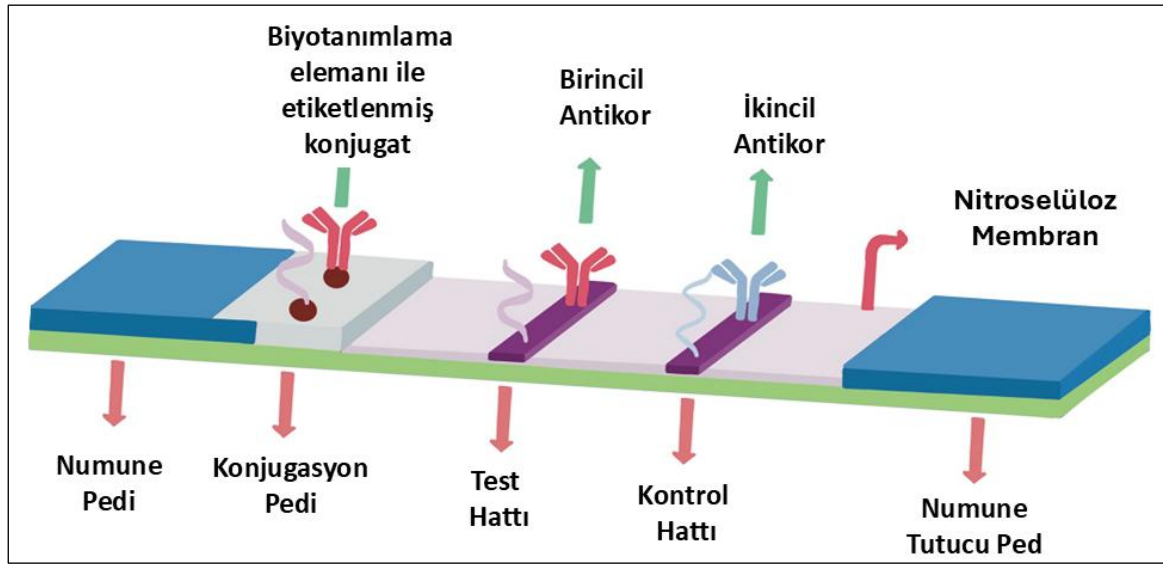
sonrasında Au(I) kompleks iyonunun Au(0)'a indirgenmesi ile Au nanoçubukların oluşması sağlanır (Kayış ve diğerleri, 2025).

2.6. Yatay Akışlı İmmunoassay Test Şeritleri

İlk tanı uygulamaları eski Çinliler ve Mısırlılar tarafından yapılan tükürük ve idrardan tespit çalışmaları belgelenmiş kanıtlarıyla antik çağlara kadar uzanmaktadır (O'Farrell, 2009) (Dinç, 2025). Hızlı tanı testleri olarak da bilinen yatay akış testleri (LFA), 20. yüzyılın ortalarına kadar uzanan bir geçmişe sahiptir. Modern LFA teknolojisinin temeli, Plotz ve Singer'ın idrar içindeki glikozu tespit etmek için lateks aglütinasyon testi geliştirerek kağıt tabanlı teşhis cihazlarını tanıttığı 1956 yılında atılmıştır. 1959 yılında biyofizikçi Rosalyn S. Yalow ve endokrinolog Solomon A. Berson insan kan plazmasındaki insülin seviyelerini ölçmek için parafin kağıdı kullanarak hızlı test geliştirerek diyabet teşhisinde bir dönüm noktası olmuşlardır (Kahn ve Roth, 2004). 1988'de evde hamilelik testi olarak piyasaya sürülen ilk ticari LFA olan Clearblue'nun tanıtılmasıyla, alanda hızlı bir ilerleme kaydedilmiştir (Van Amerongen ve diğerleri, 2018). 1985 ile 1995 arasındaki dönem, Becton Dickinson, Abbott ve Quidel gibi şirketlerin membran seçiminden sinyal geliştirme yöntemlerine kadar LFA'nın çeşitli yönleriyle ilgili çok sayıda patent başvurusunda bulunmasıyla önemli gelişmeler yaşanmıştır. 2000'lerin başında, duyarlılık ve kantifikasyon ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu dönemde ayrıca, birden fazla analiti aynı anda tespit edebilen çoklu LFA sistemlerinin geliştirilmesi hakkında çalışmalar da yer almaktadır. LFA sistemleri bir karışımdaki analitlerin nicel ve nitel tayinini sağlayan kağıt tabanlı mikroakışkan analiz sistemleridir (Koczula ve Gallotta, 2016). LFA sistemleri biyotanımlayıcı element olarak antikorlar kullandığında yatay akışlı immunoassay (lateral flow immunoassay, LFIA) adını almaktadır (Ngom ve diğerleri, 2010).

Tipik bir yatay akışlı immunoassay yapısı (Şekil 2.7.) incelendiğinde her birinin bir amaca hizmet eden çeşitli malzemelerden tasarlandığı görülür. Bu test şeridinin tasarımında, temel olarak numune örnek pedine damlatılmaktadır. Numune pedine uygulanan örnek bu bölge aracılığıyla nanopartikül konjuge edilmiş konjugasyon pedine ilerlemektedir. Bu partiküller konjuge edilmiş bir kolloid altın veya renklendirilmiş, floresans özellikli lateks partiküller olabilir. Bu partiküller analite bağlı olarak analizin spesifik biyolojik bileşenlerine göre bir antikor gibi biyotanımlama elemanı ile konjuge edilmiştir. Damlatılan numune konjugasyonda kurutulmuş olan konjugasyonu harekete geçirir ve etkileşime giren bu yapı

kit şeridinin bir sonraki bölümü olan nitroselülöz membran üzerine konumlandırılmış antikor bölgesine ilerler. Membran üzerinde immobilize edilen biyotanımlama elemanları belirli alanlarda (test çizgisi ve kontrol çizgisi) bantlarla belirtilmiş olan analit ve konjugatı yakalamak için bulunan antikor veya antijen türü tipik proteinlerdir. Fazla reaktifler ise yakalama bantlarını geçtikten sonra absorpsiyon ped içinde yakalanır. Sonuçlar test ve kontrol çizgisinde yakalanmış konjugat çizgilerinin varlığı ve yokluğu gözle veya bir uygulama kullanarak yorumlanır. Bu düzenleme sayesinde numunenin kapiler kuvvetlerle şeridin sonuna kadar kesintisiz ve düzenli biçimde ilerlemesi mümkün olacaktır (Parolo ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.7. Kağıt tabanlı yatay akışlı immunoassay test şeridinin yapısı

2.6.1. Yatay akışlı immunoassay test şeritlerinin çalışma prensibi

Yatay akış testleri, düşük hacimli örneklerin gözenekli bir membran üzerine uygulanması ve numunenin şerit boyunca kapiler kuvvetlerle ilerlemesine dayanmaktadır. Bu sistemde akış sürekliliği platformun uç kısmına yerleştirilen ve sıvının emilimini gerçekleştiren bir absorban ped yardımıyla sağlanır. Şerit, her biri özgül bir işleve sahip farklı bölgelerden oluşmaktadır: numune uygulama pedi, konjugasyon pedi, analitik membran (nitroselüloz, NC) ve absorban ped.

Numune uygulama pedi: Test şeridinin ilk bileşeni olan bu ped, yüksek sıvı emme kapasitesine sahip camsı fiber veya selüloz kağıtlar kullanılarak test şeridinin boyutuna

uygun şekilde kesilmektedir. Numunenin uygulandığı bu kısım, örneği diğer bileşenlere taşımakla birlikte, gerektiğinde ön işlem amacıyla önceden kurutulmuş tampon tuzları ve yüzey aktif maddeler de içerebilmektedir. Numune pedinden geçen sıvı, bu bileşenleri çözerek aktif hale getirerek ve numunenin sonraki aşamalara uygun şekilde ilerlemesini sağlamaktadır.

Konjugasyon pedi: Konjugasyon pedi tanıma elemanlarını içeren test şeridinin ikinci bileşenidir. Konjugasyon pedinin hazırlanmasında ticari olarak temin edilen camsı fiber, selüloz veya poliestere esaslı pedler uygun tamponlarla ön işleme tabi tutularak ardından antikör immobilize edilmiş altın nanopartiküller bu ped üzerine yüklenerek kontrollü koşullarda kurutulmaktadır. Böylece konjugatın stabilitesi sağlanarak, yükleme ve salım verimliliği optimize edilmektedir. Kolorimetrik ölçümler için altın nanopartiküllerin oluşturduğu renk değişimi kullanılmaktadır.

Analitik membran: Analitik membran test şeridinin üçüncü bileşenidir. Analitik membrana gelmeden önce hedef analit, konjugasyon pedindeki tanıma elemanlarına bağlanarak analit-konjugat kompleksini oluşturur ve analitik membran üzerinde yer alan tanı bölgesine taşınır. Tanı bölgesinde test ve kontrol hatları yer alır. Test hattına, analiti yakalamak üzere birincil tanıma elemanları immobilize edilmiştir. Kontrol hattında ise, etiketli tanıma elemanları yakalanır ve böylece sistemin doğru çalışıp çalışmadığı belirlenir.

Analitik membranlar ince ve kırılgan bir yapıya sahip olduklarından, kullanım kolaylığı sağlamak amacıyla genellikle plastik veya naylon tabakalar üzerine sabitlenmiş destek materyalli formlar tercih edilmektedir. Bu amaçla düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve proteinler ile biyomoleküllere yüksek afinite gösteren nitroselüloz membran kullanılmaktadır. Bu membran üzerinde test ve kontrol hatları tanıma elemanları ile oluşturulmaktadır.

Absorban pedi: Test şeridinin son kısmında yer alan absorban pedi, nitroselüloz membran ile örtülecek şekilde konumlandırılmıştır. Bu ped, numunenin ileri akışını desteklerken geri akışı engeller (Gumustas ve diğerleri, 2018; Parolo ve diğerleri, 2020).

2.7. Elektrokimyasal Yatay Akışlı İmmünoassay Test Şeritleri

Elektrokimyasal yatay akış analizleri (e-LFA'lar), özellikle kantitatif ölçüm ve artırılmış duyarlılık gerektiren uygulamalarda, geleneksel kolorimetrik LFA'lara umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Son iki yılda, e-LFA tasarımı, üretimi ve analitik performansı konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiş olup, bu sistemleri merkezden bağımsız tanılama ve point of care testleri için güçlü adaylar hâline getirmiştir (Abarintos ve diğerleri, 2025).

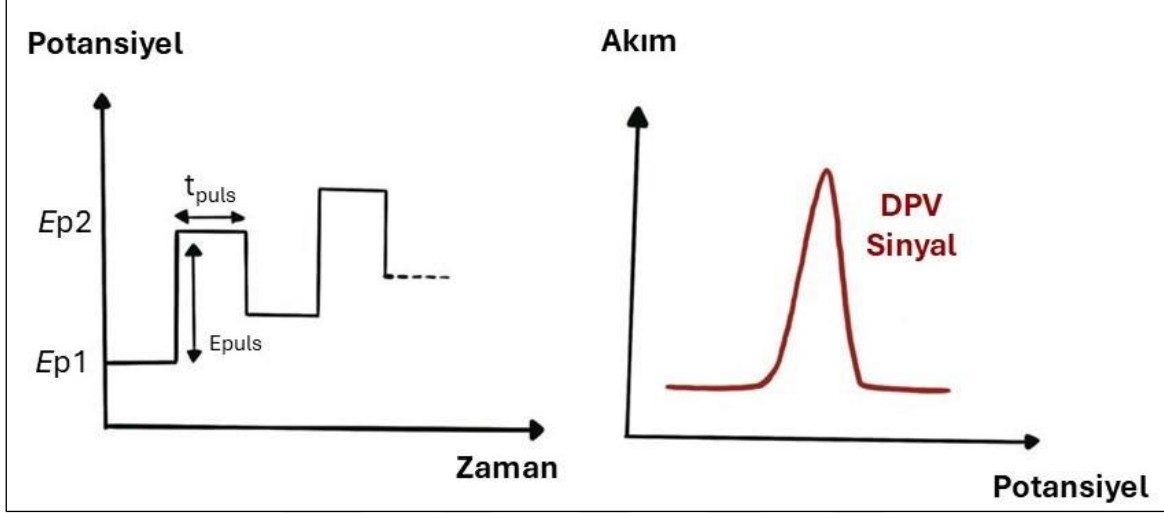
Elektrokimyasal sensörler genel olarak amperometrik, kondüktometrik ve potansiyometrik olmak üzere üç grupta incelenir. Potansiyometrik biyosensörlerde, referans elektroda kıyasla çalışma elektrodunun potansiyeli ölçülürken; kondüktometrik sensörlerde metal elektrotlar arasındaki iletkenlik değişimi takip edilir. Amperometrik biyosensörler ise belirli bir potansiyelde, reaksiyon sonucu oluşan elektrokimyasal türlerin derişimine bağlı akımı algılar. Bu sensör türleri arasında özellikle amperometrik olanlar, hızlı, hassas ve yüksek doğrulukta analiz yapabilme yetenekleriyle öne çıkar (Mello ve Kubota, 2002).

Bu tez çalışması kapsamında, IgG'nin elektrokimyasal yanal akışlı immünoassay test stripi üzerinde tayini için potansiyometrik bir yöntem olan diferansiyel puls voltametri kullanılmıştır.

2.7.1. Diferansiyel puls voltametri

Diferansiyel Puls Voltametri (DPV), faradik ve faradik olmayan akımlar arasındaki oranı artırarak tayin hassasiyetini geliştirmek için tasarlanmış son derece duyarlı bir tekniktir. Bu yöntemde, doğrusal bir potansiyel taraması üzerine gerilim darbeleri uygulanır. Akım, her darbeden hemen önce ve darbenin bitiminden hemen önce ölçülür ve bu iki ölçüm arasındaki fark kullanılarak voltammogram elde edilir. Şekil 2.8'de, uygulanan darbe dalga formunu ve tipik bir DPV voltammogramını göstermektedir. Akım yanıtındaki keskin pikler, hedef analitin oksidasyon veya redüksiyon olaylarına karşılık gelir. Bu piklerin büyüklüğü analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve böylece hassas kantitatif analiz yapılmasına olanak tanır.

DPV, diferansiyel akım ölçümü sayesinde arka plan gürültüsünü azaltır ve faradik sinyali güçlendirerek önemli ölçüde artırılmış duyarlılık sağlar. Bu yüksek duyarlılık, DPV'yi özellikle biyosensör uygulamalarında düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tayinine uygun hale getirir (Gomes ve diğerleri, 2023; Nawaz ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.8. Diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği. (a) Uygulanan potansiyel dalga formunun şematik gösterimi; doğrusal bir potansiyel taraması üzerine bindirilmiş bir dizi gerilim darbesini göstermektedir. Duyarlılığı artırmak için akım her darbeden hemen önce ve hemen sonra ölçülür. (b) Hedef analite karşılık gelen belirgin bir akım pikini gösteren tipik bir DPV voltammogramı

Bu düzenek üç elektrotlu sistem bileşenlerinden oluşur. Bunlar; çalışma elektrodu: elektron transferinin gerçekleştiği elektrokimyasal reaksiyon bölgesidir. Elektrodun malzemesi ve yüzey modifikasyonları, ölçümün duyarlılığını ve seçiciliğini etkiler. Referans Elektrodu (RE): Sabit bir potansiyeli korur ve potansiyel kaymasını ortadan kaldırır. Karşıt Elektrot (CE): Akımı taşıyan elektrot olarak görev yapar ancak potansiyel ölçümlerini etkilemez. Genellikle platin veya karbon gibi inert malzemelerden yapılır ve redoks reaksiyonuna katılmadan etkin yük transferi sağlar.

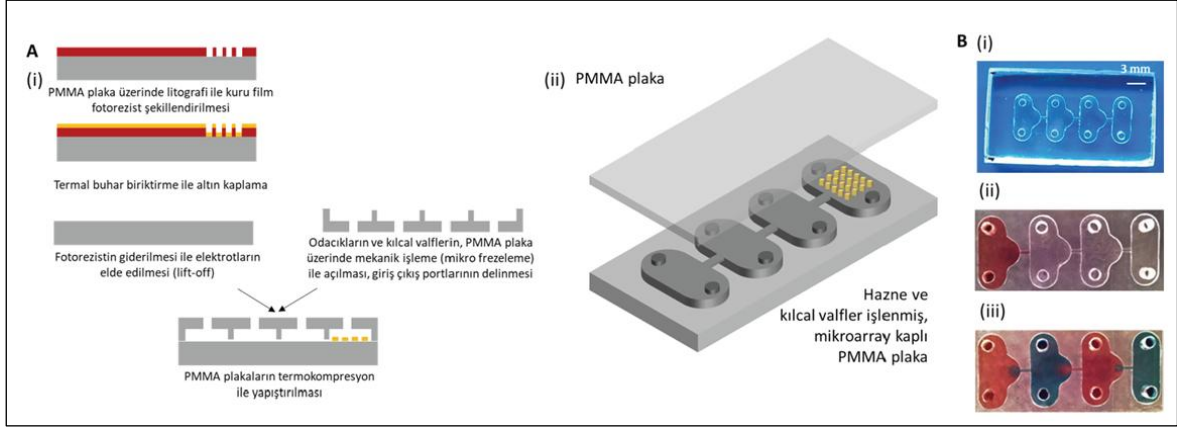
2.8. Mikroçip Sistemleri

Mikroakışkan teknolojiler, biyolojik ve kimyasal analizlerin minyatürizasyonunu sağlayarak laboratuvar fonksiyonlarını mikro veya nano skalada çiplere taşımayı mümkün kılmıştır. Bu alandaki çözümler aktüatör ve pompaların kullanıldığı aktif sistemlerden pasif mikroçiplere kadar geniş bir yelpazeye sahiptir. Pasif mikroçipler, dışarıdan mekanik veya elektriksel güç

gerektirmeden; kapiler kuvvet, yüzey gerilimi, wicking (emme) mekanizmaları ya da tasarımsal hidrodinamik direnç gibi içsel fiziksel etkilere dayanarak akışı yöneten cihazlardır. Bu çalışma prensibi, pasif çipleri enerji gerektirmeyen, düşük maliyetli ve taşınabilir point-of-care uygulamaları için özellikle uygun kılar (Hassan ve diğerleri, 2020). Kapiler kontrollü akış, pasif mikroçiplerin en yaygın kullanılan çalışma mekanizmalarından biridir. Kanal geometrisi, yüzeyin ıslanabilirliği (hidrofilik/hidrofobik dengesi) ve kullanılan porozite özellikleri sıvı menisküsünün davranışını belirler; böylece akış hızı, dolum süresi ve akış profilinin zamansal karakteri tasarım ile kontrol edilebilir. Son beş yılda yapılan çalışmalar, kapilariteyi daha öngörülebilir ve tekrarlanabilir hale getirmek için kanal kesitlerinin optimizasyonu, yüzey enerji modifikasyonları ve üç boyutlu (3D) üretim tekniklerinin kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Bu gelişmeler, özellikle biyolojik sıvılar (tam kan, serum) gibi karmaşık örneklerin pasif olarak yönetilmesinde ilerleme sağlamıştır (Azizian ve diğerleri, 2023).

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar pasif mikroçipler alanındaki en olgun alt yapılardan biridir; düşük maliyet, basit üretim süreçleri ve ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid ve Robust, Equipment-free, Deliverable) kriterlerine uygunlukları sebebiyle sağlık uygulamalarında hızla yaygınlaşmıştır. 2020–2024 döneminde yayımlanan sistematik derlemeler, kağıt mikroakışkanların immünoassayler, kantitatif renk/elektrokimyasal ölçümler ve çoklu analit tespiti için pratik çözümler sunduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte kağıt platformlarının hassas akış kontrolü, depolama stabilitesi ve büyük ölçekli üretime geçişte karşılaştığı zorluklar da rapor edilmiştir (Noviana ve diğerleri, 2021).

Pasif mikroçiplerin biyosensör entegrasyonu (elektrokimyasal, optik, YZRS vb.) alanında da kayda değer ilerlemeler olmuştur. Pasif akış kontrollü elektrokimyasal platformlar düşük örnek hacimlerinde hızlı kantitatif ölçüm yapabilmekte; YZRS entegrasyonları ise sinyal iyileştirme stratejileriyle düşük konsantrasyon tespit sınırlarını düşürmektedir. Bu entegrasyonlar pasif cihazları saha koşullarında hızlı ve hassas analiz yapabilen, kullanıcı dostu tanısal çözümler haline getirmiştir (Mazzaracchio ve Arduini, 2025).



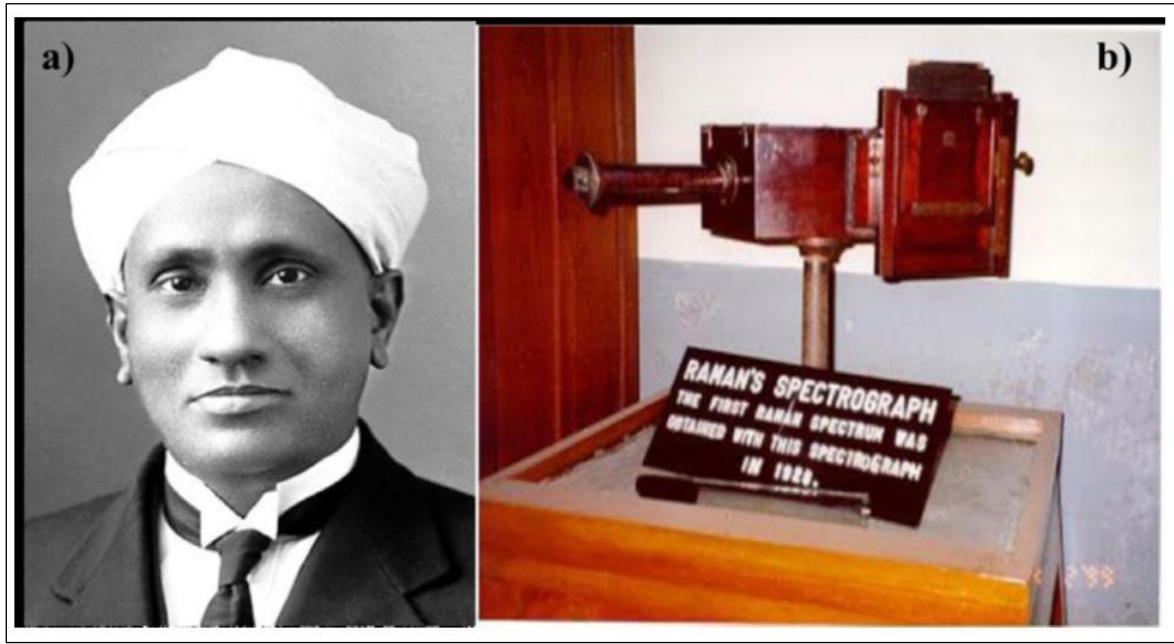
Şekil 2.9. A) (i) Mikro akışkan çipin üretim aşamaları. (ii) Mikro akışkan çipin genel yapısı, B) (i) Daha önce kullanılan mikro akışkan çipin bir örneği, (ii) ve (iii) Mikro akışkan çipin ilk akış testi sonuçları

Manyetik nanopartikül ile yönlendirmenin mikroakışkan immünoassay prosedürleri ile birleştirilmesi minyatürize sistemleri daha da elverişli hale getirmiştir. Hedef analite spesifik antikolar ile modifiye edilen manyetik nanopartiküllerin bir mikropipet yardımı ile pasif bir mikroçip içerisine aktarılması ve bu partiküllerin dışarıdan bir magnet yardımı ile çip içerisinde hareket ettirilerek diğer etkileşim ve yıkama basamaklarının çip içerisinde kolayca gerçekleştirildiği çalışmalar mevcuttur. Laboratuvarımızda tasarlanan ve üretimi Ortadoğu Teknik Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilmiş olan dört odacıklı pasif mikroçipin görüntüsü Şekil 2.9.'da gösterilmiştir. Ayrıca, araştırma grubumuzda mikroçip içerisinde gerçekleştirilen birçok çalışma bulunmaktadır (Ahi ve diğerleri, 2022; Eryılmaz ve diğerleri, 2025; Gjergjizi ve diğerleri, 2018).

2.9. Raman Spektroskopisi

Spektroskopi, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Spektroskopik yöntemler; emisyon, absorpsiyon, floresans veya saçılma olaylarına dayanır. Aynı zamanda çok çeşitli örneklerin karakterizasyonunda spektroskopik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemler örneklerin nitel (kalitatif) ve nicel (kantitatif) analizlerinde kullanılmaktadır. 1923 yılında Smekal, elastik olmayan saçılmanın meydana gelebileceğini öne sürmüştür (Smekal, 1923). Bu hipotez, 1928 yılında Chandrasekhara Venkata Raman ve Kariamanickam Srinivasa Krishnan tarafından deneysel olarak kanıtlanmıştır (Raman ve Krishnan, 1928). Yapılan bu deneyde, güneş ışığı bir teleskop yardımıyla toz parçacıkları içermeyen saf sıvı veya gaz molekülleri üzerine odaklanmıştır.

Saçılan ışık başka bir mercek yardımıyla toplanarak saçılan ışığın frekansında bir değişim olduğunu kanıtlamak için araştırmacılar optik bir filtre kullanmıştır. Yapılan bu deneyin ardından bu keşif daha sonra “Raman etkisi” olarak adlandırılmıştır ve Sir Raman bu buluşu nedeniyle 1930 yılında Fizik Nobel Ödülü’ne layık görülmüştür. Bu önemli keşfi nedeniyle, 15 Aralık 1998 tarihinde Amerikan Kimya Derneği ve Hindistan Bilim Derneği tarafından “Uluslararası Tarihi Kimyasal Dönüm Noktası” ödülüne layık görülmüştür (Kayış ve diğerleri, 2024).



Şekil 2.10. a) Chandrashekhara Venkata Raman, b) ilk Raman spektrometresi

2.9.1. Raman spektroskopisinin temelleri

Raman spektroskopisi, moleküler titreşimleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılan temel spektroskopik yöntemlerden biridir. Bu yöntemle, incelenen molekülün fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi elde edilir. Ölçüm sonucunda analitten elde edilen Raman pikleri, moleküldeki fonksiyonel gruplar ve atomlar arasındaki bağlar hakkında bilgi verir. Hatta bu yöntemle kantitatif analiz yapmak da mümkündür (Smith ve Dent, 2019). Bir molekülden Raman sinyali elde edebilmek için, moleküller hareket ederken molekülün polarize olabilirliğinde net bir değişim olması gerekir (McCreery, 2005). Polarize olabilirlik, elektronların orijinal konumlarından sapmasının ne kadar kolay olduğunu ifade eder. Kimyasal bağ çevresindeki elektron dağılımındaki değişim de molekülün polarize olabilirliğinde değişikliğe yol açabilir (Jeanmaire ve Van Duyne, 1977). Bu durumda,

Raman spektrometresi ile yapılan ölçüm sonucunda monokromatik ışığın elastik olmayan saçılması sonucu sinyaller elde edilebilir.

Monokromatik ışık madde ile etkileşime girdiğinde, fotonlar absorbe edilebilir, geri yansıtılabilir, kırılarak iletilebilir veya saçılabilir. Absorpsiyonun gerçekleşebilmesi için, fotonların enerjisi maddenin temel ve uyarılmış enerji seviyeleri arasındaki enerji farkına eşit olmalıdır. Absorpsiyon spektroskopisi, başlangıçtaki fotonların ve madde ile etkileşime girdikten sonra kalan fotonların oranını ölçer. Bir diğer olasılık ise saçılma ve saçılma için böyle bir enerji dengesi gerekmez. Saçılma sürecinde molekül geçici bir enerji seviyesine yükselir ve bu enerji farkı lazerin enerjisi ile orantılıdır. Fazla enerji, çekirdek etrafındaki elektron bulutunu deforme ettiği için kararsızdır ve hemen saçılır. Gelen ve saçılan fotonun enerjisi aynı ise bu durum elastik saçılma (Rayleigh saçılması) olarak adlandırılır. Öte yandan, gelen ve saçılan fotonun enerjileri farklı ise buna elastik olmayan saçılma veya Raman saçılması denir. Rayleigh saçılması baskın durumdur ve Raman saçılmasının olasılığı yaklaşık milyonda birdir (Laserna, 1996).

2.9.2. Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi

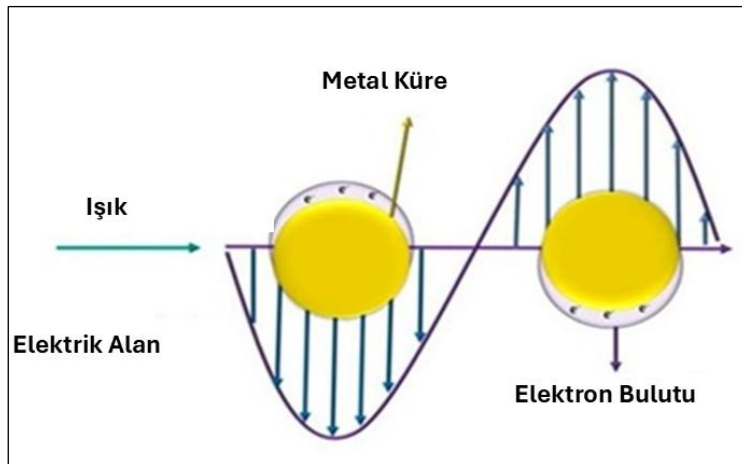
YZRS tekniğinin keşfi ile Raman yönteminin düşük duyarlılık sorunu ortadan kalkmış ve bu yöntemle birçok kimyasal maddenin duyarlı tayini mümkün hâle gelmiştir. Böylece Raman spektroskopisi, birçok farklı alanda uygulamalarda kullanılan önemli bir yöntem haline gelmiştir. YZRS, ilk olarak Fleischmann ve grubu tarafından gümüş elektrot üzerine adsorbe olmuş piridin moleküllerinde gözlemlenmiştir (Fleischmann ve diğerleri, 1974). Sinyal yükselmesinin nedeninin, kazınmış elektrot yüzeyinin daha fazla piridin molekülünün adsorpsiyonuna izin vermesi olabileceği düşünülse de, bu açıklama diğer iki grup tarafından yapılan çalışmalarla çürütülmüştür. Bu açıklamada, sinyaldeki artışın elektrot yüzey alanındaki artıştan kaynaklanıyorsa, sinyal artışının en fazla 10 kat olabileceği belirtilmektedir; ancak gözlemlenen sinyal artışı 10^6 kat olarak bulunmuştur (Albrecht ve Creighton, 1977).

Yılmaz ve ark. (2017), silikon diski fiziksel buhar biriktirme yöntemi ile yarı iletken organik bir malzeme ile kaplamış ve bu yüzeyde metilen mavisi için beklenmedik şekilde 3×10^4 kat daha güçlü Raman sinyalleri elde etmiştir. Daha sonra, bu yüzeye 9–16 nm kalınlığında altın parçacıkları kaplayarak, yükseltme faktörünün 10^{10} kata kadar arttığını rapor etmişlerdir ve

böylece metilen mavisi için zeptomol (10^{-21}) seviyesinin altındaki Raman sinyallerini elde edebilmişlerdir (Yılmaz ve diğerleri, 2017).

Elektromanyetik yükseltme mekanizması

Elektromanyetik (EM) mekanizmayı daha iyi anlamak için öncelikle bunun yüzey plazmon rezonansına (SPR) dayandığını belirtmek gerekir. Işık, metalik nanoparçacık ile etkileşime girdiğinde, iletken elektron bulutunda bir yer değiştirme meydana gelir (Şekil 2.11). Bu elektron bulutunun uyarılması yüzey plazmonu olarak adlandırılır. Yüzey plazmonlarının varlığı ilk olarak Ritchie tarafından öne sürülmüştür (Ritchie, 1957). Nanometre boyutunda metalik yapıların ışıqla uyarıldığı bölgede bulunan bir molekül, daha yoğun Raman sinyalleri saçmaktadır. Bu sinyal artışı, gelen ışığın dalga boyu (frekansı), polarizasyonu ve şiddeti ile metalik nanoyapının boyutu ve şekline bağlıdır (Germain ve diğerleri, 2005; Jain ve diğerleri, 2007). Gelen ışığın dalga boyu, metal yüzeyin uyarılma dalga boyuna yaklaştıkça Raman sinyalinde daha fazla artış gözlemlenir (Campion ve Kambhampati, 1998; Orendorff ve diğerleri, 2006). YZRS, metal nanoparçacık yüzeyindeki yüzey plazmonları ile etkileşen lazer ışığı tarafından oluşturulan elektromanyetik alandan yararlanır. Sinyalin yükselme adımları şu şekilde özetlenebilir: Öncelikle gelen ışık yüzey plazmonlarını uyarır ve plazmonların yarattığı elektrik alan nedeniyle yüzeydeki moleküller polarize olur. Böylece molekül titreşim durumunu değiştirdiğinde, molekülün polaritesi de değişir. Polaritedeki bu değişim nedeniyle yeni bir plazmon yüzeyi oluşur. Son adımda, yüzey plazmonu saçılan Raman ışığıyla birlikte hareket edebilir.



Şekil 2.11. Küresel metalik nanoparçacıklar üzerindeki yüzey plazmonlarının şematik gösterimi

2.9.3. Kullanılan YZRS platformları

YZRS tekniği, sinyal artışına neden olan aktif bir yüzey gerektirir. Yüzeydeki metal atomlarının, yüzey plazmonlarının oluşmasına izin veren gümüş, altın, platin ve bakır gibi metallere ait olması gerekir (Lu ve diğlerleri, 2009; Siemes ve diğlerleri, 2001). Yapılan çalışmalar, en çok gümüş atomlarının Raman sinyallerini güçlendirdiğini göstermiştir (Arunkumar ve Bradley, 1983).

Son yıllarda, YZRS aktif yüzeyler hazırlamak için birçok yöntem geliştirilmiştir. YZRS aktif yüzey aşağıdaki yöntemlerden biri kullanılarak hazırlanabilir:

- Kolloidal nanoparçacık çözeltisi hazırlanması,
- Metal nanoparçacıkların çeşitli fiziksel teknikler ile yüzeylere kaplanması (buhar biriktirme, fotobirikim, vakum buharlaştırma, termal buharlaştırma),
- Metal plakaların asit ile aşındırılması,
- Metal plakaların lazer ile aşındırılması,
- Elektrokimyasal metal yüzey hazırlanması.

Kolloidal çözeltinin en yaygın kullanılan yöntem olduğu, kolay hazırlandığı ve yüksek EF (Enhancement Factor – Yükseltme Faktörü) değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Sancı ve Volkan, 2009; Vongsvivut ve diğlerleri, 2010). Nanoparçacıkların şekli, boyutu, geometrisi ve dizilimi, YZRS etkisini büyük ölçüde değiştirmektedir (Duan ve diğlerleri, 2006). Çalışmalarda sinyallerin tekrarlanabilirliğini sağlamak için hazırlanan yüzeylerin homojen bir yapıda olmasına dikkat edilmelidir. Bu dezavantaj, nanoparçacıkların destek yüzeye tutturulmasıyla giderilebilir (Park ve diğlerleri, 2006).

Altın nanoyapıların elektronik, optik ve katalitik özellikleri, büyük boyutlarda gözlemlenen özelliklerinden oldukça farklıdır. Bu farklılıkların çoğu, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve altın nanokristallerindeki serbest elektronların mekânsal kısıtlılığından kaynaklanır. Ayrıca şekil, nanokristallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yönetilmesinde önemli bir parametredir. Küresel olmayan nanokristal yapılar, küresel olanlara kıyasla anizotropik optik ve elektronik tepkiler gösterir. Küresel olmayan çeşitli nanokristal yapılar arasında en ilgi duyulan, Au nanoçubuklar olarak bilinen çubuk benzeri yapılardır. Optik cihazlar, biyokimyasal sensörler ve nanotıpta önemli uygulamalara sahip olmaları nedeniyle, son

yirmi yılda bu yapıların geliştirilmesi ve karakterizasyonu üzerine yapılan araştırmalar artmıştır ve nanoyapıların boy oranını ve verimini artırmak, şekli ve benzerliği kontrol etmek gibi amaçlarla birçok yöntem geliştirilmiştir.

Gelen ışık manyetik nanoparçacıkla etkileştiğinde, ışığın elektromanyetik alanı nanoparçacık yüzeyindeki iletken elektronların çok sayıda parçacığın (örneğin elektronların) bireysel değil, birbirleriyle uyumlu ve eş zamanlı şekilde hareket etmesini ifade eder. salınımını uyarır. Bu olaya lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) adı verilir. LSPR oluşumu, belirli dalga boylarında ışığın güçlü absorpsiyonuna ve saçılmasına neden olur. Farklı boyut, şekil ve malzemeye sahip nanoparçacıklar farklı absorpsiyon özellikleri gösterir. Küresel altın nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumunda tek bir plazmon bandı gözlemlenirken, altın nanoçubukların spektrumunda enine (transversal) ve boyuna (longitudinal) olmak üzere iki farklı plazmon bandı gözlemlenir.(Kayaş ve diğerleri, 2024).

Bu tez çalışmasının birinci bölümünde, YZRS platformu olarak kağıt elektrot kullanılmıştır. Kağıt elektrotların yüzeyi elektrokimyasal olarak modifiye edilerek antikor immobilizasyonu sağlanmıştır. Analiz, sandviç yapıda Raman aktif etiket bağlı altın nanoçubuk kullanılarak ve Raman aktif etiketin takibiyle gerçekleştirilmiştir (Kayaş ve diğerleri, 2025). İkinci bölümde ise, pasif mikroçip içerisinde Raman aktif etiket bağlı altın nanoçubuk ile altın kaplı manyetik nanoparçacığın etkileşimi sonucunda oluşan sandviç yapıda Raman aktif etiketin takibi ile analiz yapılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

11-Merkaptoundekanoik asit (11-MUA), 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS) ve sığır serum albümini (BSA) Sigma-Aldrich'ten (Taufkirchen, Almanya) temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, sodyum klorür, potasyum klorür ve sodyum hidroksit Merck'ten temin edilmiştir. Liyofilize eksozom standartları Abcam (ab239689, İngiltere) tarafından sağlanmıştır. Anti-CD9 antikor (Mouse monoklonal C-4) Santa Cruz Biotechnology'den (Santa Cruz, CA, ABD) temin edilmiş ve PBS, pH 7.4 içinde seyreltildikten sonra ek saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. 2-morfinoetan sülfonik asit monohidrat (MES), DTNB, tetrahloroaltat asit (HAuCl_4), heksadekiltrimetilamonyum bromür (CTAB), L-askorbik asit (AA) ve etanol Sigma-Aldrich'ten (Taufkirchen, Almanya) temin edilmiştir. Gümüş nitrat (AgNO_3) ve sodyum borhidrür (NaBH_4) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Eritropoietin BRP3 standartları EDQM (Avrupa) tarafından sağlanmıştır. hCG ve hLH Delfia'dan temin edilmiştir. L-Sistein hidroklorür, anhidrat ($\geq 98\%$), D-Glukoz-6-fosfat disodyum tuzu hidrat ($\geq 98-100\%$), dopamin hidroklorür, L-Fenilalanin ($\geq 98\%$), SpeedBeads manyetik karboksilat modifiye partiküller Sigma-Aldrich'ten (Taufkirchen, Almanya) temin edilmiştir. İnsan IgG proteinleri Fitzgerald'dan temin edilmiştir. Amilaz, kalsiyum, klorür, kreatinin, glukoz, magnezyum, mikroalbumin, fosfor, potasyum, toplam protein, sodyum, üre azotu (BUN) ve ürik asit niteliksel seviyelerini içeren sentetik idrar kontrol örnekleri Bio-Rad'dan temin edilmiştir. Nitrocellüloz (NC) membran (Hi-flow Plus HFC07504) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. PE substratının hazırlanmasında kullanılan karbon macunu Daejoo Electronic Materials (Gyeonggi-do, Güney Kore) tarafından sağlanmıştır. Referans elektrotun hazırlanması için gümüş/gümüş klorür ($\text{Ag}|\text{AgCl}$, 9:1) macunu Henkel'den (Düsseldorf, Almanya) temin edilmiştir.

Poliklonal keçi anti-insan-IgG antikor (I1886), insan-IgG tam molekülü (I2511), sığır serum albümini (BSA), tetrahkoroaltat asit çözeltisi (HAuCl_4 , %30 w/w), disodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{-citrat}$), fosfat tamponlu salin (PBS) tabletleri, sodyum tetraborat, borik asit, sukroz, Tween-20 Sigma-Aldrich'ten (Madrid, İspanya) temin edilmiştir. Tavuk anti-keçi

antikoru Abcam'dan (ab86245, Cambridge, İngiltere) temin edilmiştir. Poliklonal keçi anti-insan-IgG antikoru, TL'de tespit antikoru (dAb) ve yakalama antikoru olarak kullanılırken, tavuk anti-keçi antikoru CL'de yakalama antikoru olarak kullanılmıştır. Nitroselüloz membran (CN150, 1UN15WR100025NT) Sartorius Stedim'den (Göttingen, Almanya) temin edilip tayin pedi olarak kullanılmıştır. Selüloz membranlar (CFSP001700) numune ve emici pedler için, cam fiber (Standard 14, GFCP00900) konjugat pedi için kullanılmıştır ve her ikisi de Millipore Corporation'dan (Billerica, MA, ABD) temin edilmiştir. Yapışkan destek kartları (MIBA-020) DCN Dx'den (Carlsbad, CA, ABD) temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında Milli-Q saflaştırma sisteminden (Millipore, ABD) elde edilen deiyonize su (18.2 MΩ.cm) ile kullanılmıştır. Raman spektroskopisi, 785 nm lazer kaynağına sahip bir Raman mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (DeltaNu Examiner Inc., Laramie, WY, ABD & Qimagin MicroPublisher-RTV-5.0, Kanada). Düzenekte, örnek için hareket ettirilebilen bir lamel mikroskop tutucusu ve 0 °C'de soğutulan bir yük bağlı aygıt (CCD) detektörü bulunmaktadır. İlk deneylerde, DTNB'den elde edilen YZRS sinyalleri, lazer ışını kağıt elektrot tabanlı altlık üzerine yönlendirilerek kaydedilmiştir. Cihaz parametreleri, 60 saniyelik veri toplama süresi, 10X objektif, 30 µm lazer nokta alanı çapı mı?, 150 mW lazer gücü olacak şekilde ayarlanmış ve tüm ölçümlere zemin (baseline) düzeltilmesi uygulanmıştır. Eksozom tayini için, 785 nm lazerli, CCD detektörlü ve sayısal açıklığı (NA) 0,65 olan 20X objektife sahip bir Raman spektrometresi (B&W Tek Instruments, ABD) kullanılarak Raman spektrumları elde edilmiştir. Raman verilerinin edinimi ve analizi, 30000 ms entegrasyon süresi ile BWSpec4 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, eksozomların CTEM görüntüleri, FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin Yüksek Kontrastlı TEM Mikroskobu cihazı ile alınmıştır. Test hattı ve kontrol hattı, Image Technology (Hanover, Almanya) firmasının IsoFlow Bioreagent dispenserı kullanılarak nitroselüloz membran üzerine uygulanmıştır. Fonksiyonelleştirilmiş nanoparçacıklar, Beckman Coulter (Brea, CA, ABD) firmasının Allegra 64R santrifüj cihazı ile santrifüj edilerek saflaştırılmıştır. Şeritler, Shanghai Kinbio Tech (Pudong Yeni Bölgesi, Şanghay, Çin) firmasının lateral flow şerit kesici cihazı ile kesilmiştir. UV-Vis spektrumları, Molecular Devices (San Jose, CA, ABD) firmasının SpectraMax ID3 spektrofotometresi kullanılarak kaydedilmiştir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) mikrografları, 120 kV çalıştırma gerilimi ile TEM TECNAI G2 20ST (Fei, Hillsboro, OR, ABD) cihazında parlak

alan modunda elde edilmiştir. Veri analizi ImageJ yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, ücretsiz olarak rsb.info.nih.gov/ij/ adresinden erişilebilir) kullanılarak yapılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler için Palmsens 4 cihazı kullanılmıştır (Ps.Trace 5.12).

3.2. Yöntem

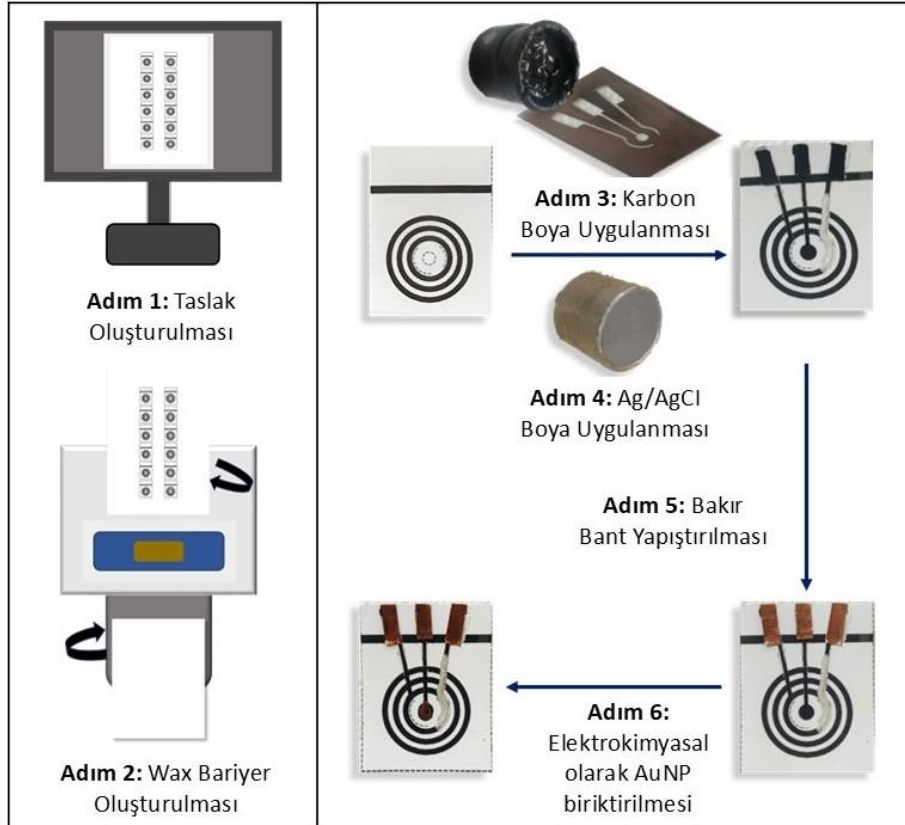
Bu tez kapsamında üç farklı analiz yaklaşımı geliştirilmiştir. Birinci bölümde, idrar örneklerinde eksozom tayini için kağıt tabanlı bir YZRS platformu oluşturulmuştur. Burada kağıt yüzeyler Au nanoyıldızlar ile modifiye edilerek anti-CD9 ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sinyal arttırımı amacıyla AuNÇ'lar YZRS etiketi ile modifiye edilerek kullanılmış; geliştirilen yöntem PBS ortamında ve gerçek örnek olarak, konsantrasyonu bilinen eksozom standartlarının yapay idrar örneklerine eklenmesi ve tayin edilmesiyle doğrulanmıştır. İkinci bölümde, prostat kanserine yönelik eksozom biyobelirteçlerinin tespiti için mikroakışkan çip tabanlı bir sistem geliştirilmiştir. Bu amaçla Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller sentezlenmiş, ardından altın kaplama ile $Fe_3O_4@Au$ yapısı elde edilmiş ve sandviç tip YZRS immünoassay analizi, konsantrasyonu bilinen eksozom standardı eklenmiş yapay idrar örneklerine uygulanmıştır. Üçüncü bölümde, karbon ve gümüş boya tabanlı elektrotlar yatay akış platformuna entegre edilerek elektrokimyasal IgG tayini yapılmıştır. Altın nanopartiküllerin asidik ortamda protonlanmasına bağlı indirgenme potansiyeli izlenerek analiz gerçekleştirilmiştir

3.2.1. Kağıt tabanlı platform kullanılarak eksozom tayini ve YZRS uygulamaları

Kağıt tabanlı YZRS platformunun hazırlanması

Kâğıt elektrotun hazırlanması için, çözeltinin kâğıt membran üzerinde tutunmasını sağlamak amacıyla bir wax yazıcı kullanılarak hidrofobik bariyerler oluşturulmuştur. Kağıt tasarımı, tek-damla immünoassay yöntemine uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, su jeti kesici ile oluşturulan 0.1 mm'lik çelik plaka yardımıyla kâğıt membran yüzeyine karbon boya uygulanarak üç elektrotlu elektrokimyasal hücre sistemi oluşturulmuştur. Bu aşamada, karşıt elektrot (KE) ve çalışma elektrodu (ÇE) karbon boya ile şekillendirilmiştir. Son olarak, referans elektrotu (RE) için kâğıt membran üzerine Ag/AgCl boya uygulanmıştır. Her bir boya uygulamasının ardından kağıt elektrotlar oda sıcaklığında 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Kullanım öncesinde, wax'ın alttaki tabakalara nüfuz etmesi için

kağıt elektrotlar 90°C 'de 3 dakika boyunca ısıtıcı üzerinde ön ısıtmaya tabi tutulmuştur. Daha sonra, uygun boyutta bakır bant elektrotlara yapıştırılmıştır. Kağıt elektrot, 3.0 cm uzunluğa ve 2.5 cm genişliğe sahip olup, tüm modifikasyonlar 3 mm x 3 mm boyutlarındaki çalışma elektrodu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kağıt elektrot üretim sürecinin şematik gösterimi Şekil 3.1. 'de sunulmaktadır.



Şekil 3.1. Kağıt elektrotun üretim prosedürünün şematik gösterimi

Kağıt tabanlı YZRS platformunun yüzey modifikasyonu ve konjugasyonu

Üretilen kağıt elektrotların ÇE yüzeyine nanostar şekilli AuNP'lerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesiyle modifiye edilmiştir. Başlangıçta, ÇE yüzeyi, fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi (pH 7.4) içinde -1.0 ila +1.0 V aralığında, 100 mV/s tarama hızıyla 3 döngü boyunca dönüşümlü voltametri (CV) ile aktive edilmiştir. Daha sonra, ÇE yüzeyine 0.1 M KCl ve 0.1 M H_2SO_4 içeren ve 0.05 M HAuCl_4 derişimine sahip bir çözeltisi damlatılmış ve ÇE yüzeyini nanostar şekilli AuNP'lerle kaplamak için -0.6/+0.2 V tarama aralığında, 100 mV/s tarama hızında 10 döngüden oluşan 3 set CV ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Yüzey modifikasyonu için, %70-30 etanol-su karışımında 20.0 mM 11-MUA hazırlanmış ve kağıt YZRS platformları ile gece boyunca muamele edilmiştir. Yüzeyden bağlanmamış 11-MUA molekülleri, MES tamponu (pH 6.5) ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, karboksil grubunun aktivasyonu için, 0.02 M EDC ve 0.05 M NHS içeren 50.0 µL MES tamponu yüzeylere damlatılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, ortamda kalan fazla EDC/NHS, PBS (pH 7.4) ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Karboksil grubunun aktivasyonunun ardından, anti-CD9 antikoru 11-MUA ile modifiye edilmiş yüzeylere bağlanmıştır. Bu amaçla, yüzeylere 2.0 µL 10.0 µg/mL anti-CD9 damlatılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Bağlanmamış antikorlar PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Yüzeyde açıkta kalan bölgelerin bloke edilmesi için, kağıt YZRS platformları 50.0 µL %5 BSA çözeltisi ile 30 dakika etkileştirilmiştir. Fazla BSA'yı uzaklaştırmak için PBS ile yıkama işlemi uygulanmıştır.

AuNC'ların sentezi ve modifikasyonu

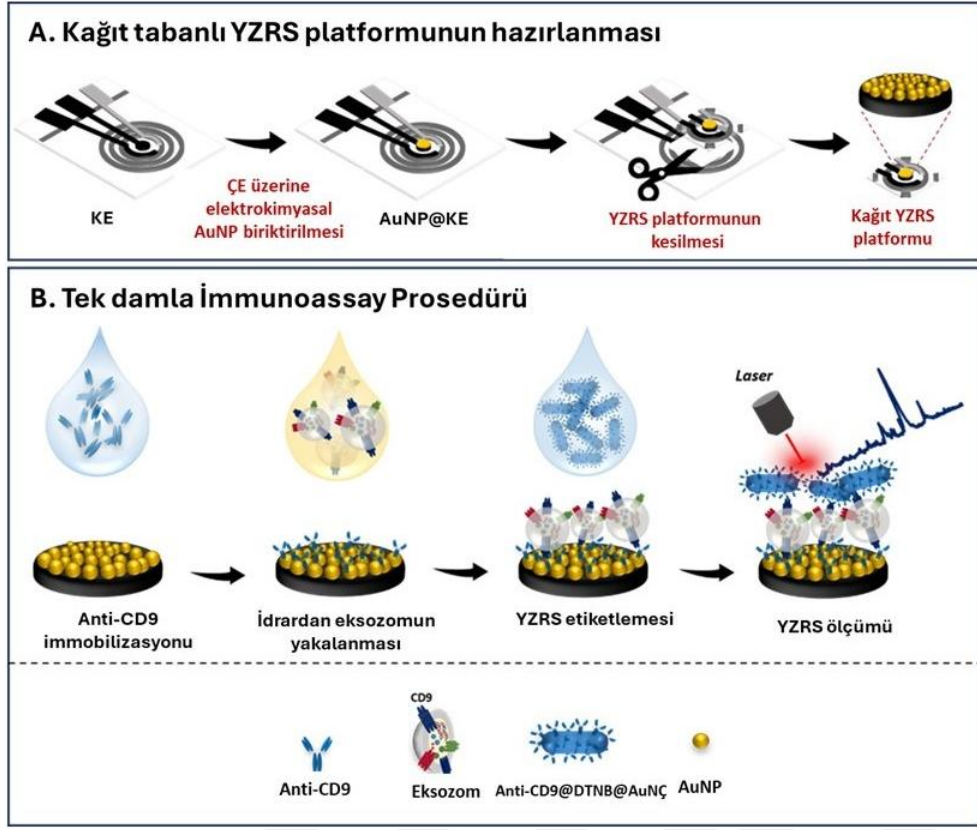
Çubuk şeklindeki altın nanoparçacıkların sentezi, tohum büyütme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ilk olarak 7.5 mL 0.1 M CTAB cam vial içerisine alınmış üzerine 500 µL HAuCl₄ (0.01 M) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra soğuk 600 µL 0.1 M NaBH₄ eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Farklı bir cam vial içerisine sırasıyla 4.75 mL 0.1 M CTAB, 250 µL HAuCl₄ (0.01 M), 60.0 µL 0.01 M AgNO₃ ve 100.0 µL 0.1 M AA çözeltileri eklenmiştir. Son olarak, 10.0 µL tohum çözeltisi büyüme çözeltilerine ilave edilmiş ve AuNC oluşumunu kolaylaştırmak için 1 saat boyunca 30°C su banyosunda tutulmuştur. Sentezlenen mavi renkli AuNC'lar, 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlenmiş ve ardından üç kez deiyonize su ile yıkanmıştır.

YZRS etiketi hazırlamak için sentezlenen AuNC'lar, %0,01 Tween-20 ve 25.0 mM DTNB içeren 200.0 µL etanol çözeltisine aktarılmış ve verimli bağlanma sağlamak için oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir. Bağlanmayan DTNB molekülleri, pH 6.5'teki MES tamponu ile iki kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. DTNB moleküllerindeki karboksil gruplarını aktive etmek için 0.02 M EDC ve 0.05 M NHS, 200.0 µL MES tamponunda çözülmüş ve AuNC'lar bu çözeltide 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, çözeltideki fazla EDC ve NHS molekülleri PBS (pH 7.4) ile üç kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Aktivasyon işleminin ardından, DTNB ile modifiye edilmiş AuNC'lar anti-CD9 antikorları ile konjuge edilmiştir. Bu amaçla, 20.0 µL 10 µg/mL anti-CD9

AuNÇ'larla 45 dakika oda sıcaklığında etkileştirilmiştir. Bağlanmamış antikorlar PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. AuNÇ yüzeylerinde açıkta kalan bölgeleri bloke etmek için, parçacıklar 200.0 µL %5 BSA çözeltisine alınmış ve 30 dakika bekletilmiştir. Fazla BSA molekülleri PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Yıkama adımının sonunda, anti-CD9@DTNB@AuNÇ konjugatları 20.0 µL PBS çözeltisine aktarılmıştır.

Eksozom tayini için tek damla immunoassay protokolü

Eksozom tayini, bir sandviç immünassay yapısı oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 eksozom/mL olmak üzere yedi farklı konsantrasyonda eksozom standart çözeltilerinden 2.0 µL, anti-CD9@kağıt YZRS platformuna damlatılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Bağlanmamış eksozomlar PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sandviç yapıyı oluşturmak için, 2.0 µL anti-CD9@DTNB@AuNÇ etiketleri anti-CD9@kağıt YZRS platformuna eklenmiş ve 45 dakika inkübe edilmiştir. Ortamdaki bağlanmamış Raman etiketlerini uzaklaştırmak için yüzeyler üç kez PBS ile yıkanmıştır. Sandviç yapılar oluşturulduktan sonra, her yüzeyden beş ölçüm yapılarak Raman sinyalleri alınmış ve sonuçlar bu ölçümlerin ortalaması üzerinden değerlendirilmiştir. Eksozom tayini için tek damla immünassay protokolü Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. A) Kağıt tabanlı YZRS platformunun üretiminin şematik gösterimi, B) Hazırlanan kağıt tabanlı YZRS platformu kullanılarak eksozom tayini için tek damla immünoassay prosedürünün şematik gösterimi

3.2.2. Manyetik nanopartikül kullanarak mikroçip ve YZRS tabanlı eksozom tayini

Pasif mikroçip sensörünün hazırlanması

Geliştirilen mikroçip, kapiler valflerle birbirine bağlanmış dört odacıktan oluşmaktadır. Kanallar ve odacıklar, polimetil metakrilat (PMMA) bloklar üzerinde mikroişleme yöntemiyle işlenmiş ve ardından mikroçipi oluşturmak için termal sıkıştırma ile kaplanmıştır. Odacıklar 3 mm çapında açılırken, valf kanalları 400 µm genişliğinde ve 200 µm derinliğinde bir işleme ucu kullanılarak işlenmiştir. İşlem sırasında PMMA plakanın aşırı ısınmasını ve bozulmasını önlemek için yüzey bor yağ ile soğutulmuştur. PMMA üzerinde giriş ve çıkış portları için 1,0 mm çapında delikler açılmıştır. Kanalları kaplamak için ikinci bir PMMA parçası termal sıkıştırma ile yüzeye yapıştırılmıştır. Termal sıkıştırma işlemi, termal gerilme ve boyutsal değişiklikleri önlemek amacıyla 110°C'nin altında gerçekleştirilmiştir. Sıkıştırma sıcaklığını düşürmek için, her iki PMMA parçası işlem öncesinde oda sıcaklığında 4 dakika boyunca kloroform buharına maruz bırakılmıştır.

Ardından, sıcaklık kontrollü bir pres kullanılarak 60°C’de 68,75 N/cm² basınç altında 20 dakika boyunca yapıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanım sırasında nanopartiküllerin yapışmasını önlemek için mikroçipler, yüzey hidrofobikliğini artırmak amacıyla 10 saniye hava plazmasına maruz bırakılmıştır (Ahi ve diğerleri, 2022; Dogan ve diğerleri, 2022; Eryılmaz ve diğerleri, 2025; Gjergjizi ve diğerleri, 2018).

Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin (Au-MNP) sentezi ve modifikasyonu

Altın kaplı manyetik nanopartiküller (Fe₃O₄@Au) sentezlemek için önce manyetik nanopartiküller, Fe(II) ve Fe(III) iyonlarının birlikte çöktürülmesiyle hazırlanmıştır. Başlangıçta, 5,0 mL 1,28 M FeCl₃ ve 5,0 mL 0,64 M FeSO₄·7H₂O deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında sarı-yeşil bir çözelti elde edilmiştir. Çözelti, demir tuzları tamamen çözünene kadar yoğun bir şekilde karıştırılmıştır. Ardından, 125,0 mL 1,0 M NaOH çözeltiye damla damla eklenerek 40 dakika boyunca sürekli karıştırılmıştır ve siyah Fe₃O₄ nanopartiküllerinin oluşumu sağlanmıştır. Bir sonraki adımda, demir nanopartiküllerinin altın kabuk ile kaplanması amacıyla sonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 10,0 mg Fe₃O₄ partikülü, 1,0 M NaOH içinde hazırlanmış 0,27 M EDTA çözeltisine süspansiyon edilerek 5 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Nanopartiküller 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek üst çözelti uzaklaştırılmış ve nanopartiküller üç kez deiyonize su ile yıkanmıştır.

Daha sonra manyetik nanopartiküller, 7,0 mL 0,1 M CTAB, 3,0 mL 0,01 M HAuCl₄ ve 300,0 µL 1,0 M NaOH içeren bir çözelti içerisinde süspansiyon edilmiştir. Karışım yoğun bir şekilde karıştırılarak üzerine 150,0 mg hidroksilamin eklendikten sonra 3 dakika karıştırmaya devam edilmiştir. Nihai çözelti koyu kırmızı renge dönerek altın kaplı manyetik nanopartiküllerin başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir. Deiyonize su ile yıkama işlemi 3 kez gerçekleştirilmiştir (Gjergjizi ve diğerleri, 2018; Tamer ve diğerleri, 2013).

Fe₃O₄@AuNP’lerin yüzeyine antikor immobilizasyonu yapılabilmesi için, önce 20,0 mM 11-MUA çözeltisi saf etanolde hazırlanmış ve Fe₃O₄@AuNP’ler bu çözeltiye alınarak bir gece boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bağlanmayan 11-MUA molekülleri, MES tamponu (pH: 6,5) ile üç kez yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır Fe₃O₄@AuNP’lerin yüzeyinde oluşan serbest karboksil uçlarını aktive etmek için EDC/NHS aktivasyon mekanizması kullanılmıştır. Bu amaçla, 500,0 µL MES tamponu içinde 0,1 M EDC ve 0,05

M NHS içeren bir çözelti hazırlanmıştır. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'ler bu çözeltiye alınarak 45 dakika boyunca çalkalayıcıda tutulmuştur. Aktivasyon sonrası oluşan karboksil grupları ile amin grupları arasında kovalent bağ oluşmuştur ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'lerin yüzeyinde amin-reaktif NHS esterleri meydana gelmiştir. Bu sürenin sonunda $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'ler, bir mıknatıs kullanılarak MES tamponu ile üç kez yıkanmıştır.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ yüzeyine antikor immobilizasyonu

Antikor, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'lerin yüzeyindeki aktive edilmiş karboksil gruplarına immobilize edilmiştir. Eksozom izolasyonu için anti-CD9 antikorunu kullanılmıştır. Immobilizasyon, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ anti-CD9 antikorunu ile 45 dakika boyunca inkübasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Anti-CD9 antikorunun immobilizasyonundan sonra, partiküller mıknatıs kullanılarak PBS (pH 7.4) tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Sandviç yapısının oluşumu sırasında $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ ile AuNC 'lar arasındaki etkileşim dışında oluşabilecek seçici olmayan bağlanmaları önlemek için, bu partiküllerin yüzeylerinde açıkta kalan gruplar %5 BSA ile bloke edilmiştir. Modifiye edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'lere 500.0 μL %5 BSA çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika boyunca çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Sürenin sonunda, yıkama işlemi PBS (pH 7.4) tamponu ile üç kez tekrarlanmıştır.

YZRS etiketi olarak AuNC 'ların modifikasyonu

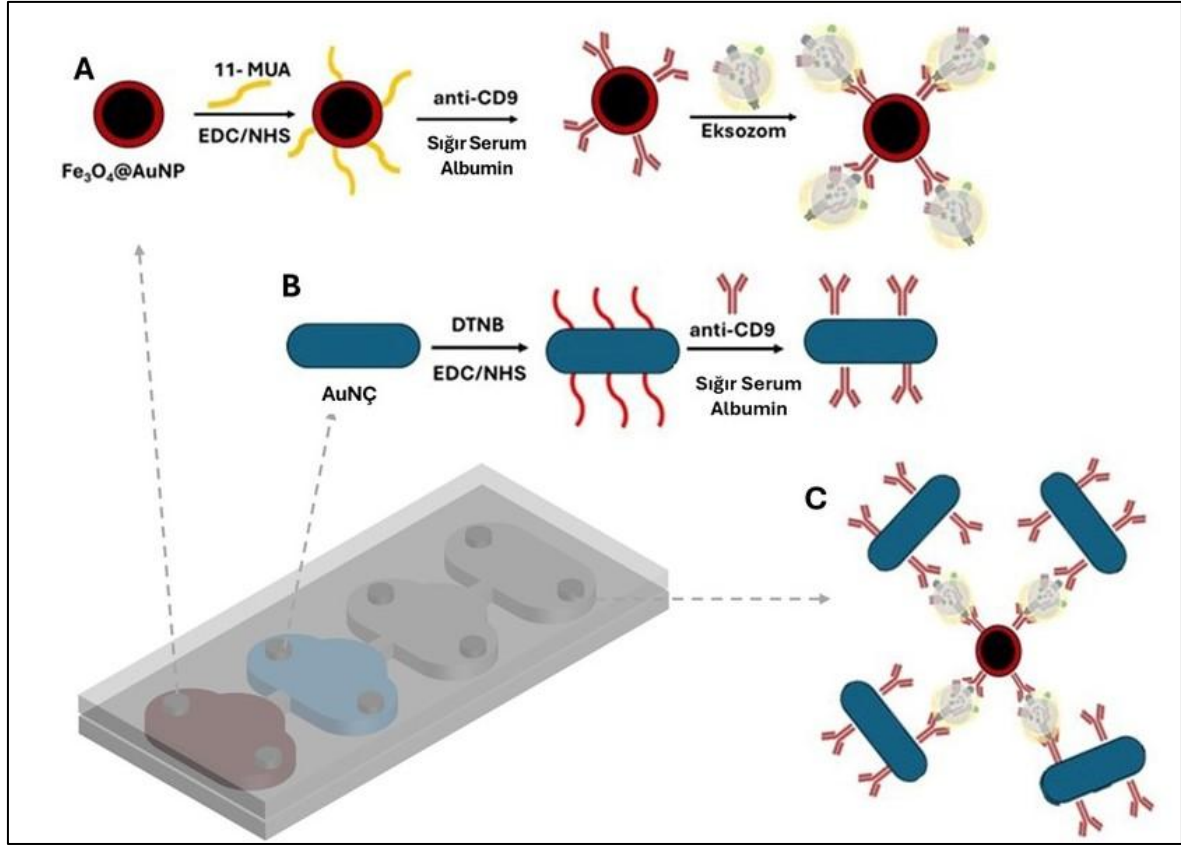
YZRS etiketlerini hazırlamak için sentezlenen AuNC 'ler (AuNC sentezi 3.1. başlığı altında açıklanmıştır.), %0.01 Tween-20 ve 50.0 mM DTNB içeren 200.0 μL etanol çözeltisine aktarılmıştır ve etkin bağlanmanın sağlanması için oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir. Bağlanmayan fazla DTNB molekülleri, MES tamponu (pH 6.5) ile iki kez yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. DTNB moleküllerindeki karboksil gruplarını aktifleştirmek için, 0.1 M EDC ve 0,05 M NHS, 200.0 μL MES tamponu içinde hazırlanmıştır ve AuNC 'lar bu çözelti ile oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, çözelti içerisindeki fazla EDC ve NHS molekülleri PBS (pH 7.4) ile üç kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Aktivasyon işleminden sonra, DTNB ile modifiye edilmiş AuNC 'lar anti-CD9 antikorlarıyla inkübe edilmiştir. Bu amaçla, 10,0 $\mu\text{g/mL}$ anti-CD9 çözeltisinden 20,0 μL AuNC 'larla oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Bağlanmamış antikorlar PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. AuNC yüzeylerinde açıkta kalan bölgeleri bloke etmek için, partiküllere 200,0 μL %5 BSA çözeltisi ilave edilerek çalkalayıcıda 30 dakika çalkalanmıştır.

Bağlanmayan BSA molekülleri PBS ile yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Yıkama adımının sonunda, anti-CD9@DTNB@AuNÇ konjugatları, Şekil 3.3 - B’de gösterildiği şekilde 20,0 µL PBS çözeltisine aktarılmıştır.

Eksozomların tayini için sandviç immünoassay prosedürü ve YZRS ölçümleri

Yüzeyine antikor immobilize edilmiş 200,0 µL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP}$, antijen–antikor etkileşiminin gerçekleşebilmesi için tampon ve 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 ve 10^{10} partikül/mL eksozom standartları ile ayrı tüplerde inkübe edilmiştir. Çalışma grubumuzun önceki çalışmalarında belirlenen optimum $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP}$ miktarı kullanılmıştır (Gjergjizi ve diğerleri, 2018). Tüpler kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında çalkalayıcıda 45 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemle, hedef protein olan eksozom antikor uçlarına bağlanmıştır. Çalkalama süresinin sonunda, bağlanmamış eksozomları uzaklaştırmak için partikül konjugatları mıknatıs kullanılarak PBS (pH 7.4) tamponuyla üç kez yıkanmıştır. Mikroçip içinde immünoassay yapısının konumlandırılması Şekil 3.3.A.’da şematik olarak sunulmuştur.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP@eksozom}$ konjugatı dört bölmeli mikroçipin birinci haznesine, AuNÇ@DTNB@antiCD9 konjugatı ise 13.0 µL hacimde ikinci hazneye aktarılmıştır. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP}$ ’lerin manyetik özelliklerinden yararlanarak, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP@eksozom}$ konjugatı mıknatıs yardımıyla toplanarak mikroçipin kapiller valfinden geçirilip yaklaşık bir dakika boyunca ikinci haznedeki AuNÇ@DTNB@antiCD9 konjugatları ile etkileştirilmiştir. Bu etkileşim sonucunda sandviç yapı oluşturulmuştur. Yine mıknatıs yardımıyla sandviç yapı kapiller valften geçirilerek PBS tamponu (pH 7.4) içeren üçüncü hazneye aktarılmıştır. Bu aşamada, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP@eksozom}$ konjugatı ile etkileşmeyen ve sürüklenme etkisiyle üçüncü hazneye taşınan AuNÇ@DTNB@antiCD9 konjugatları yıkanarak ölçüm haznesine ulaşmaları engellenmiştir. Yıkama işleminin sonunda partiküller tekrar mıknatıs ile belirli bir noktada toplanarak dördüncü hazneye aktarılmıştır. Ölçüm Raman Spektroskopisi ile gerçekleştirilmiş ve AuNÇ ’larla etkileşime giren DTNB sinyalleri kaydedilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda eksozom içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP@eksozom@AuNÇ}$ sandviç yapısının YZRS sinyal şiddetleri ölçülerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Çalışma prensibinin şematik gösterimi Şekil 3.3.C’de sunulmuştur.



Şekil 3.3. A) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP@Eksozom}$ konjugatının hazırlanması, B) $\text{AuNC@DTNB@anti-CD9}$ konjugatının hazırlanması, C) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP@Eksozom@AuNC}$ sandviç immünoassay yapısının oluşumunu gösteren şekilsel gösterim

3.2.3. Elektrokimyasal yatay akış analizi kullanarak IgG tayini

Sitrat kaplı AuNP sentezi

AuNP sentezi, Turkevich yöntemine dayalı sitrat indirgeme protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Turkevich ve diğerleri, 1951). Bu amaçla, 50,0 mL deiyonize su içerisine %1'lik HAuCl_4 çözeltisinden 500,0 μL eklenerek çözelti kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Ardından, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinden 1,25 mL ilave edilerek reaksiyon karışımı yaklaşık 10 dakika süreyle kaynatılmaya devam edilmiştir. Reaksiyon sonunda çözelti renginin kırmızıya dönmesi, küresel altın nanopartiküllerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir (Parolo ve diğerleri, 2020). Elde edilen AuNP süspansiyonu, oda sıcaklığında soğumaya bırakılarak daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

AuNP modifikasyonu

Sitrat kaplı altın nanopartiküllere antikor modifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, 1,5 mL AuNP süspansiyonu ultra saf su içerisinde seyreltilmiş olan 100 µL 100 µg/mL anti-insan IgG antikoruna ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek biyomolekül bağlanması sağlanmıştır. (Kullanılan antikor miktarı literatürde var olan güncel çalışmalarda optimize edilmiştir (Parolo ve diğerleri, 2013; Pauli ve diğerleri, 2015)). Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla antikor bağlı nanopartiküller %0,1 BSA çözeltisi ile muamele edilerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda 14.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek bağlanmayan türler uzaklaştırılmıştır. Son ürün olan işaretli konjugatlar, %5 sukroz, %1 BSA ve %0,5 Tween-20 içeren 10,0 mM pH 7,4 PBS tamponu içerisinde 0,5 mL hacminde yeniden süspanse edilmiştir (Parolo ve diğerleri, 2020).

Sentezlenen AuNP’lerin karakterizasyonu

Sentezlenen küresel AuNP’lerin yapısal ve morfolojik özelliklerinin doğrulanması amacıyla karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, partikül boyutu, şekli ve dağılımının belirlenmesi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) yararlanılmıştır.

TEM analizi

AuNP’lerin TEM analizi için, karbon kaplı bakır grid üzerine 7 µL seyreltilmiş AuNP süspansiyonu damlatılarak ve yaklaşık 1 dakika bekletilerek partiküllerin grid yüzeyine adsorpsiyonu sağlanmıştır. Hazırlanan gridler, 80–120 kV hızlandırma voltajında çalışan transmisyon elektron mikroskobunda incelenmiş ve elde edilen görüntülerden partikül boyutu, şekli ve dağılımı değerlendirilmiştir (Şekil 4.26.) (Ali ve Mutlak, 2024).

UV-Vis analizi

Sentezlenen AuNP’lerin optik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) absorbans spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektral verilerde, yüzey plazmon rezonansı (SPR) bandına karşılık gelen maksimum absorbans pikinin yaklaşık 510–540 nm aralığında gözlemlenmesi beklenmiştir (Srisrattakarn ve diğerleri, 2020).

Konjugasyon pedinin ve numune pedinin hazırlanması

Konjugasyon pedlerinin hazırlanmasında, işaretlenmiş konjugat süspansiyonundan ince uç kullanılan pipet yardımıyla camsı fiber pedlerin üzerine homojen bir şekilde damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlanan konjugasyon pedleri, sonraki aşamalarda kullanılmak üzere oda koşullarında uygun şekilde muhafaza edilmiştir. Bu işlem, konjugatların ped üzerinde stabil bir şekilde depolanmasını ve analizin başlatılması sırasında etkin biçimde salınmasını sağlamıştır.

Numune pedlerinin hazırlanmasında ise selüloz bazlı pedler kullanılmıştır. Pedler, uygulama öncesinde %0,05 Tween-20 ve %0,5 BSA içeren 10,0 mM pH 7,4 PBS tamponuna emdirilmiş ve bir gece süreyle 37°C’de etüv ortamında kurutulmuştur. Bu ön işlem sayesinde, Tween-20 ped yüzeyinde yüzey gerilimini azaltarak kapiler akışı kolaylaştırmakta, BSA ise ped yüzeyindeki non-spesifik bağlanma bölgelerini bloke ederek istenmeyen protein adsorpsiyonunu engellemektedir. Böylece pedlerin yüzey özellikleri optimize edilerek analit uygulaması için daha güvenilir ve tekrarlanabilir bir ortam elde edilmiştir.

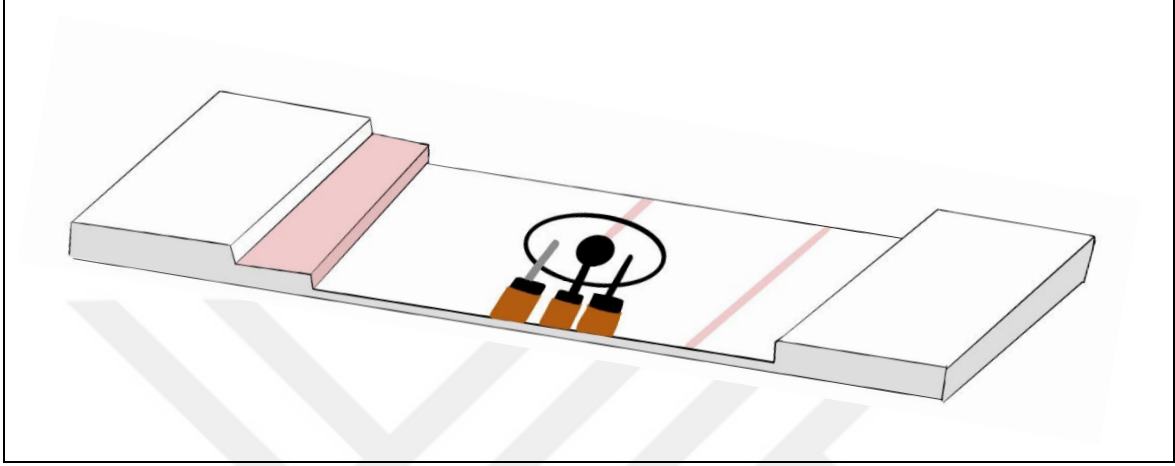
Nitroselüloz membran üzerine antikorların immobilizasyonu

Bu tez kapsamında geliştirilecek kolorimetrik tabanlı yatay akış test platformlarının hazırlanmasında, NC membran üzerine test hattı ve kontrol hattı oluşturulmuştur. Test hattında hedef analitin spesifik tanınmasını sağlayacak birincil antikorlar, kontrol hattında ise analizin doğrulanmasına yönelik ikincil antikor mikro dispenser kullanılarak membran yüzeyine homojen bir şekilde uygulanmıştır. Uygulama sonrasında membranlar 25 °C’de 1 gece kurutularak antikorların membran yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır.

Yatay akış test şeridinin tüm bileşenlerinin bir araya getirilmesi

Bölüm 3.2.1’de ayrıntılı olarak tanımlanan kağıt elektrot, AuNP ile konjuge edilmiş ve antikor modifiyeli konjugatın emdirildiği konjugasyon pedi, örnek pedi ve absorban pedi bir araya getirilerek, Şekil 3.4.’te gösterildiği şekilde elektrokimyasal özelliklere sahip yatay akış test şeridi hazırlanmıştır. Bu montaj, her bir bileşenin doğru konumlandırılması ve akış yolunun kontrolü ile testin hem immunolojik hem de elektrokimyasal performansını

sağlayacak şekilde optimize edilmiştir. Böylece, test şeridi üzerinde numunenin uygulanmasıyla başlayan reaksiyonlar, konjugatların AuNP üzerinden immobilize antikorlarla etkileşimi ve sonunda ölçüm bölgesinde elektrokimyasal sinyal elde edilmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.4. Geliştirilen elektrokimyasal yatay test şeridinin şekilsel görüntüsü

Elektrokimyasal yatay akış analizi ile kolorimetrik yöntemle dayalı tayin

Kapiler akışın tamamlanması ve analitlerin etiketli nanopartiküller aracılığıyla test hatlarında yakalanmasının ardından, yaklaşık 30 dakikalık bir inkübasyon süresi sonrasında kolorimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kolorimetrik analizde pozitif sonuç hem test çizgisinde hem de kontrol çizgisinde gözlenen renk değişimi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntüler mobil cihaz kamerası aracılığıyla kaydedilmiş ve daha sonra bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Gumustas ve diğerleri, 2018; Srisrattakarn ve diğerleri, 2020). Böylece, var/yok prensibine dayalı nitel değerlendirmelerin yanı sıra, sinyal şiddetine bağlı olarak kalibrasyon eğrisi oluşturularak nicel analiz de yapılabilmektedir. Görüntü analizi aşamasında, ImageJ yazılımı kullanılarak özellikle yeşil kanal üzerinden test şiddeti ölçülmüştür (Parolo ve diğerleri, 2020).

Elektrokimyasal yatay akışlı test şeritleri kullanılarak IgG tayini için geliştirilen yöntemin çalışma prensibi

Yatay akışlı test şeridine numune yüklendikten sonra immünolojik reaksiyonun tamamlanması için belirlenen süre boyunca beklenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra,

wax yazıcı ile desenlenen elektrot ısıtılarak waxın alt katmanlara penetre olması sağlanmış ve böylece test şeridi üzerinde elektrokimyasal hücre yapısı oluşturulmuştur. Bu aşamadan sonra, elektrotun çalışma bölgesine 1 M HCl çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem, test çizgisinde biriken AuNP'lerin asit yardımıyla çözünmesini ve Au(III) iyonlarının serbest kalmasını sağlamıştır. Ölçülen akım tepesi, Au(III)'ün Au(0)'a elektrokimyasal indirgenmesine karşılık gelmekte olup numunedeki IgG konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Böylece elektrokimyasal yatay akış testi, kolorimetrik sinyali oluşturan altın nanopartiküllerden elde edilen elektrokimyasal olarak kantitatif bir sonuç sağlamaktadır (Miglione ve diğerleri, 2025).



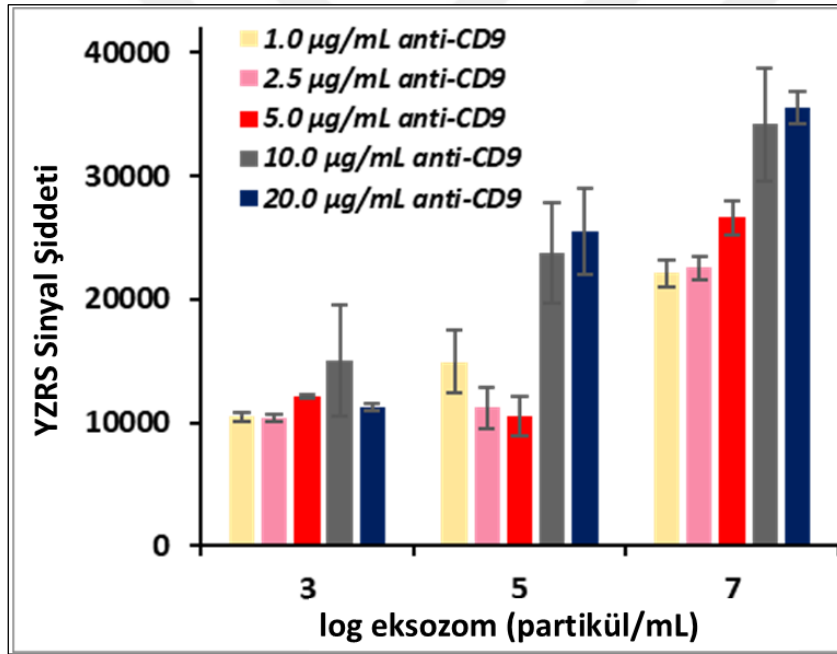


4. BULGULAR

4.1. Kağıt Tabanlı Platform Kullanılarak Eksozom Tayini ve YZRS Uygulamaları

Kullanılan anti-CD9 konsantrasyonunun optimizasyonu

Antikor konsantrasyonunun YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisi, üç farklı eksozom konsantrasyonu için beş farklı anti-CD9 konsantrasyonuyla hazırlanan immünoassay yapılarında YZRS ölçümleri gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Antikor konsantrasyonunu optimize etmek için, elde edilen YZRS sinyal şiddetleri beş farklı anti-CD9 konsantrasyonunda çizilmiş ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Anti-CD9 konsantrasyonu optimizasyonuna dayalı olarak üç farklı eksozom konsantrasyonundaki eksozom örneklerinin YZRS sinyal şiddetleri

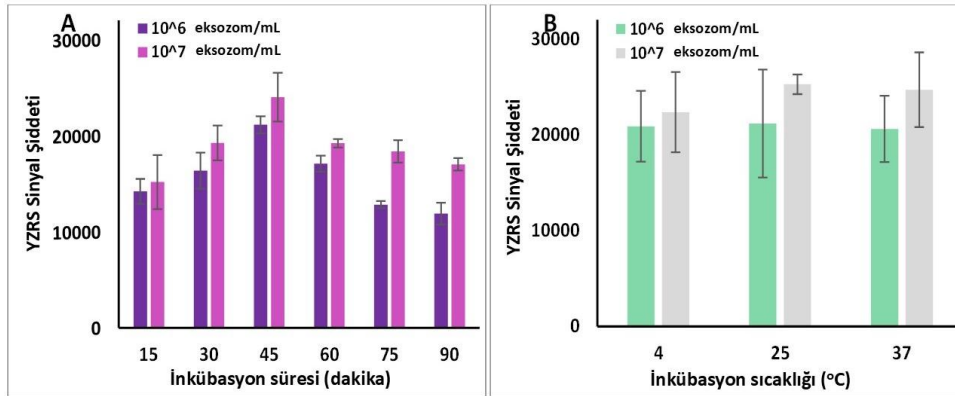
1.0×10^3 partikül/mL eksozom konsantrasyonu için, ortamda sınırlı sayıda eksozom bulunması nedeniyle en düşük antikor konsantrasyonunda bile tüm eksozomlar yakalandığından, farklı anti-CD9 antikor konsantrasyonları arasında YZRS sinyal şiddetlerinde çok az değişiklik gözlenmiştir. Bu durum, antikor seviyesinin artırılmasının bağlanmayı veya sinyal şiddetini daha fazla artırmadığı bir doyum noktasına ulaşıldığını göstermektedir. Daha yüksek eksozom konsantrasyonlarında ise, ortamda daha fazla partikül bulunması, farklı antikor konsantrasyonlarının YZRS sinyal şiddetleri üzerindeki etkisinin

daha etkin şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Şekil 4.1’de gösterildiği üzere, en yüksek YZRS sinyal şiddetleri 10,0 µg/mL ve 20,0 µg/mL anti-CD9 konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Bu iki konsantrasyon arasında anlamlı bir fark gözlenmediği için, antikör tüketimini azaltırken yüksek tespit verimliliğini korumak amacıyla optimum konsantrasyon olarak 10,0 µg/mL seçilmiştir.

İnkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığının optimizasyonu

Bu çalışmada, inkübasyon süresi ve sıcaklığının YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla $1,0 \times 10^6$ ve $1,0 \times 10^7$ partikül/mL olmak üzere iki farklı eksozom konsantrasyonu incelenmiştir. Bu konsantrasyonlar, düşük seviyelerde zayıf sinyaller ve yüksek seviyelerde doyum veya özgül olmayan etkileşimleri önlemek ve gerçek örneklerde tipik olarak gözlenen eksozom konsantrasyonlarıyla uyumluluğu sağlamak için seçilmiştir.

Şekil 4.2.A.’da gösterildiği gibi, eksozomların kâğıt YZRS platformu ile 45 dakika inkübe edilmesi durumunda en yüksek YZRS sinyal şiddeti elde edilmiştir. Şekil 4.2.B’de gösterildiği üzere, üç farklı sıcaklık arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

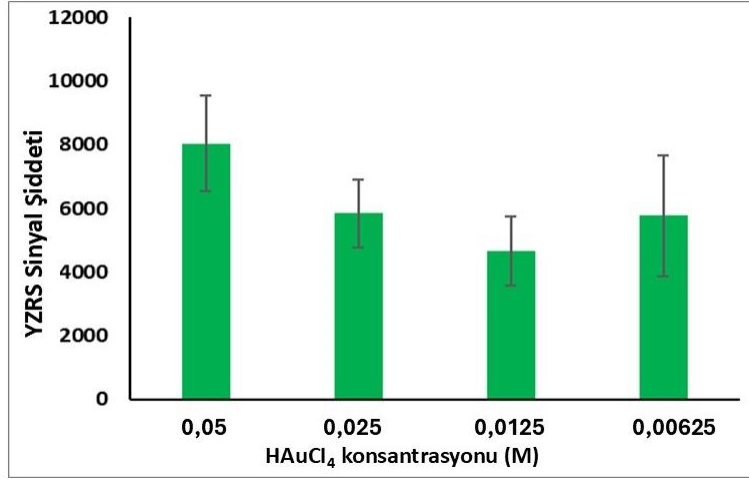


Şekil 4.2. İki farklı eksozom konsantrasyonu için YZRS sinyal şiddeti üzerinde A) altı farklı inkübasyon süresinin ve B) üç farklı inkübasyon sıcaklığının etkisinin incelenmesi

Elektrot kaplama işlemi sırasında kullanılan HAuCl₄ konsantrasyonunun YZRS sinyal şiddeti üzerine etkisi

Bu çalışmada, HAuCl₄ çözeltisi konsantrasyonunu değiştirerek hazırlanan platformun YZRS sinyalleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kağıt platform hazırlandıktan sonra, 70:30%

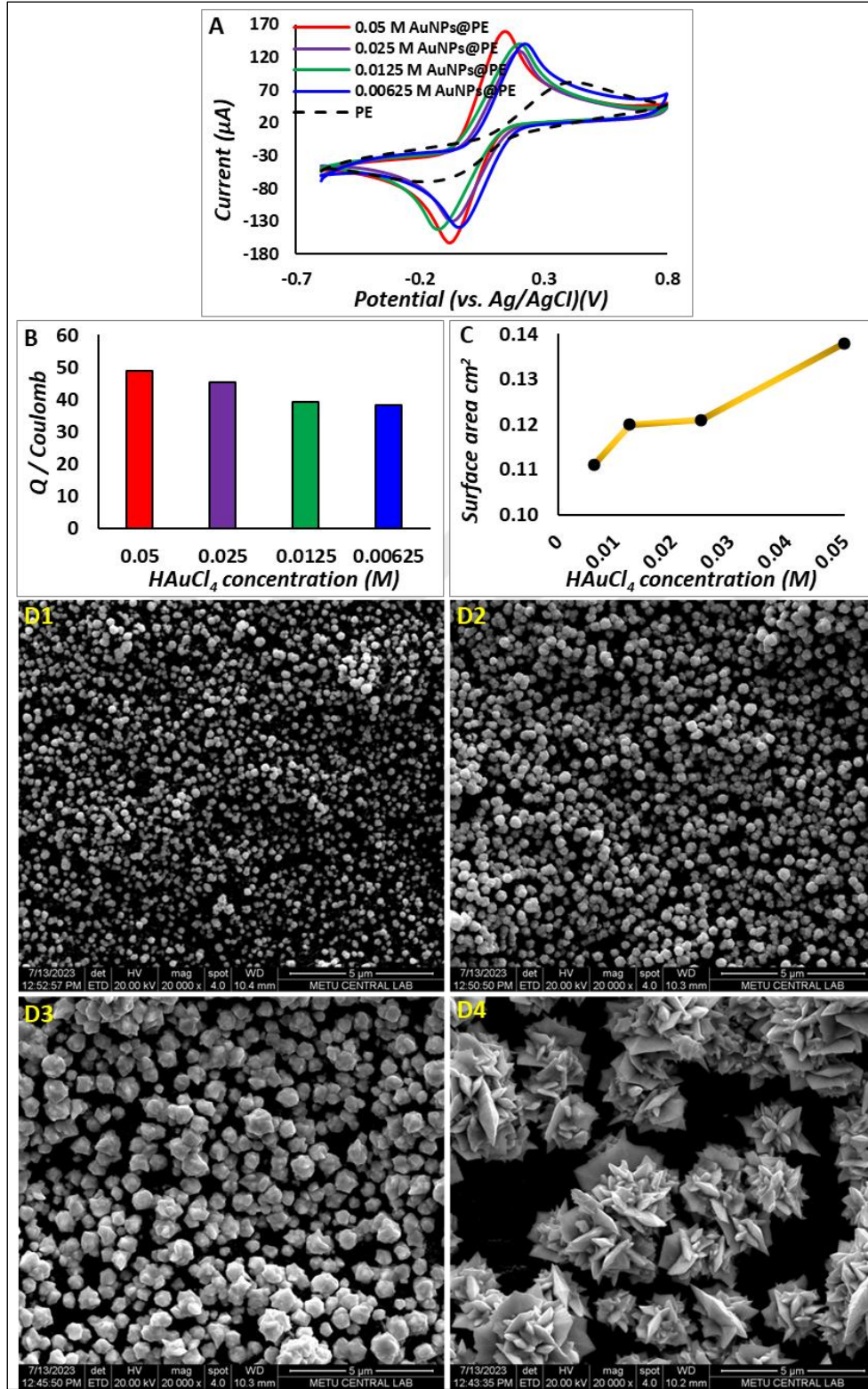
etanol:su çözeltisinde 20,0 mM DTNB ile gece boyunca modifiye edilmiştir. Daha sonra DTNB ile modifiye edilen platformlar ultra saf su ile yıkanmış ve Raman ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Buna göre, en yüksek sinyal şiddeti HAuCl_4 konsantrasyonu 0,05 M olduğunda elde edilmiş ve çalışmanın sonraki deneylerinde kağıt platformlar bu konsantrasyonda HAuCl_4 çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.3. HAuCl_4 çözeltisinin konsantrasyon optimizasyonu sonucunda farklı yüzeylerden elde edilen DTNB'nin YZRS sinyal şiddetleri

Kağıt tabanlı platformun karakterizasyon çalışmaları

Bu çalışmada, kağıt platform üretmek için yaklaşık %20 elemental karbon içerdiğinden nispeten düşük iletkenliğe sahip karbon boya kullanılmıştır. Kağıt platform (KP), elektrokimyasal olarak üretilen altın nanopartiküllerle (AuNP) dekore edilmiştir. Burada, altının SH (sülfhidril grubu) fonksiyonel grubu ile bağlanma potansiyelinden faydalanılmıştır. Hazırlanan AuNP@KP'lerin elektrokimyasal karakterizasyonu, AuNP'lerin KP yüzeylerine indirgenmesinden önce ve sonra, 0,1 M KCl içinde 50,0 μL 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren redoks prob çözeltisi varlığında gerçekleştirilmiştir. Taramalar, -0,6 ile +0,8 V aralığında ve 100 mV/s tarama hızıyla yapılmıştır. Döngüsel voltametri (CV) kullanılarak yapılan elektrokimyasal karakterizasyonun yanı sıra, KP'lerin yüzeylerinin morfolojik özellikleri de SEM analizi ile incelenmiştir.



Şekil 4.4. A) Farklı $HAuCl_4$ konsantrasyonları ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş kağıt platformların döngüsel voltamogramları, B) sistemden geçen yük miktarı, C) Randles-Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanan kağıt platformlarının elektrokimyasal yüzey alanları, D1-D4) Farklı $HAuCl_4$ konsantrasyonları ile modifiye edilmiş kağıt platformların SEM görüntüleri: D1) 0,00625 M, D2) 0,0125 M, D3) 0,0125 M, D4) 0,05 M $HAuCl_4$

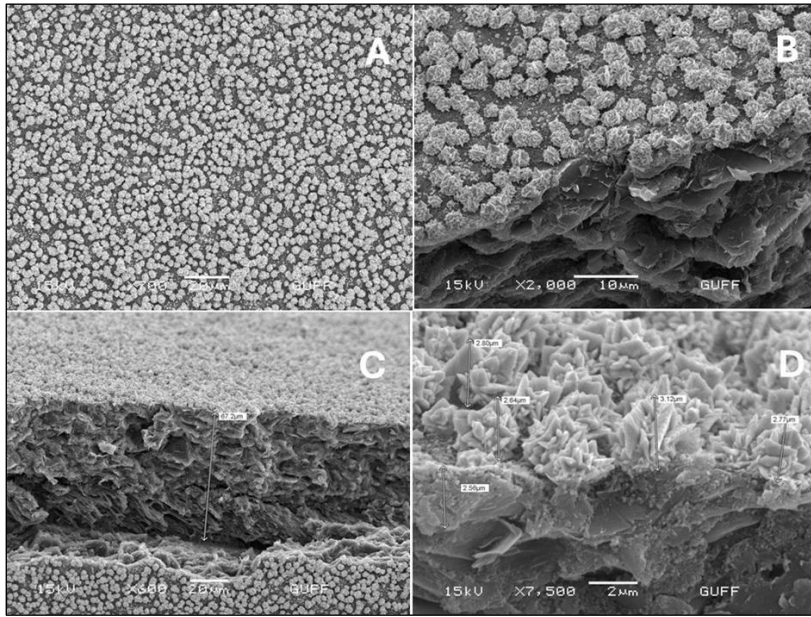
Bu çalışmada, YZRS platformları, çalışma elektrotlarının yüzeyine AuNP'lerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0,1 M KCl ve 0,1 M H₂SO₄ içeren çözelti içerisindeki HAuCl₄ konsantrasyonları 0,05 M, 0,025 M, 0,0125 M ve 0,00625 M olacak şekilde hazırlanmış ve çalışma elektrotlarının yüzeyleri CV yöntemiyle kaplanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki AuNP'ler yüzeylere damlatılmış ve -0,6/+0,2 V tarama aralığında, 100 mV/s tarama hızıyla 3 set halinde 10 döngü boyunca alternatif voltamogramlar alınarak AuNP kaplaması gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.4.A, farklı HAuCl₄ konsantrasyonları kullanılarak AuNP ile modifiye edilmiş kağıt platformlarından alınan voltamogram sonuçlarını göstermektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, modifikasyon sonrası kağıt platformları yüzeyindeki redoks probunun anot ve katot akımlarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu sonuç, elektron transferi ve yüzey alanındaki artışın bir kanıtıdır. Her platform için CV'ler sonucunda hesaplanan yük miktarı Şekil 4.4.B'de sunulmuştur. Sistemden geçen en yüksek yük, 0,05 M HAuCl₄ çözeltisi ile elektrokimyasal indirgeme gerçekleştiğinde elde edilmiştir. Randles-Sevcik denklemi (denklem 4.1) kullanılarak her platform altın konsantrasyonu için difüzyon katsayısı hesaplanmıştır. Denklemde I_p , A cinsinden tepe akımı (I_a veya I_c); n , taşınan elektron sayısı; A , cm² cinsinden yüzey alanı; D , cm²/s cinsinden difüzyon katsayısı; C , mol/cm³ cinsinden elektrokimyasal olarak aktif türlerin konsantrasyonu; v , V/s cinsinden tarama hızıdır.

$$I_p = 2.687 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times C \times v^{1/2} \quad (4.1)$$

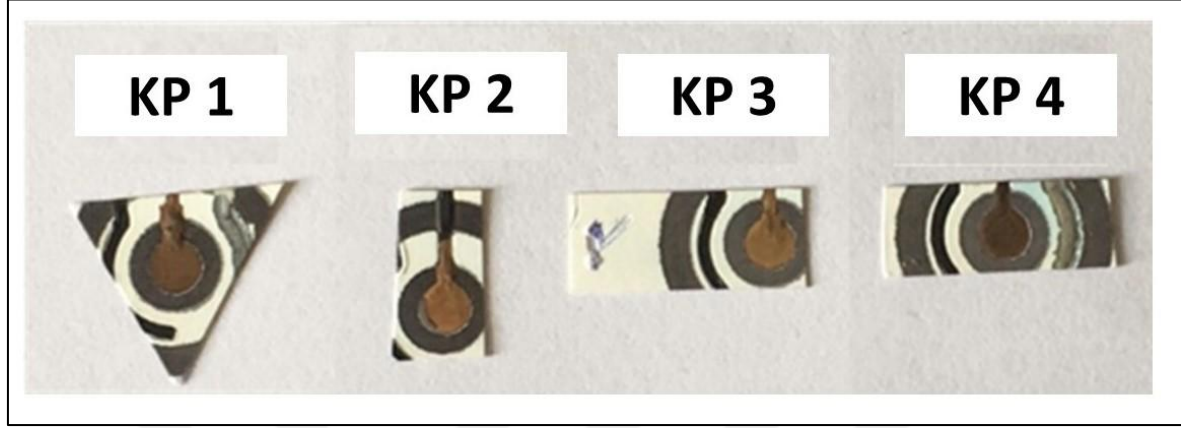
Farklı HAuCl₄ konsantrasyonları ile modifiye edilmiş her platformun yüzey alanı Şekil 4.4.C'de sunulmuştur. Elde edilen grafiğe göre, en yüksek yüzey alanı 0,05 M HAuCl₄ kullanılarak elde edilmiştir. Şekil 4.4.B ve 4.4.C birbirini desteklemektedir. Elde edilen verilere göre, modifiye edilmemiş ksğıt platform ve 0,05 M HAuCl₄ kullanılarak modifiye edilmiş AuNP@KP'lerin yüzey alanları sırasıyla 0,0625 cm² ve 0,138 cm² olarak belirlenmiştir. 0,05 M HAuCl₄ kullanımı, kağıt platformunun elektrokimyasal olarak aktif yüzey alanını %120 artırarak AuNP@KP'nin hassasiyetini yükseltmiştir. Ayrıca, sonuçlar elektron transferinde bir artış olduğunu göstermektedir. Tüm elde edilen verilere dayanarak, en uygun HAuCl₄ konsantrasyonu 0,05 M olarak belirlenmiştir.

Her KP yüzeyinin morfolojik görüntüleri SEM analizi ile kaydedilmiş ve Şekil 4.4.D’de sunulmuştur. SEM görüntülerinde görüldüğü gibi, HAuCl_4 konsantrasyonu arttıkça yüzeydeki AuNP sayısı azalmakta, ancak AuNP’lerin boyutu artmaktadır. Diğer KP yüzeylerinde pürüzlü altın nanopartiküller oluşurken, Şekil 4.4.D4’de optimal koşullar altında bazı düzensiz boşluklarla altın nanostarlardan oluştuğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.4.D1’de görüldüğü gibi SEM görüntüsü yüksek ölçekle incelendiğinde, AuNP’ler arasındaki boşlukların sensör performansını önemli ölçüde etkileyecek kadar büyük olmadığı açıktır. Ayrıca, önceki çalışmalardan bilindiği üzere, nanostarların keskin uçları ve dalları, nanokürelerin daha düzgün yüzeylerine göre lokal elektromanyetik “hot spot”ları daha etkili şekilde oluşturur (Tian ve diğerleri, 2014). Bu etki, keskin uçların çevresindeki elektrik alanları artırdığı “lightning rod” prensibinden kaynaklanmaktadır (Meng ve diğerleri, 2020). Ayrıca, nanostarların, yüzey plazmon rezonansını (SPR) artıran anizotropik morfolojileri sayesinde üstün YZRS özellikleri gösterdiği de kanıtlanmıştır (Kolosovas-Machuca ve diğerleri, 2019). Şekil 4.3’de gösterildiği gibi, optimum koşullar altında hazırlanan yüzeyden elde edilen DTNB’nin YZRS sinyal şiddetleri diğer yüzeylerden daha yüksektir. Bu sonuç göz önünde bulundurulduğunda, altın nanostarların yüksek YZRS etkisinin, nanopartiküller arasındaki düzensiz boşluklardan kaynaklanan analiz performans kaybını telafi ettiği düşünülmektedir.



Şekil 4.5. A) Optimal koşullar altında oluşan AuNP filmine ait yüksek çözünürlüklü SEM görüntüsü, B) Karbon ve altın nanostarların SEM kesit görüntüsü, C) Karbon tabakasının kalınlığını gösteren SEM görüntüsü, D) Karbon tabakası üzerindeki altın nanostarların kalınlığını gösteren SEM görüntüsü

Şekil 4.5.C’de görüldüğü gibi, karbon ÇE’nun kalınlığı 67,3 μm olarak hesaplanmıştır. Karbon ÇE üzerindeki AuNP tabakasının ortalama kalınlığı, Şekil 4.5.D.’deki SEM görüntüsü kullanılarak $2,8 \pm 0,2$ μm olarak hesaplanmıştır.

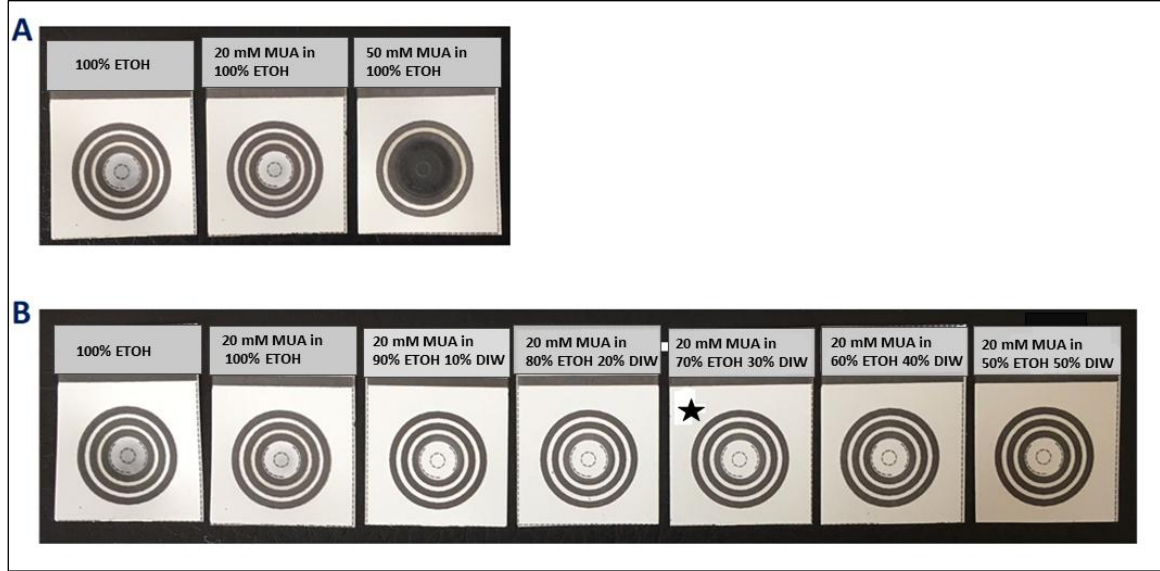


Şekil 4.6. Farklı HAuCl_4 konsantrasyonlarında elektrokimyasal AuNP biriktirilmesi sonrası KP’nin fotoğrafları; KP1) 0,05 M, KP2) 0,025 M, KP3) 0,0125 M ve KP4) 0,00625 M HAuCl_4

Kağıt platformunda 11-MUA modifikasyonunda kullanılan etanol oranının etkisinin incelenmesi

Alkol varlığında yapılan 11-MUA modifikasyonunda en yüksek verimin elde edildiği bilinmektedir. Ancak, etanol çözeltisinin kağıt platform üretiminde kullanılan NC membranı çözmesi nedeniyle, modifikasyon çalışmalarında etanol oranının optimizasyonu önemlidir. Bu nedenle, 11-MUA farklı etanol-su oranlarına sahip çözücü hazırlanarak kağıt platformun çalışma alanına damlatılmış ve NC membranının çözünürlüğüne etkisi incelenmiştir. İlk olarak, 11-MUA çözeltisinin konsantrasyonu 20,0 ve 50,0 mM olmak üzere iki farklı çözeltinin kullanılmasıyla optimize edilmiştir. Şekil 4.7.A. ve 4.7.B., 11-MUA konsantrasyonu 50,0 mM olduğunda NC membran yüzeyinin ciddi şekilde deforme olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, farklı etanol oranlarının etkisi 20,0 mM 11-MUA kullanılarak araştırılmıştır. Burada, 11-MUA’nın tam çözünürlüğünü sağlamak için uygun çözücü sisteminin seçilmesi önemlidir. Bu amaçla, %100 etanol ve ayrıca 90-10%, 80-20%, 70-30%, 60-40% ve 50-50% etanol-su karışımları test edilmiştir. Daha düşük etanol oranları kullanıldığında 11-MUA’nın çözünürlüğü azaldığı için bu oranlar tercih edilmemiştir. Yüksek etanol oranlarında ise çözelti damlatılır damlatılmaz NC membranın çözündüğü gözlenmiştir. Bağlanma verimliliğini düşürmemek için en yüksek etanol oranının tercih

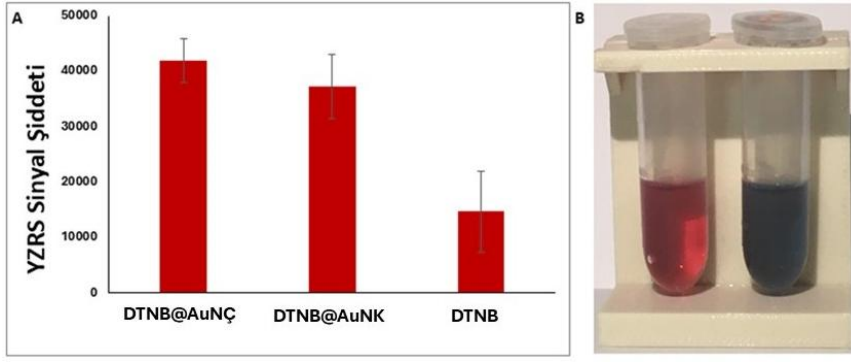
edilmesi gerektiğinden, 11-MUA çözücüsü olarak %70 etanol – %30 su karışımı seçilmiş ve sonraki deneylerde yüzey modifikasyonu bu oran kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7. A) 11-MUA modifikasyonunda farklı konsantrasyonların, B) değişen alkol içeriğinin NC membranın çözünmesine etkisini gösteren fotoğraflar

Parçacık türünün YZRS sinyalleri üzerindeki etkisi

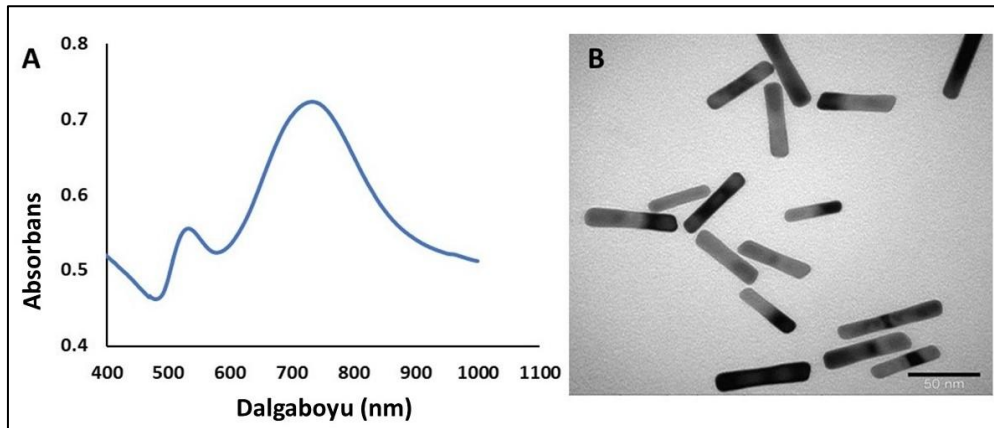
Bu tez çalışmasında, küresel altın nanopartiküllere (AuNK) kıyasla anizotropik etkisi nedeniyle altın nanoçubuklar (AuNÇ) kullanılmıştır. Raman etiketi olan DTNB ve altın nanoçubuklar ile birlikte YZRS çalışmaları için kullanımı daha önce rapor edilmiştir (Temur ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde, AuNÇ ve AuNK karşılaştırması literatürde yapılmıştır (Temur ve diğerleri, 2010). Bu amaçla, Turkevici yöntemi olarak bilinen altın nanoküre sentezi gerçekleştirilmiş ve YZRS sinyalleri üzerindeki etkisi incelenmiştir (Oliveira ve diğerleri, 2023). Daha sonra AuNÇ ve AuNK'ler DTNB ile modifiye edilmiştir. Buna göre, AuNÇ ile çalışıldığında YZRS sinyallerinde yaklaşık %11 artış gözlenmiştir (Şekil 4.8.A). Aynı zamanda, DTNB modifikasyonu için kullanılan etanol çözeltisi nedeniyle AuNK partikül çözeltisinde agregasyon gözlenmiştir (Şekil 4.8.B). AuNÇ'lar, boyutları ve en-boy oranları değiştirilerek plazmon rezonans frekanslarının ayarlanmasına imkan sağlar. Bu imkan, plazmon rezonansını uyarıcı lazer dalga boyuna uyarlayarak YZRS artışını maksimize etmeye olanak tanır. Bu nedenle, AuNÇ sentezinde kullanılan Au çözeltisinin hacmi optimize edilerek AuNP'lerin en-boy oranı ayarlanmış ve sonraki deneyler için optimum değer seçilmiştir.



Şekil 4.8. A) AuNÇ ve AuNK kullanılarak elde edilen DTNB'nin YZRS sinyal şiddetleri, B) DTNB modifikasyonu öncesi (sol) ve sonrası (sağ) AuNK görüntüleri

Altın nanoçubukların (AuNÇ) karakterizasyon çalışmaları

Bu çalışmada, $56,0 \pm 8,4$ nm uzunluğunda $9,6 \pm 1,4$ eninde AuNÇ kullanılarak YZRS ölçümü gerçekleştirilmiştir. (Boyutlar 10 nanopartikül görüntüsü üzerinden hesaplanmıştır.) AuNÇ'ların TEM görüntüsüne göre en-boy oranı 5,7 olarak hesaplanmıştır. En yüksek YZRS şiddeti 56 nm uzunluğundaki AuNÇ kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.9.B). Nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV-vis absorpsiyon spektrofotometresi kullanılmıştır. Şekil 4.9.A, çubuk şeklindeki nanopartiküllerin oluşumunu gösteren yaklaşık 519 ve 659 nm'de iki pik göstermektedir.



Şekil 4.9. A) UV-Vis spektrumu ve B) Çubuk şeklindeki altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü

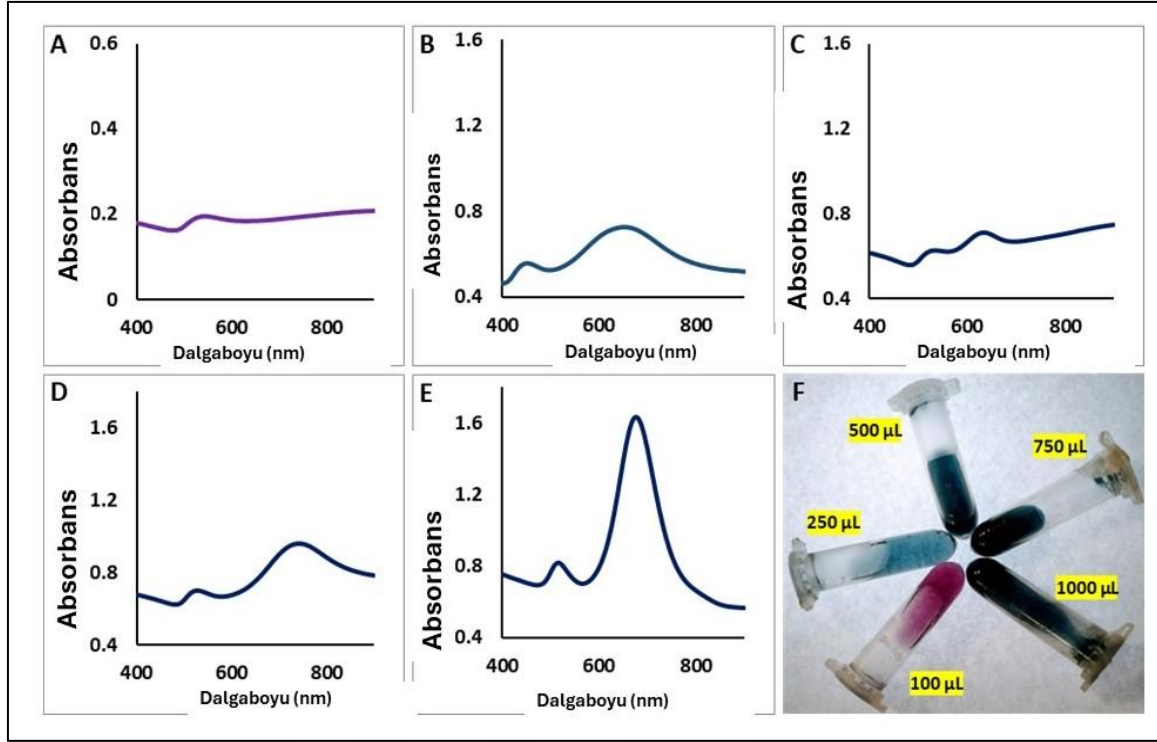
AuNÇ sentezinde kullanılan HAuCl₄ çözeltisi hacminin optimizasyonu

AuNÇ'ların en-boy oranı (uzunluk-genişlik oranı), YZRS analizini önemli ölçüde etkiler. Bu oran, AuNP'lerin plazmonik özelliklerini, AuNÇ üzerindeki elektromanyetik alan dağılımını ve dolayısıyla YZRS sinyallerini belirler. Bu bağlamda, büyüme çözeltilerine farklı miktarlarda HAuCl₄ eklenerek parçacık boyutu ve şekli optimize edilmiştir. AuNÇ'ların en-boy oranı, büyüme ortamındaki HAuCl₄ çözeltisinin hacmi değiştirilerek ayarlanmıştır.

Bu çalışmada, 250 µL, 500 µL, 750 µL ve 1000 µL HAuCl₄ eklenerek farklı en-boy oranlarına sahip AuNÇ'lar sentezlenmiştir. 0,01 M HAuCl₄ çözeltisinin beş farklı miktarı (100,0 µL; 250,0 µL; 500,0 µL; 750,0 µL; 1000,0 µL) 4,75 mL 0,1 M CTAB çözeltisine eklenmiştir. Ardından, sırasıyla 60,0 µL 0,01 M AgNO₃ ve 100,0 µL 0,1 M AA çözeltileri eklenmiştir. Son olarak, 10,0 µL tohum çözeltisi büyüme çözeltilerine eklenmiş ve AuNÇ oluşumunu kolaylaştırmak için 30°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Sentezlenen mavi renkli AuNÇ'lar 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve üç kez deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra 1,0 mL deiyonize suya alınarak karakterizasyon amacıyla UV spektrumları alınmıştır (Şekil 4.10).

Elde edilen UV absorbands spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.10.A), 100 µL HAuCl₄ ile sentezlenen AuNÇ için yaklaşık 550 nm'de tek bir pik gözlenmiş ve çözeltinin rengi mor olmuştur. 250,0 µL 0,01 M HAuCl₄ ile sentezlenen AuNÇ'ların UV spektrumunda (Şekil 4.10.B) yaklaşık 460 ve 660 nm'de iki pik görülmüş ve çözeltinin rengi mavi olmuştur. 500,0 µL, 750,0 µL ve 1000,0 µL 0,01 M HAuCl₄ ile sentezlenen AuNÇ'ların UV spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.10.C., 4.10.D., 4.10.E.), maksimum absorbansa sahip dalga boylarının kaydığı gözlenmiştir. 500,0 µL, 750,0 µL ve 1000,0 µL HAuCl₄ içeren AuNP çözeltilerinin renkleri sırasıyla maviden koyu maviye değişmiştir.

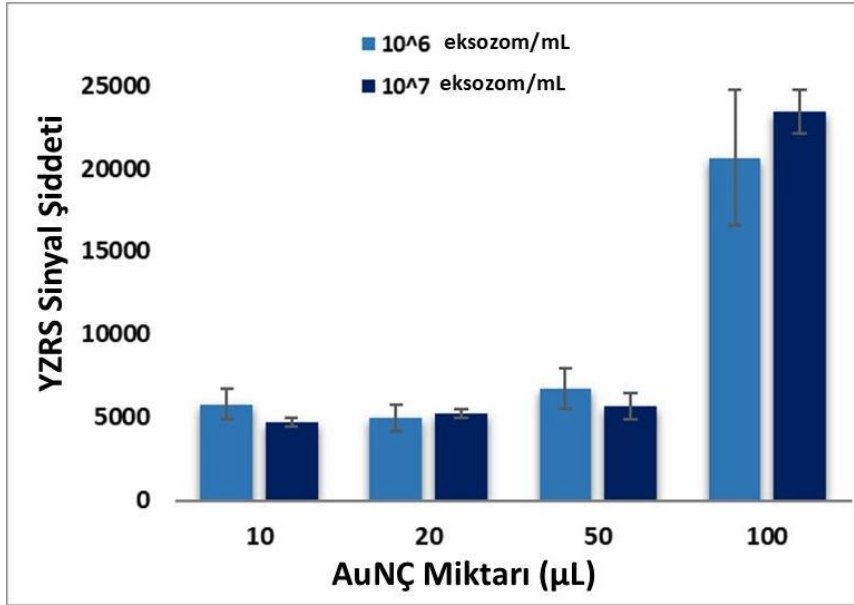
En yüksek YZRS şiddeti 250,0 µL HAuCl₄ kullanıldığında elde edilmiştir. HAuCl₄ çözeltisi miktarı arttıkça, belirgin agregasyon gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Altın nanoçubuk sentezinde kullanılan 0,01 M altın çözeltisi miktarları sırasıyla 100,0 µL (A), 250,0 µL (B), 500,0 µL (C), 750,0 µL (D), 1000,0 µL (E) olarak incelenmiş ve çözeltilerin fotoğrafı (F) gösterilmiştir

AuNÇ miktarının YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisi

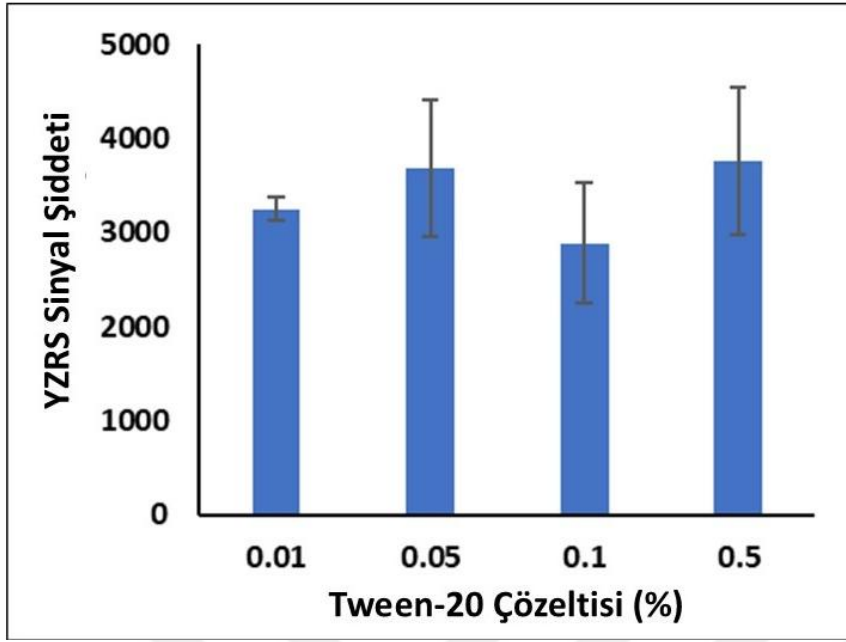
Sinyal şiddetini ve dolayısıyla duyarlılığı artırmak amacıyla AuNÇ miktarının optimizasyonu yapılmıştır. Partiküller sentezlendikten sonra, 100,0 µL partikül 1000,0 µL DI su içinde süspanse edilmiş ve bu çözeltiden 10,0, 20,0, 50,0 ve 100,0 µL'lik çözeltiler alınarak santrifüjlenmiştir. Homojen bir dağılım sağlamak için partiküllere eşit miktarda etanol çözeltisi eklenmiş ve ardından DTNB modifikasyonu yapılmıştır. Daha önce açıklanan prosedüre göre, $1,0 \times 10^6$ ve $1,0 \times 10^7$ eksozom partikül/mL olmak üzere iki farklı eksozom konsantrasyonu için immünoassay çalışması gerçekleştirilmiş ve YZRS sinyalleri kaydedilmiştir (Şekil 4.11). Buna göre, en yüksek sinyal şiddeti 100,0 µL AuNÇ kullanıldığında elde edilmiştir. Aşırı miktarların sinyali baskılama eğiliminde olması nedeniyle daha büyük miktarlar kullanılmamış ve çalışmanın sonraki aşamaları için 100,0 µL AuNÇ çözeltisi seçilmiştir.



Şekil 4.11. Değişen AuNÇ miktarlarına karşı elde edilen DTNB'nin YZRS sinyal şiddetleri

AuNÇ modifikasyonunda çözücü optimizasyonu

AuNÇ üzerinde DTNB modifikasyonu sırasında kullanılan alkol, partiküllerin agregasyonuna neden olduğundan çözücü sistemi optimize edilmiştir. Çözelti içinde partiküllerin homojen dağılımını sağlamak ve kullanılan eppendorf yüzeyine yapışmalarını önlemek amacıyla Tween-20 kullanılmıştır. Bu amaçla, 25,0 mM DTNB çözeltileri; farklı oranlarda (0.01%, 0.05%, 0.1% ve 0.5%) Tween-20 içeren 200,0 µL etanol çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak AuNÇ'ların yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. DTNB ile modifiye edilmiş AuNÇ'lar 200,0 µL deiyonize su içine alınmış ve YZRS sinyallerinin elde edilmesi için ince tabaka kromatografisi yüzeylerine damlatılmıştır.

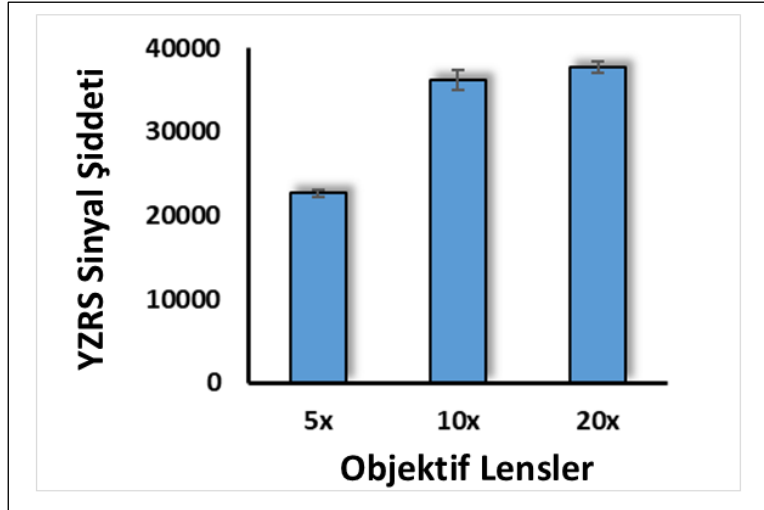


Şekil 4.12. Farklı oranlardaki (0.01%, 0.05%, 0.1% ve 0.5%) Tween-20 çözeltilerinin DTNB'nin Raman sinyal şiddeti üzerindeki etkisi

Şekil 4.12'de gösterilen sonuçlara göre, Tween-20 çözeltisinin yüzdesi değiştirildiğinde Raman sinyal şiddetlerinde belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Ayrıca, kullanılan her çözeltide çubuk formundaki partiküllerin mavi renklerini koruduğu ve agregasyon oluşmadığı görülmüştür. Bunun yanı sıra, modifikasyon ve yıkama işlemleri sırasında partiküllerin mikro tüp yüzeyine bağlanmadığı da belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, modifikasyon verimliliğini düşürmemek amacıyla %0.01 Tween-20 içeren çözelti kullanılmasına karar verilmiştir.

Raman objektif lens seçimi için optimizasyon çalışması

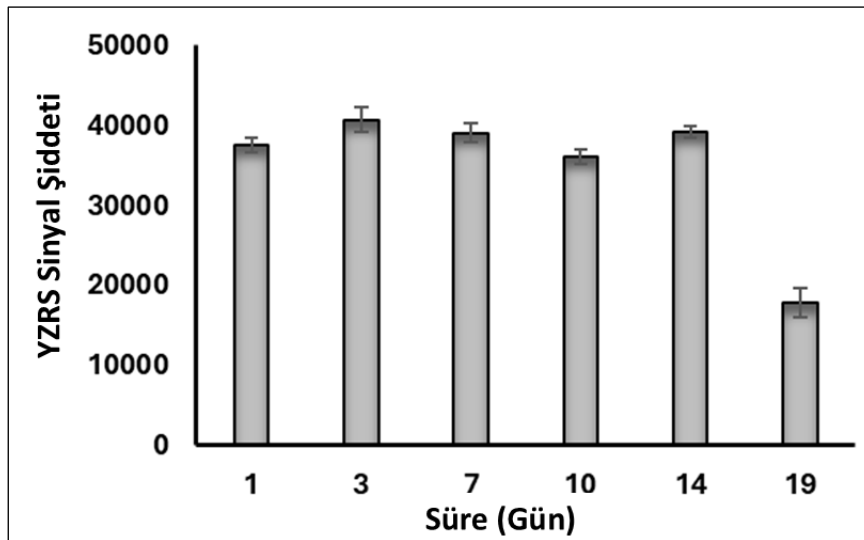
Deneylerde kullanılan Raman spektroskopisi cihazında 5X, 10X ve 20X, büyötmeye sahip objektif lensler bulunmaktadır. Bu lensler arasında 20X objektif, daha düşük büyötmeli lenslere kıyasla daha yüksek sinyal şiddeti sağlamaktadır. Bu objektifler kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Farklı objektif lensler kullanılarak kâğıt YZRS platform üzerinde 1.0×10^6 eksozom partikül/mL konsantrasyonundaki eksozom örneğinin YZRS sinyalleri

anti-CD9@DTNB@AuNC'ın stabilitesi

anti-CD9@DTNB@AuNC yapısının stabilitesi 19 gün boyunca incelenmiştir. Farklı günlerde yüzeyde yakalanan eksozomlarla etkileşim sonucu elde edilen stabilite verileri Şekil 4.14'de sunulmuştur. Sonuçlara göre, etiketin YZRS sinyalleri 14 gün boyunca tutarlı kalmış, ancak 19. günde sinyal şiddetinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Stabilite çalışması boyunca hazırlanan etiket + 4° C'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 4.14. Anti-CD9@DTNB@AuNC'ın stabilitesini değerlendirmek için elde edilen YZRS şiddeti

YZRS güçlendirme faktörünün (Enhancement Factor, EF) hesaplanması

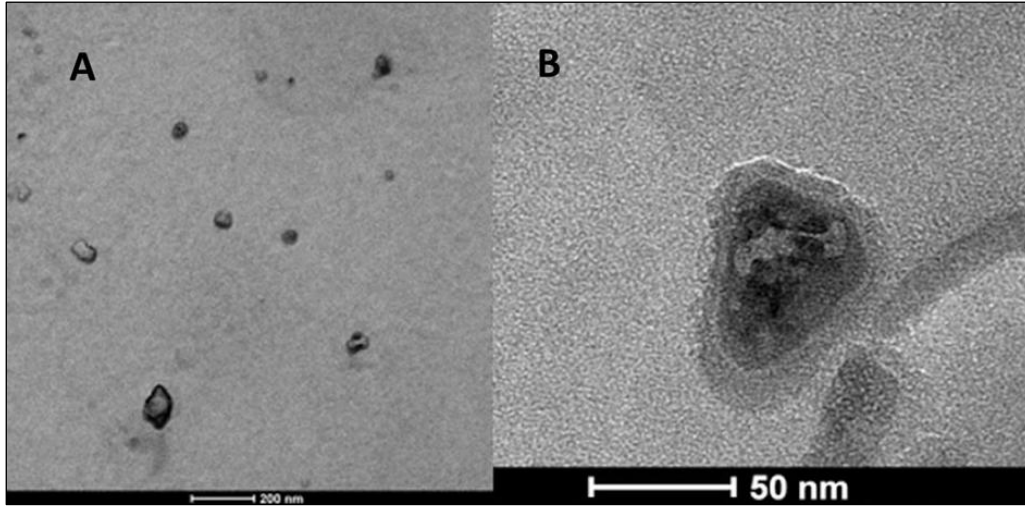
YZRS sinyal şiddetinin güçlendirme faktörünü hesaplamak için DTNB moleküllerinin 1330 cm^{-1} 'deki Raman sinyali izlenmiştir. 20.0 mM DTNB'nin Raman sinyal şiddeti 10060, DTNB@AuNC'ın ise 50722 olarak ölçülmüştür. YZRS güçlendirme faktörü, Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır (Phan-Quang ve diğerleri, 2015; Tezcan ve Hsu, 2020). Buna göre EF, 1.0×10^5 olarak bulunmuştur.

$$EF = (I_{YZRS} / I_{Raman}) \times (N_{Raman} / N_{YZRS}) \quad (4.2)$$

- I_{YZRS} : YZRS yüzeyinde gözlenen Raman sinyal şiddeti
- I_{Raman} : Referans olarak kullanılan, çözelti hâlindeki Raman sinyal şiddeti
- N_{Raman} : Çözelti hâlinde Raman sinyaline katkıda bulunan molekül sayısı
- N_{YZRS} : YZRS yüzeyine katkıda bulunan molekül sayısı
- $N = C \times V \times N_A$
- C: Molekül konsantrasyonu (mol/L)
- V: Raman sinyaline katkıda bulunan prob hacmi (L)
- N_A : Avogadro sayısı (6.022×10^{23})

Eksozom standartları için CTEM (Yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu) analizi

CTEM görüntüleme için ticari olarak temin edilen eksozom standartları kullanılmıştır. %1 (v/v) glutaraldehit çözeltisi hazırlanarak eksozom örneğine eklenmiş ve örnek 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra, eksozom süspansiyonundan 5,0 μL alınarak TEM grid yüzeyine damlatılmış, beş dakika bekletildikten sonra grid üzerindeki fazla çözelti uzaklaştırılmıştır. Ardından, grid yüzeyi %1 (w/v) uranil asetat damlası ile boyanmıştır. Bir dakikalık inkübasyonun ardından grid saf su ile yıkanmış ve son olarak oda sıcaklığında bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır.



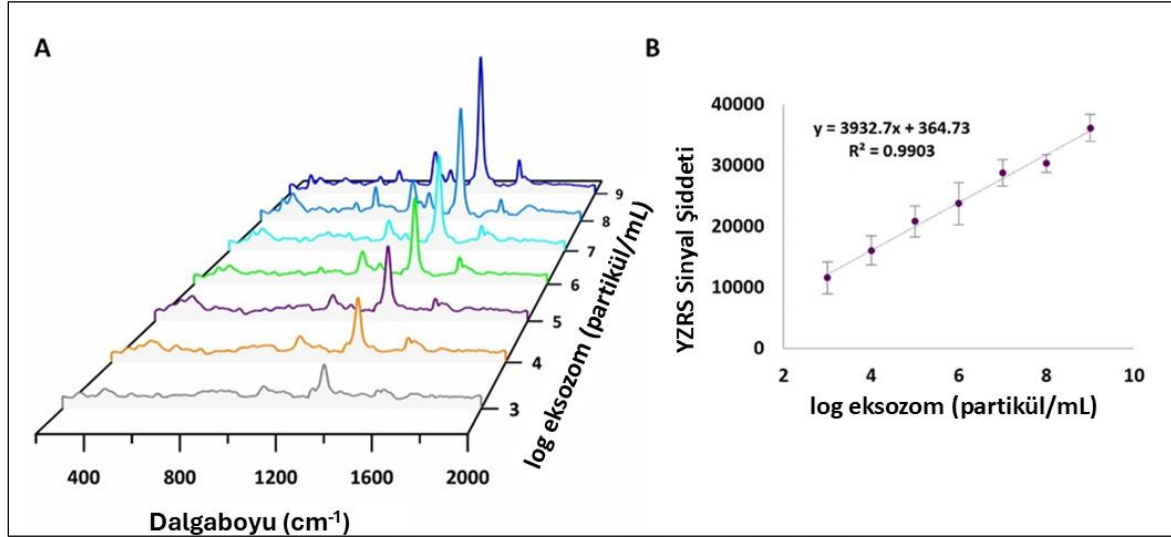
Şekil 4.15. Eksozom standartlarının CTEM görüntüleri

Literatür incelemesine göre eksozomlar, tipik olarak 40–150 nm arasında değişen boyutlarda, genellikle yuvarlak veya oval şekilli veziküller ya da partiküller olarak bilinmektedir. Elde edilen CTEM görüntüsü, eksozomun morfolojik görünümünü doğrulamaktadır. CTEM görüntülerine göre bu çalışmada kullanılan eksozomların ortalama boyutları yaklaşık 58 ± 12 nm'dir (Şekil 4.15).

Geliştirilen biyosensörün analitik performansı

Geliştirilen biyosensörün eksozom tespitine yönelik analitik performansını değerlendirmek için, doğrusal aralık, duyarlılık ve teşhis limiti gibi yöntem parametreleri optimum koşullar altında incelenmiştir. Bu amaçla, 100,0 µg liyofilize eksozom standardı 100,0 µL steril saf suda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra, bu stok çözelti PBS tamponu ile seyreltilerek $1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^9$ eksozom partikül/mL konsantrasyon aralığında eksozom standartları hazırlanmıştır. Biyosensörler üzerindeki DTNB moleküllerinin YZRS sinyalleri, 785 nm lazer ışını ve 20X objektif lens kullanılarak 200–2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir. Objektif lens için yapılan optimizasyon sonucuna göre ölçümler, 60 mW lazer gücü ile 30 saniye veri toplama süresince gerçekleştirilmiştir. Kâğıt YZRS platformu üzerinde yakalanan eksozom miktarı arttıkça, DTNB'nin 1330 cm^{-1} 'deki pik şiddetinde de artış gözlenmiştir (Şekil 4.16.A). Kör ölçümün çıkarılmasının ardından DTNB pik şiddetlerindeki değişimin logaritmik olarak değişen eksozom konsantrasyonları ($1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^9$ partikül/mL) ile korelasyonu kullanılarak bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Şekil 4.16.B'de gösterildiği üzere, $1,0 \times 10^3$ ile $1,0 \times 10^9$ partikül/mL arasındaki YZRS yanıtı,

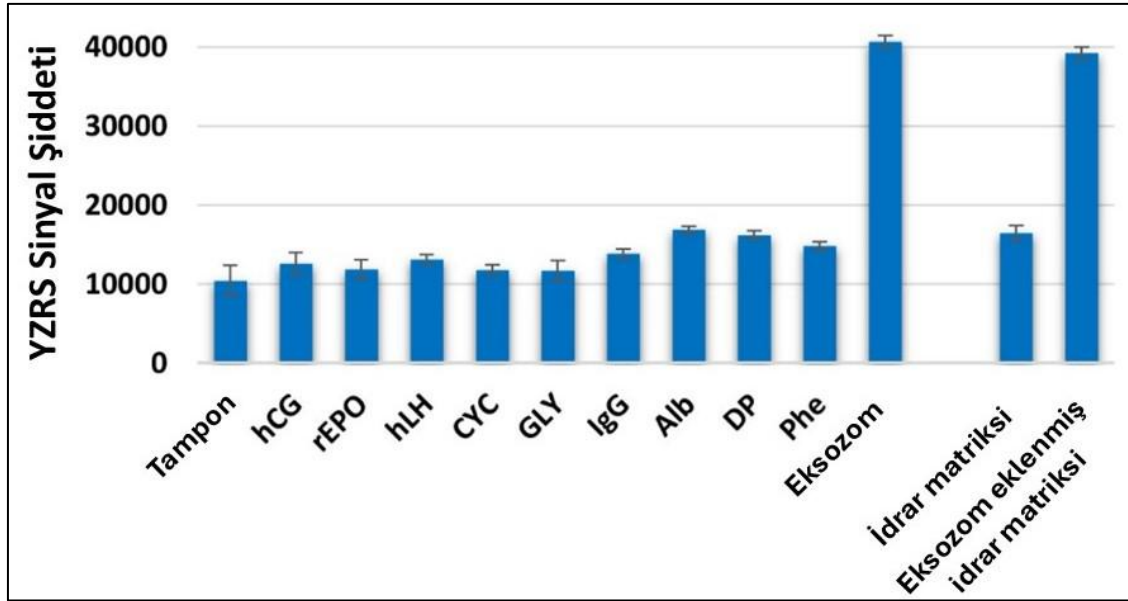
0,9903 korelasyon katsayısı (R^2) ile doğrusal bulunmuştur. Teşhis limiti ise; $9,9 \times 10^1$ eksozom partikül/mL olarak hesaplanmıştır. Teşhis limiti ($3 \times SS$) / m formülü ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. A) Farklı konsantrasyonlardaki eksozomların kantitatif değerlendirilmesi için DTNB'nin YZRS spektrumları, B) 1330 cm^{-1} 'de DTNB'nin YZRS sinyal şiddetlerindeki değişimlere dayanarak elde edilen ve $1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^9$ partikül/mL aralığındaki eksozom konsantrasyonlarını gösteren kalibrasyon grafiği

Geliştirilen biyosensörün seçicilik çalışması

Geliştirilen biyosensörün seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, analitle potansiyel olarak etkileşime girip girişime neden olabilecek matriks bileşenleri kullanılarak bir immünoassay incelemesi gerçekleştirilmiştir. Bu deney için PBS içerisinde 10.000 U/mL insan koryonik gonadotropin (hCG), 10.000 mIU/mL rekombinant eritropoietin (rEPO), 250 U/L İnsan luteinleştirici hormon (hLH), 1.0 mM sistein, 50.0 mM glikoz, 1.0 mg/mL IgG, 1.0 mM albümin, 10.0 mM dopamin, 1.2 mM fenilalanin ve 1.0×10^6 partikül/mL eksozom standart çözeltileri hazırlanmıştır. Ek olarak, 1.0×10^6 partikül/mL eksozom standardının idrar matriksine eklenmesiyle girişim etkisi daha ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Her bir tür için, “Eksozom tayini için tek damla immünoassay protokolü” bölümünde açıklanan immünoassay prosedürü uygulanmıştır. Sonrasında, her örnek için DTNB moleküllerinden elde edilen YZRS sinyalleri kaydedilmiştir. Şekil 4.17.'de gösterildiği gibi, eksozom varlığında DTNB YZRS sinyal şiddetleri diğer türlerin varlığında gözlenen sinyal şiddetlerinden belirgin bir şekilde farklıdır.



Şekil 4.17. PBS içinde hCG, rEPO, hLH, sistein, glikoz, IgG, albümin, dopamin, fenilalanin ve eksozomların YZRS şiddetleri; ayrıca idrar matriksi ve idrar matriksine eklenen 1.0×10^6 partikül/mL standart eksozomların anti-CD9/AuNP@PS biyosensörü ile ölçülen YZRS şiddetleri

Biyosensörün seçiciliği, Raman etiketi olarak görev yapan DTNB moleküllerinin, eksozomların varlığında ve yokluğunda ölçülen YZRS sinyal şiddetleri değerlendirilerek belirlenmiştir. Eksozomların bulunmadığı durumda, sandviç tipi immünokompleks oluşmadığı için YZRS sinyali ihmal edilebilir düzeyde olup, kör sinyaline benzer bulunmuştur. Eksozomların $1,0 \times 10^6$ partikül/mL derişimde bulunduğu durumda ise sandviç tipi immünokompleks yapılarının oluşması nedeniyle DTNB'nin YZRS sinyali kaydedilmiştir. DTNB'den elde edilen YZRS sinyalleri dikkate alındığında, geliştirilen biyosensörün eksozom tayini için uygulanabilir olduğu görülmektedir.

Kâğıt platformunun tekrarlanabilirliğinin incelenmesi

Gün içi kesinliğin belirlenmesi amacıyla YZRS ölçümleri aynı gün içinde altı farklı yüzeyde, günler arası kesinliğin belirlenmesi amacıyla ise üç farklı günde üç farklı yüzeyde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Geliştirilen yöntem, gün içi ve günler arası sinyallerin % BSS değerlerinin $\leq \%15$ 'in altında olması nedeniyle doğru ve güvenilir bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Eksozom tayini için kâğıt YZRS platformunun gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları

Eksozom (partikül/mL)	Günüci (n=6)		Günler arası (n=3)	
	Eksozom (partikül/mL)	%BSS	Eksozom (partikül/mL)	%BSS
1.0×10^5	$1.2 \pm 0.1 \times 10^5$	10.2	$1.1 \pm 0.1 \times 10^5$	9.6
1.0×10^6	$1.0 \pm 0.1 \times 10^6$	5.4	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6$	4.9
1.0×10^7	$1.0 \pm 0.1 \times 10^7$	10.4	$0.9 \pm 0.1 \times 10^7$	7.4

% BSS : bağıl standart sapma

Kâğıt platformun ticari ekran baskılı elektrot (SPE) ile karşılaştırılması

Geliştirilen yöntemin doğruluğu, kâğıt YZRS platformu ile elde edilen sonuçlar ile ticari SPE'ler kullanılarak oluşturulan YZRS sinyal şiddetleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, deneysel prosedür her iki YZRS platform için 1.0×10^6 , 1.0×10^7 ve 1.0×10^8 partikül/mL eksozom derişimlerinde uygulanmıştır. Çizelge 4.2'de verilen ortalama geri kazanım değerleri, kalibrasyon grafiği denkleminde yararlanılarak kâğıt YZRS platformu için %80.0, SPE platformu için ise %86.7 olarak belirlenmiştir. Analitik performans göstergeleri, kâğıt YZRS platformu kullanılarak geliştirilen tek damla tespit yönteminin eksozom tayini için doğru sonuçlar verebildiğini göstermiştir. Ayrıca, ticari SPE tabanlı yöntemin kullanıldığı karşılaştırma çalışması, kâğıt YZRS tabanlı geliştirilen tek damla YZRS tespit yönteminden elde edilen sonuçların kabul edilebilir olduğunu doğrulamış ve ortalama geri kazanım değerleri açısından %92.3 oranında bir benzerlik ortaya koymuştur. Kâğıt YZRS platformu; kolay üretim, düşük maliyet ve pratik kullanım gibi önemli avantajlar sunmaktadır.

Çizelge 4.2. Eksozom tayini için kâğıt YZRS platformunun ticari ekran baskılı elektrot ile karşılaştırılması (n = 3)

Eksozom (partikül/mL)	Kâğıt YZRS platformu materyali			Ticari SPE		
	Eksozom (partikül/mL)	Geri Kazanım %	Parametreler	Eksozom (partikül/mL)	Geri Kazanım %	Parametreler
1.0×10^6	$0.7 \pm 0.1 \times 10^6$	70.0	$\bar{x} = 80.0^a$	$0.8 \pm 0.0 \times 10^6$	80.0	$\bar{x} = 86.7^a$
1.0×10^7	$0.9 \pm 0.0 \times 10^7$	90.0	SS = 10.0	$0.8 \pm 0.0 \times 10^7$	80.0	SS = 11.5
1.0×10^8	$0.8 \pm 0.1 \times 10^8$	80.0	% BSS = 12.5 CI = 55.2 – 104.8 ^b (P = 0.05)	$1.0 \pm 0.0 \times 10^8$	100.0	% BSS = 13.3 CI = 58.1-115.2 ^b (P = 0.05)

^a $\bar{x}$ = Ortalama

^b CI = Güven aralığı

Yapay idrar örneklerinin hazırlanması

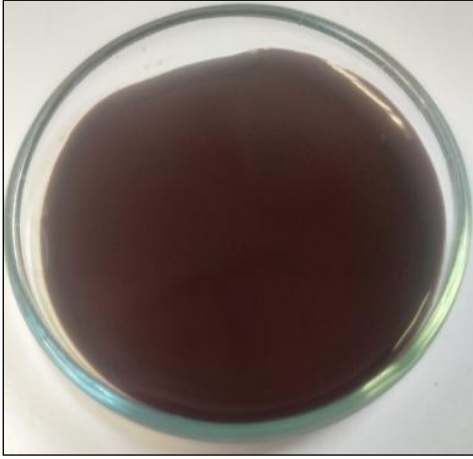
Kâğıt YZRS platformu kullanılarak geliştirilen tek damla YZRS tayin yöntemi, yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla yapay idrar matrisi üzerine eklenmiş konsantrasyonu bilinen eksozom örneklerine uygulanmıştır. Bu kapsamda, geniş bir konsantrasyon aralığında hazırlanan eksozom içeren örnekler analiz edilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar teorik olarak eklenen eksozom konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır. Farklı eksozom konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin geri kazanım değerleri (%) ile yöntemin doğruluk ve tekrarlanabilirliğini ortaya koyan analitik performans parametreleri Çizelge 4.3'te ayrıntılı olarak sunulmuştur. Elde edilen bulgular, geliştirilen tek damla YZRS tayin yönteminin farklı konsantrasyon seviyelerinde tutarlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ortalama geri kazanım değerinin %95.1 olarak hesaplanması, yöntemin teorik değerlere yüksek derecede yakın sonuçlar ürettiğini ve kabul edilebilir doğruluk sınırları içerisinde yer aldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, geri kazanım yüzdelere ait standart sapma ve bağıl standart sapma değerlerinin düşük olması, yöntemin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu desteklemektedir. Bu sonuçlar, kâğıt tabanlı YZRS platformunun karmaşık biyolojik örnek matrislerinde dahi eksozom tayini için uygun, hassas ve güvenilir bir analitik yaklaşım sunduğunu doğrulamaktadır. (Tian ve diğerleri, 2018).

Çizelge 4.3. Konsantrasyonu bilinen eksozom standartlarının yapay idrar örneklerine eklenmesiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları (n = 3)

Eksozom Konsantrasyonu (partikül/mL)		% Geri Kazanım	Parametreler
Eklenen	Bulunan		
1.0×10^6	$0.9 \pm 0.1 \times 10^6$	90.0	$\bar{x} = 95,1^a$ $SS = 7,2$ $\% BSS = 7.6$ $CI = 83,7 - 106,5^b$ $(P = 0.05)$
3.4×10^6	$3.0 \pm 0.3 \times 10^6$	88.2	
30.0×10^6	$29.7 \pm 2.6 \times 10^6$	99.0	
140.0×10^6	$144.6 \pm 7.9 \times 10^6$	103.3	

4.2. Manyetik nanopartikül kullanarak mikroçip ve YZRS tabanlı eksozom tayini

$Fe_3O_4@AuNP$ 'lerin sentezlenmesinin ardından materyal bir petri kabına yerleştirilmiş ve Şekil 4.18'de gösterilen görüntü elde edilmiştir. Sentezlenen $Fe_3O_4@AuNP$ 'ler, manyetik nanopartikülleri çevreleyen küresel altın nanopartikülleri nedeniyle kırmızı-siyah bir görünüme sahiptir.

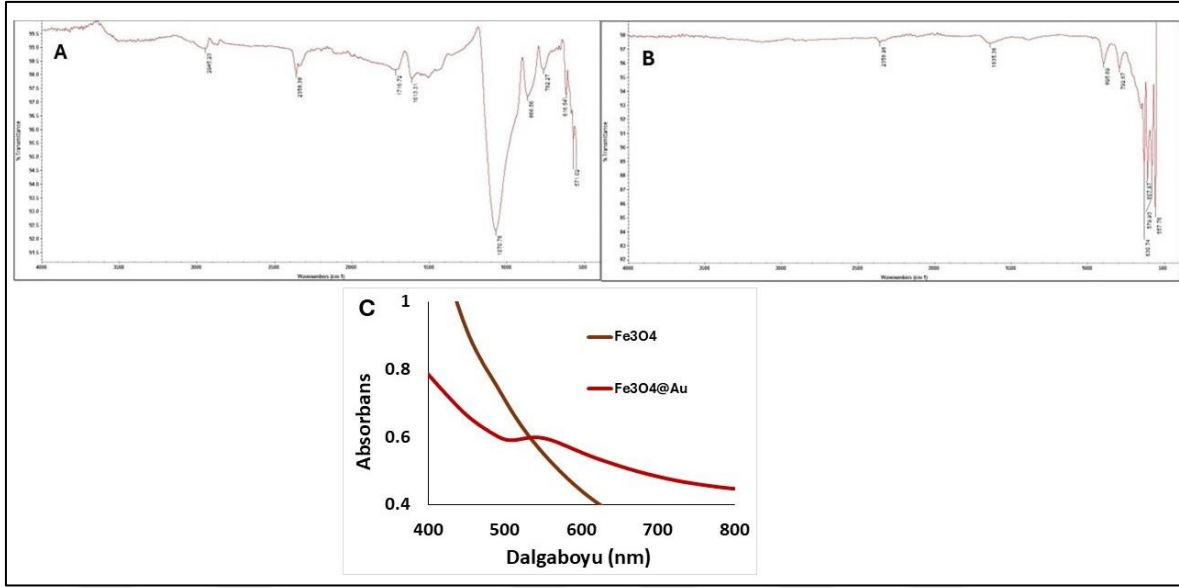


Şekil 4.18. Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'lerin fotoğrafı

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'lerin UV-Vis spektrofotometre ve FT-IR (ATR) ile karakterizasyonu

Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'lerin UV-Vis spektrometresi ile alınan spektrumu Şekil 4.19.C'de verilmiştir. Sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'nin UV-Vis spektrumları incelendiğinde, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin spektrumunda yaklaşık 550 nm civarında bir pik gözlemlenmezken, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ spektrumunda bu dalga boyunda bir absorpsiyon bandı gözlemlenmektedir. Bu bant, küresel altın nanopartiküllerin karakteristik özelliğidir. 550 nm'de izlenen absorpsiyonun altın nanopartiküllere ait olması, altın nanopartiküllerin manyetik nanopartiküllerin üzerine kaplandığını göstermektedir.

Şekil 4.19.A'daki spektrumda $\sim 570 \text{ cm}^{-1}$ civarında belirgin bir Fe-O vibrasyonu gözlemlenmektedir. Şekil 4.19.B spektrumunda Fe-O vibrasyonu hâlâ mevcuttur. Ancak $\sim 630 \text{ cm}^{-1}$, 607 cm^{-1} ve 579 cm^{-1} 'deki yeni bantlar, altın kaplama nedeniyle yüzey modifikasyonlarını göstermektedir. 1635 cm^{-1} bölgesinde gözlemlenen değişiklikler, altın kaplama nedeniyle oluşan ligandlara karşılık gelmektedir.



Şekil 4.19. A) Fe_3O_4 'e ait FT-IR spektrumu, B) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'e ait FT-IR spektrumu, C) Fe_3O_4 ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'e ait UV-Vis spektrumu

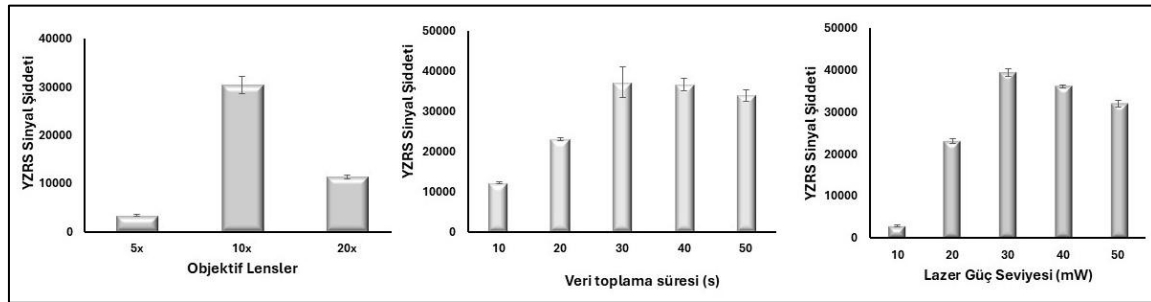
Raman mikroskop objektifinin, veri toplama süresinin ve laser güç seviyesinin optimizasyonu

Mikroskop objektifi mikroskobik sistemlerde kritik bir rol oynamaktadır ve iki temel işlevi vardır: örneği lazer ile uyarmak ve örnekten elde edilen Raman sinyalini toplamak. Bu nedenle yüksek sinyal şiddeti elde etmek için uygun hizalama gereklidir. Raman konfokal mikroskobun çözünürlüğü ve penetrasyon derinliği, objektifin numuneye mesafesi ile belirlenir. Objektifin aberasyon değerinin iyi şekilde düzeltilmesini sağlamak için yalnızca objektifin çalışma mesafesi değil, aynı zamanda ortamın kırılma indisi (n) de dikkatle değerlendirilmelidir. Ayrıca mikroçip ile objektif mercek arasındaki teması ve objektif lens yüzeyinin çizilmesini önlemek amacıyla, uzun çalışma mesafeli bir objektif tercih edilmelidir. Bu çalışmada, 1.0×10^8 partikül/mL eksozomların YZRS sinyalleri üzerindeki objektif etkisi 5X, 10X ve 20X mercekler kullanılarak incelenmiştir. 10X objektif, diğer büyütmelere kıyasla daha yüksek sinyal şiddeti sağladığı için deneyler 10X objektif ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.20.A'da gösterilmiştir.

Raman spektroskopisinde veri toplama süresi elde edilen spektral verinin kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Uygun veri toplama süresi seçimi, sinyalin yeterince güçlü olmasını sağlar ve zayıf Raman sinyallerinin daha görünür hale gelmesine olanak tanır. Ancak süre aşırı uzatılırsa, detektördeki gürültü artabilir ve veri kalitesi bozulabilir. Ayrıca

uzun veri toplama süreleri, numunede termal bozulma gibi olumsuz etkileri artırabilir ve özellikle lazer kaynaklı floresan eğilimi olan numunelerde istenmeyen arka plan sinyallerine neden olabilir. Bu nedenle, veri toplama süresinin optimize edilmesi yüksek kaliteli, tekrarlanabilir ve doğru analiz için kritik bir adımdır. Veri toplama süresini optimize etmek için 10, 20, 30, 40 ve 50 saniye süreleri test edilmiş ve YZRS sinyalleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Analizler sonucunda en yüksek YZRS şiddeti 30 saniyede elde edilmiş ve bu süre seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.20.B’de gösterilmiştir.

Lazer gücünün optimizasyonu, özellikle hassas biyolojik ve kimyasal süreçlerde lazer tabanlı analizlerde kritik öneme sahiptir. Yetersiz lazer gücü, hedef materyalin güvenilir şekilde tespit edilmesini engellerken; aşırı lazer gücü ise termal hasara, numune bozulmasına ve sinyal-gürültü oranının düşmesine neden olabilir. Bu nedenle lazer gücünün dikkatli bir şekilde ayarlanması, analiz sisteminin hassasiyetini ve doğruluğunu artırmak için gereklidir. Ayrıca lazer gücünün optimize edilmesi, enerji verimliliği sağlamak ve cihazın kullanım ömrünü uzatmak açısından da önemlidir. Lazer gücü optimizasyonu için 10, 20, 30, 40 ve 50 mW güç seviyeleri test edilmiş ve YZRS sinyalleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deneysel sonuçlar, en yüksek sinyalin 30 mW lazer gücünde elde edildiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.20.C’de sunulmuştur.

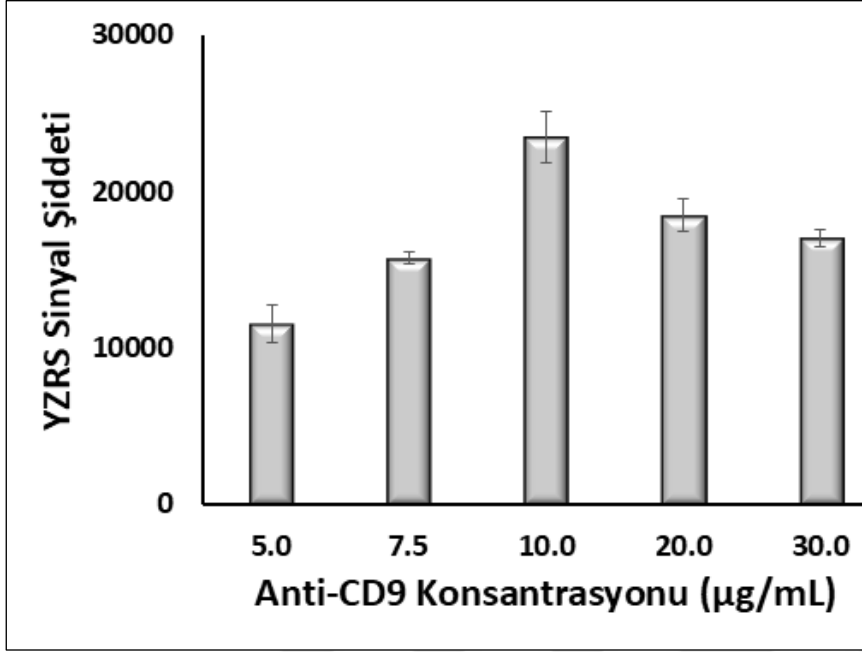


Şekil 4.20. 1.0×10^8 eksozom partikül/mL ile objektif lenslerin (A), veri toplama süresinin (B) ve lazer güç seviyesinin (C) YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisini gösteren grafik

Anti-CD9 konsantrasyonunun optimizasyonu

1.0×10^6 partikül/mL eksozom konsantrasyonu için beş farklı anti-CD9 konsantrasyonu kullanılarak, antikor konsantrasyonunun YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen YZRS sinyalleri Şekil 4.21’de sunulmuştur. Anti-CD9 konsantrasyonu optimize

edildikten sonra, en yüksek YZRS şiddeti 10.0 µg/mL konsantrasyonda elde edilmiştir. Bu konsantrasyon temel alınarak tüm gerekli modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.

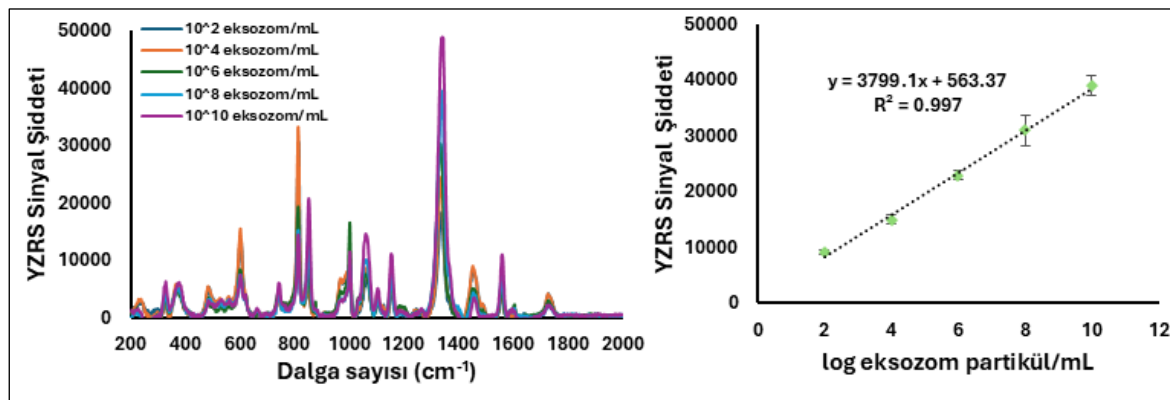


Şekil 4.21. $1,0 \times 10^6$ eksozom partikül/mL kullanılarak anti-CD9 konsantrasyonlarının YZRS sinyali üzerindeki etkisini gösteren grafik

Geliştirilen biyosensörün analitik performansı

Geliştirilen biyosensörün eksozom tayini için analitik performansı, yöntem parametreleri, lineer aralık, duyarlılık ve teşhis limiti açısından optimal koşullar altında değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 100.0 µg liyofilize eksozom standardı 100.0 µL steril distile suda çözündürülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından, bu stok çözeltiden ve PBS tamponunda hazırlanan eksozom standartlarından farklı konsantrasyonlarda, $1,0 \times 10^2$ ’den $1,0 \times 10^{10}$ partikül/mL’ye kadar çözeltiler hazırlanmıştır. Biyosensör üzerindeki DTNB moleküllerinin YZRS sinyalleri, 785 nm lazer ışını ve 10X objektif kullanılarak 200–2000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir. Optimum koşullar altında alınan ölçümler, 30 mW lazer gücü ve 30 saniye veri toplama süresi ile gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 1330 cm^{-1} ’de gözlenen en yoğun pik, DTNB molekülündeki nitrojen grubunun simetrik gerilme vibrasyonuna atfedilmiştir. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNP}$ ’ler tarafından yakalanan eksozom sayısı arttıkça, 1330 cm^{-1} ’deki DTNB pik şiddetinde bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.22.A). Kör sinyali çıkarıldıktan sonra, DTNB sinyali şiddetindeki değişimler ve logaritmik olarak değişen eksozom konsantrasyonları ($1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^{10}$ partikül/mL) temel alınarak bir

kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Şekil 4.22.B’de gösterildiği gibi, YZRS yanıtı 1.0×10^2 ’den 1.0×10^{10} partikül/mL’ye kadar lineer olup, korelasyon katsayısı (R^2) 0.997 olarak bulunmuştur ($n=3$). Teşhis ve tayin limit değerleri sırasıyla 0.14×10^1 ve 0.46×10^1 eksozom partikül/mL olarak belirlenmiştir. Korelasyon katsayıları, deneysel verilerin lineer olduğunu ve toplam varyasyonun en az %93’ünü açıkladığını göstermektedir. Üç farklı seriden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğim değerleri karşılaştırıldığında, yöntemin tekrarlanabilir olduğu ve standart sapmanın %7.0 olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel veriler Çizelge 4.4’de özetlenmiştir. Teşhis limiti ($3 \times SS$) / m formülü ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.22. A) Farklı eksozom konsantrasyonlarında eksozomların kantitatif değerlendirmesi için DTNB’nin YZRS spektrumları, B) 1330 cm^{-1} dalga sayısındaki DTNB YZRS sinyal şiddetindeki değişimlere dayanarak ve eksozom konsantrasyon aralığı ($1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^{10}$ partikül/mL) temel alınarak elde edilen kalibrasyon doğrusu

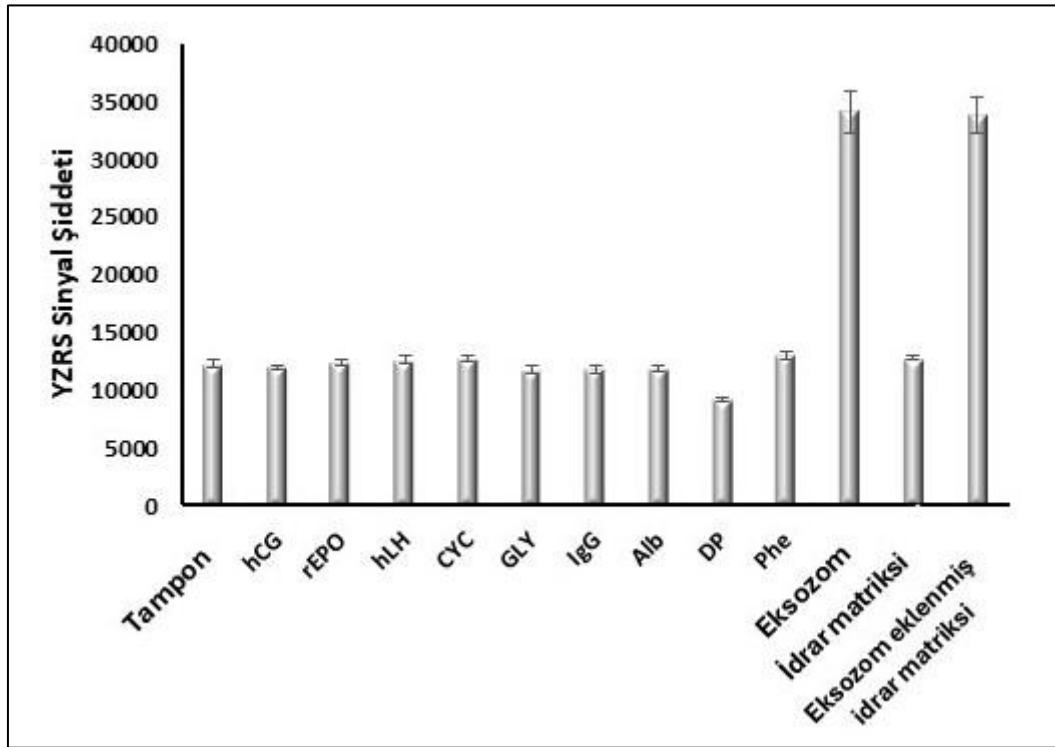
Çizelge 4.4. Eksozom tayini için üç farklı seriye ait kantitatif parametreler ve istatistiksel veriler

Kalibrasyon Sayısı	Doğru Denklemi	R^2	Doğrusal Aralık (Eksozom/mL)	LOD (Eksozom/mL)	Eğim Değerleri
1	$y = 3514.6x + 1055.8$	0,9959	$10^2 - 10^{10}$	1,42	$\bar{x}$ 3799,1
2	$y = 3845.6x + 250.22$	0,9923	$10^2 - 10^{10}$	1,38	SS 264,3
3	$y = 4037.1x + 384.11$	0,9957	$10^2 - 10^{10}$	1,36	% BSS 7,0

Geliştirilen biyosensörün seçicilik çalışması

Geliştirilen biyosensörün seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, potansiyel girişim etkisine sahip türler üzerinde bir immünolojik çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için PBS içinde 10.000 U/mL hCG, 10.000 mIU/mL rEPO, 250.0 U/L hLH, 1.0 mM sistein, 50.0 mM glikoz, 1.0 mg/mL IgG, 1.0 mM albümin, 10.0 mM dopamin, 1.2 mM fenilalanin ve $1.0 \times$

10^6 partikül/mL eksozom standardı hazırlanmıştır. Girişim etkisini daha ayrıntılı incelemek için, 1.0×10^6 partikül/mL eksozom standardı bir idrar matriksine eklenmiştir. Ardından, her örnek için DTNB moleküllerinden elde edilen YZRS sinyalleri kaydedilmiştir. Şekil 4.23’de görüldüğü gibi, girişim potansiyeli olan türlerin varlığında YZRS sinyal şiddetlerinin kör sinyali ile aynı iken eksozom varlığında ise sinyal şiddetinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, geliştirilen biyosensörün eksozom tayininde yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.23. PBS içindeki hCG, rEPO, hLH, sistein, glikoz, IgG, albümin, dopamin, fenilalanin ve eksozomların yanı sıra idrar matriksine eklenen standart eksozomlar varlığında elde edilen YZRS sinyal şiddetleri

YZRS tabanlı pasif mikroçip biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi

Gün içi kesinliğin belirlenmesi amacıyla YZRS ölçümleri aynı gün içinde altı farklı yüzeyde, günler arası kesinliğin belirlenmesi amacıyla ise üç farklı günde üç farklı yüzeyde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’de sunulmuştur. Geliştirilen yöntemin doğruluğu, gün içi ve günler arası sinyallerin % BSS değerlerinin $\leq \%15$ ’in altında olması ile doğrulanmıştır.

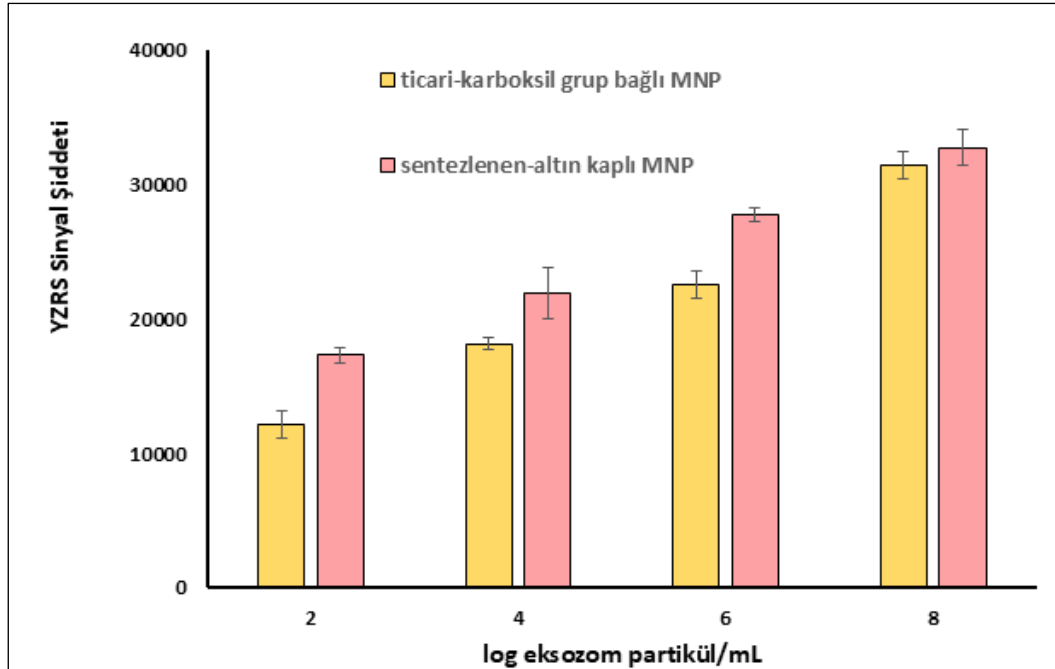
Çizelge 4.5. Eksozom tayini için YZRS tabanlı pasif mikroçip sensörün gün içi ve günler arası doğruluk sonuçları

Eksozom (partikül/mL)	Güniçi (n=6)		Günler arası (n=3)	
	Eksozom (partikül/mL)	%BSS	Eksozom (partikül/mL)	%BSS
1.0×10^4	$1.1 \pm 0.1 \times 10^4$	12.2	$1.1 \pm 0.1 \times 10^4$	10.8
1.0×10^6	$0.9 \pm 0.1 \times 10^6$	7.4	$0.9 \pm 0.1 \times 10^6$	5.9
1.0×10^8	$1.1 \pm 0.2 \times 10^8$	14.4	$1.1 \pm 0.0 \times 10^8$	4.3

%BSS: Bağlı standart sapma

Ticari manyetik nanopartiküllerin karşılaştırılması

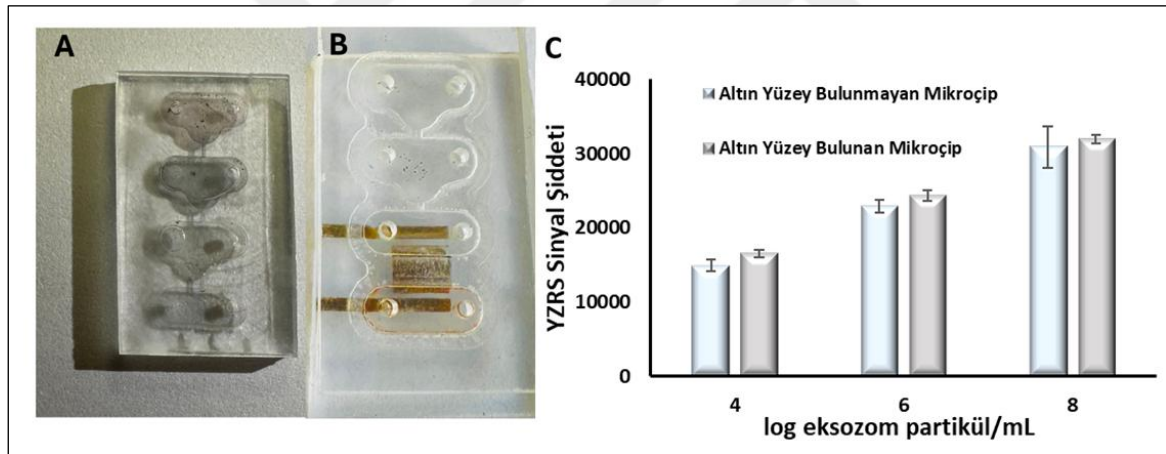
Bu çalışmada, laboratuvarında sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$ 'ler ile ticari olarak temin edilen SpeedBeads manyetik karboksilat modifiye nanopartiküller kullanılarak gerçekleştirilen immünoassay çalışmalarının YZRS sinyal şiddeti üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.24'de sunulmuştur. Sonuçlara göre, manyetik nanopartiküllerin altın kaplanması YZRS sinyallerinde bir artışa yol açmaktadır. Bu artış, altın kaplama nedeniyle nanopartikül yüzeyinde plazmon rezonansının oluşması ile açıklanmaktadır; bu durum lazer ışığının etkisini artırarak Raman sinyallerinde yükselmeye neden olmaktadır.



Şekil 4.24. SpeedBeads manyetik karboksilat modifiye nanopartiküller ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerin YZRS sinyal şiddetleri üzerindeki etkisini gösteren grafik

Altın plaka entegre edilmiş pasif mikroçipin YZRS sinyal şiddetine olan etkisi

Geliştirilen YZRS tabanlı pasif mikroçip biyosensörün son odacığına bir altın yüzey eklenerek YZRS şiddetindeki artış araştırılmıştır. Şekil 4.25.A, altın plakası olmayan pasif mikroçipin görüntüsünü, Şekil 4.25.B ise altın plakalı mikroçipin görüntüsünü göstermektedir. Her iki yüzeyde de üç farklı eksozom konsantrasyonunda (1.0×10^4 , 1.0×10^6 , 1.0×10^8 partikül/mL) pasif mikroçip sensöründe immünoassay prosedürü uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.25.C’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, altın yüzeye sahip mikroçip ile ölçülen YZRS şiddetinin, altın plakası bulunmayan mikroçipe kıyasla yaklaşık %9 oranında daha yüksek olduğu gözlemlenmiş; ancak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, çalışmaların altın plakası olmayan mikroçip ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.25. A) Pasif mikroçip sensörün görüntüsü, B) Son odacığı altın plaka entegre edilmiş pasif mikroçip sensörün görüntüsü, C) Son odacığı altın plakalı ve altın plakası olmayan pasif mikroçip sensörlere immünoassay yöntemi uygulandıktan sonra elde edilen YZRS sinyal şiddeti

Yapay idrar örneklerinin hazırlanması

Mikroçip-YZRS platformu kullanılarak geliştirilen tayin yöntemi, yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla yapay idrar matriksi üzerine eklenmiş konsantrasyonu bilinen eksozom örneklerine uygulanmıştır. Bu kapsamda, geniş bir konsantrasyon aralığında hazırlanan eksozom içeren örnekler analiz edilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar teorik olarak eklenen eksozom konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır.

Farklı eksozom konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin geri kazanım değerleri (%) ile yöntemin doğruluk ve tekrarlanabilirliğini ortaya koyan analitik performans parametreleri Çizelge 4.6’da ayrıntılı olarak sunulmuştur. Elde edilen bulgular, geliştirilen mikroçip - YZRS tayin yönteminin farklı konsantrasyon seviyelerinde tutarlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ortalama geri kazanım değerinin % 103.5 olarak hesaplanması, yöntemin teorik değerlere yüksek derecede yakın sonuçlar ürettiğini ve kabul edilebilir doğruluk sınırları içerisinde yer aldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, geri kazanım yüzdelere ait standart sapma ve bağıl standart sapma değerlerinin düşük olması, yöntemin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu desteklemektedir. Bu sonuçlar, mikroçip - YZRS platformunun karmaşık biyolojik örnek matrislerinde dahi eksozom tayini için uygun, hassas ve güvenilir bir analitik yaklaşım sunduğunu doğrulamaktadır.

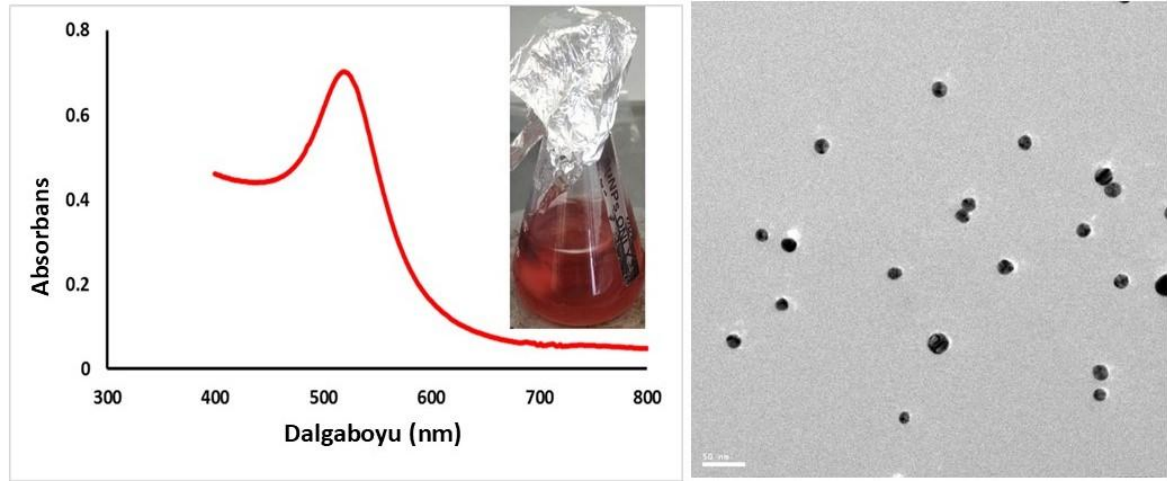
Çizelge 4.6. Konsantrasyonu bilinen eksozom standartlarının yapay idrar örneklerine eklenmesiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları (n = 3)

Eksozom Konsantrasyonu (partikül/mL)		% Geri kazanım	Parametreler
Eklenen	Bulunan		
1.0×10^6	$1.1 \pm 0.0 \times 10^6$	109.6	$\bar{x} = 103.5^a$ $SS = 6.2$ $\% BSS = 6.0$ $CI = 93.7 - 113.4^b$ $(P = 0.05)$
3.4×10^6	$3.2 \pm 0.2 \times 10^6$	95.0	
30.0×10^6	$31.1 \pm 0.8 \times 10^6$	103.6	
140.0×10^6	$148.4 \pm 9.6 \times 10^6$	106.0	

4.3. Elektrokimyasal Yatay Akış Analizi Kullanarak IgG Tayini

Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu

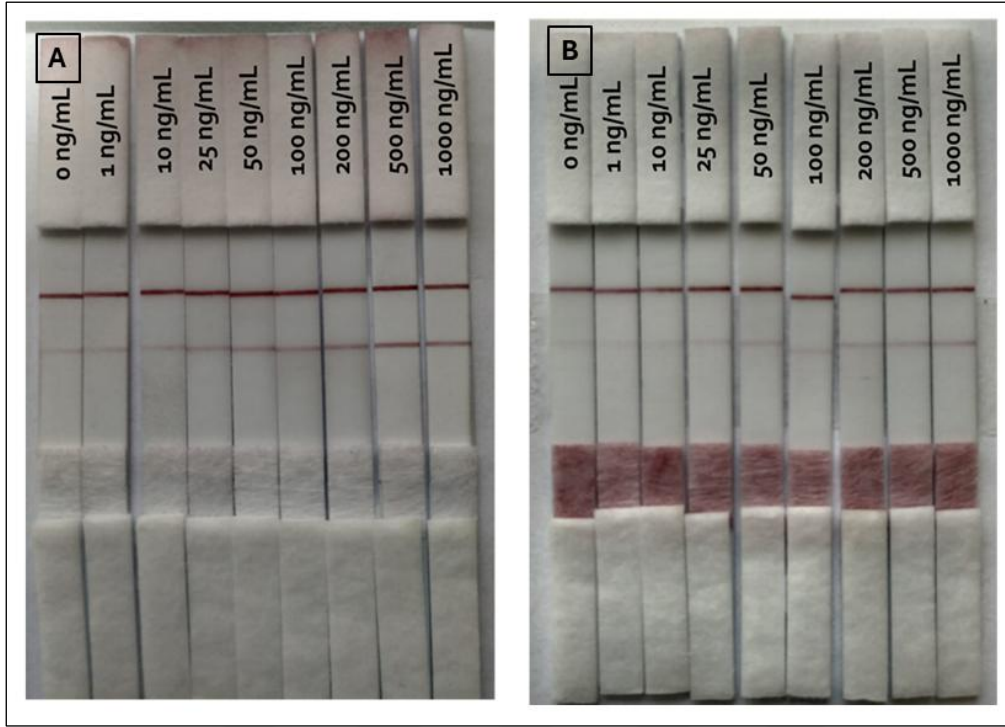
Sitrat kaplı küre şekilli altın nanopartikülleri karakterize etmek için partiküllerin TEM görüntüleri alınmış ve UV-Vis absorpsiyon spektrumları ölçülmüştür. Şekil 4.26’da 520 nm’de gözlenen bant küresel yapıdaki nanopartiküllere ait olan banttır ve TEM görüntüsünden de sentezlenen partiküllerin küresel şekilleri görülmektedir.



Şekil 4.26. Sitrat kaplı küresel altın nanopartiküllere ait UV-Vis spektrumu ve nanopartiküllerin 50 nm ölçekteki TEM görüntüsü

Konjugasyon çözeltisinin optimizasyonu

Konjugasyon çözeltisi olarak 10 mM, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde %10 sukroz kullanıldığında, Şekil 4.27.B’de gösterildiği üzere test hattında elde edilen sinyal şiddeti oldukça düşük kalmıştır. Bu durum, yüksek sukroz konsantrasyonunun altın-nanopartikül–antikor konjugasyon verimliliğini olumsuz etkileyebileceğini veya akış dinamiklerini değiştirerek test hattındaki birikimi sınırladığını düşündürmektedir. Ayrıca, yalnızca sukroz içeren bir tampon sisteminin stabilite ve bağlanma etkinliği açısından yeterli koruyucu özellik göstermediği değerlendirilmiştir. Sinyal şiddetini artırmak ve konjugasyon verimini iyileştirmek amacıyla tampon kompozisyonu yeniden optimize edilmiştir. Bu kapsamda, %5 sukroz, %1 BSA ve %0.5 Tween-20 içeren 10 mM pH 7.4 PBS çözeltisi hazırlanarak konjugasyon işlemi tekrarlanmıştır. Şekil 4.27.A’da görüldüğü üzere, bu yeni tampon bileşimi test hattındaki sinyal yoğunluğunu belirgin şekilde artırmıştır. Bu iyileşmenin; BSA’nın protein stabilitesini artırarak antikorun nanopartikül yüzeyine daha etkin bağlanmasını sağlaması, Tween-20’nin akış sırasında partiküllerin agregasyonunu azaltması ve membran üzerindeki hareketliliği artırması, sukroz konsantrasyonunun %10’dan %5’e düşürülmesinin konjugasyon verimi açısından daha uygun bir ozmotik ortam oluşturması ile ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Sonuç olarak, optimize edilen konjugasyon çözeltisinin kullanımı sinyal şiddetinde belirgin bir artış sağlamış ve yatay akış immunoassay performansını önemli ölçüde iyileştirmiştir.

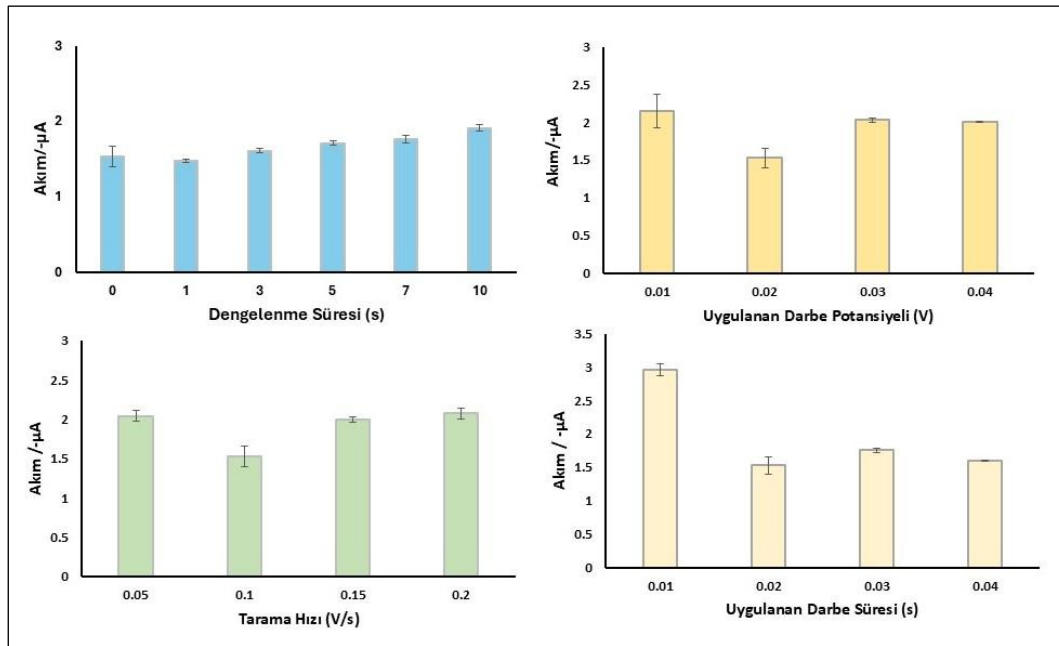


Şekil 4.27. A) Konjugasyon çözeltisi olarak %5 sukroz, %1 BSA ve %0.5 Tween-20 içeren 10 mM pH 7.4 PBS kullanıldığında elde edilen sonuçlar, B) Konjugasyon çözeltisi olarak 10 mM pH 7.4 PBS içerisinde %10 sukroz kullanıldığında elde edilen sonuçlar,

Elektrokimyasal parametrelerin optimizasyonu

Bu tez çalışma kapsamında kullanılan elektrokimyasal ölçüm yönteminin analitik performansını doğru tayin edebilmek amacıyla dengeleme süresi (equilibration time, s), uygulanan darbe potansiyeli (E pulse, V), darbe süresi (pulse time, s) ve tarama hızı gibi temel voltametrik parametreler ayrıntılı bir şekilde optimize edilmiştir. Optimizasyon süreci, hem elektrotta meydana gelen yüzey reaksiyonlarının etkinliğini artırmak hem de analit sinyalinin seçiciliğini ve hassasiyetini yükseltmek üzere sistematik bir yaklaşım ile yürütülmüştür. Grafiklerde sunulan optimizasyon çalışmaları, elektrokimyasal cevabın farklı parametreler altında nasıl değiştiğini ayrıntılı şekilde göstermektedir. Dengeleme süresi değerleri incelendiğinde (Şekil 4.28.A), dengeleme süresinin 0–10 s arasında pik akımında belirgin bir artış sağlamadığı görülmekle birlikte, 0 s değerinde elde edilen akımın yeterli düzeyde olduğu ve daha uzun sürelerin sinyalde anlamlı bir iyileşme sağlamadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, yöntem süresini uzatmadan kararlı sinyal elde edilebilmesi açısından dengeleme süresi = 0 s optimum olarak seçilmiştir. Uygulanan darbe potansiyel değerlerine bakıldığında (Şekil 4.28.B.), potansiyelin 0.01 – 0.04 V aralığında sinyal

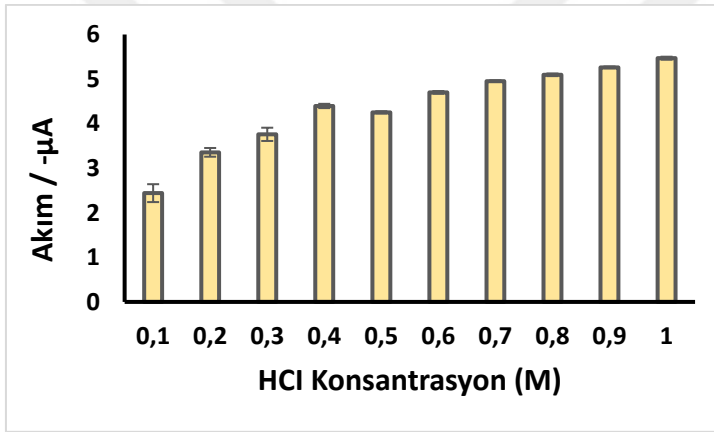
davranışı üzerinde farklı etkiler gösterdiği, ancak 0.03 V'de akım şiddetinin nispeten daha düşük hata payı ile daha kararlı olduğu görülmüştür. Diğer potansiyel değerlerinde akım dalgalanmalarının artması nedeniyle, analitik tekrarlanabilirliği artırmak adına E pulse = 0,03 V optimum olarak tercih edilmiştir. Tarama hızı sonuçları değerlendirildiğinde (Şekil 4.28.C); 0,05 V/s'de daha yüksek bir akım elde edilse de, hızın artmasıyla birlikte arka plan gürültüsünün yükseldiği ve sinyal stabilitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. 0,15 V/s tarama hızı, hem makul bir sinyal şiddeti hem de daha düşük gürültü seviyesi sağlayarak yöntemin tekrarlanabilirliğini artırmıştır. Bu nedenle tarama hızı = 0,15 V/s optimum değer olarak belirlenmiştir. Darbe süresi için elde edilen veriler değerlendirildiğinde (Şekil 4.28.D.), 0,01 s darbe süresinin yüksek akım verdiği görülse de, bu sürede sinyalde dalgalanmaların ve hata payının arttığı dikkat çekmektedir. 0,03 s darbe süresi ise daha dengeli bir akım üretmiş, elektrot yüzeyindeki kapasitif etkilerin artmasını engellemiş ve sinyal kararlılığını yükseltmiştir. Bu nedenle pulse time = 0.03 s optimum koşul olarak seçilmiştir. Sonuç olarak, tüm parametrelerin birlikte değerlendirilmesiyle dengeleme süresi = 0 s, puls potansiyeli= 0.03 V, tarama hızı = 0.15 V/s ve puls süresi = 0.03 s olarak belirlenmiştir. Hem sinyal şiddeti hem de sinyal-gürültü oranı açısından en uygun elektrokimyasal koşulları sağladığı belirlenmiştir. Tüm sonraki elektrokimyasal analizler bu optimize edilmiş parametre seti altında gerçekleştirilmiştir



Şekil 4.28. Optimizasyon çalışmalarında değerlendirilmiş olan elektrokimyasal parametreleri gösteren grafikler A) dengeleme süresi, B) uygulanan darbe potansiyeli, C) tarama hızı ve D) uygulanan darbe süresi sonuçları

Kullanılan HCl asidin konsantrasyonunun optimizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, HCl konsantrasyonunun artmasıyla birlikte kağıt elektrot üzerinden ölçülen akım değerlerinin düzenli bir şekilde yükseldiğini göstermektedir. Şekil 4.29’da da görüldüğü üzere; düşük asitlikte (0,1–0,3 M) akım değerleri daha sınırlıyken, konsantrasyon 1,0 M seviyesine kadar arttıkça akımın da belirgin biçimde arttığı görülmektedir. Asit miktarının artmasıyla birlikte, yüzeyden koparılan altın miktarının da orantılı olarak arttığı ve buna bağlı olarak ölçülen akım değerlerinde artış gözlemlendiği belirlenmiştir. Daha yüksek asit konsantrasyonları kağıt elektrot ve referans elektrot için tehlikeli olduğundan dolayı tercih edilmemiştir (Miglione ve diğerleri, 2025).



Şekil 4.29. Hidroklorik asit konsantrasyonunun optimizasyonunu gösteren grafik

Sistem bileşenlerinin bir araya getirilmesi

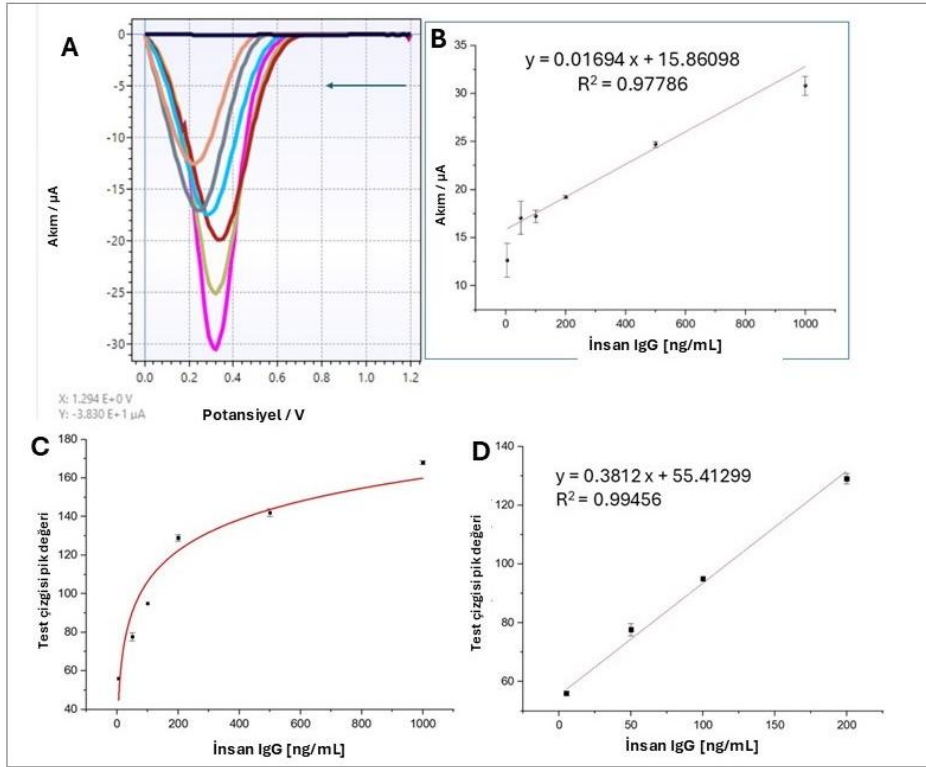
Kağıt elektrot, numune pedi, konjugasyon pedi ve adsorban pedinin uygun şekilde bir araya getirilmesiyle, 15 mm genişliğinde elektrokimyasal bir yatay akış test stripti oluşturulmuştur. Bu yapı, akışkanın pedler arasında kontrollü bir şekilde ilerlemesine olanak sağlayarak hem biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini hem de elektrokimyasal sinyalin güvenilir biçimde ölçülmesini mümkün kılacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 4.30.)



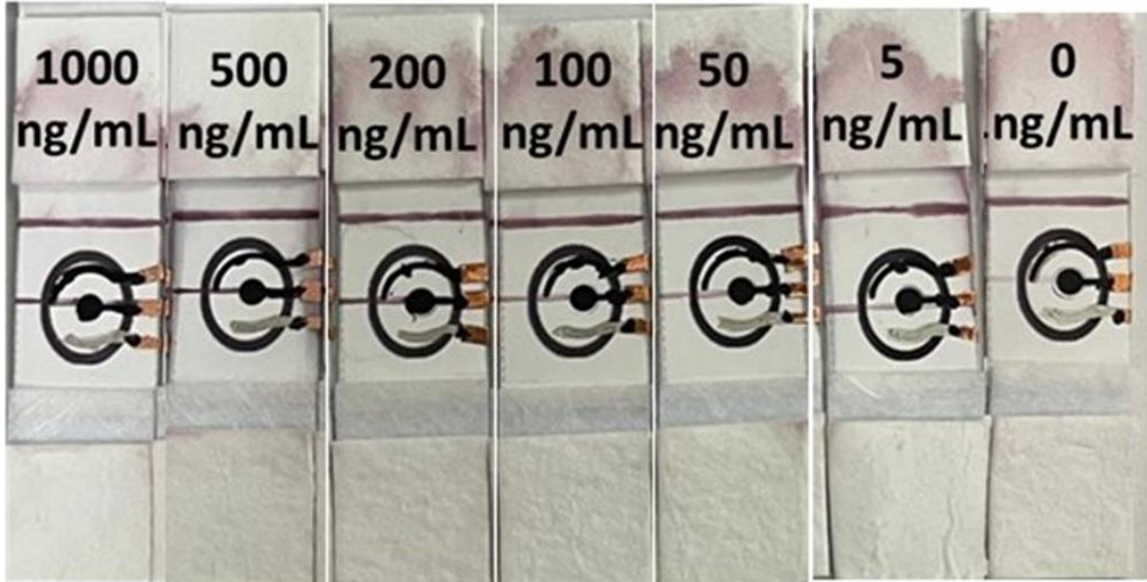
Şekil 4.30. Kağıt elektrot, numune pedi, konjugasyon pedi ve adsorban pedinin bir araya getirilmesiyle oluşturulan 15 mm genişliğindeki elektrokimyasal yatay akış test stripti

Geliştirilen biyosensörün analitik performansı

Geliştirilen biyosensörün insan IgG tayinindeki analitik performansı, 5 ng/mL ile 1000 ng/mL konsantrasyon aralığında sistematik olarak incelenmiştir. Bu değerlendirme sırasında biyosensörün duyarlılığı, ölçüm doğruluğu ve tekrarlanabilirliği farklı yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır. Yatay akış testi ile gerçekleştirilen analizlerde, oluşan sinyal yoğunlukları Image J programı aracılığıyla kantitatif olarak analiz edilmiş ve insan IgG için belirlenen teşhis limit değeri 1,5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Öte yandan, elektrokimyasal yatay akış testi ile yapılan ölçümlerde, biyosensörün daha yüksek duyarlılık sergilediği gözlemlenmiş ve teşhis limit değeri 0,8 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümlere ait grafikler, sinyal yanıtlarının konsantrasyon ile ilişkisini ve ölçümlerin doğrusal aralığını gösterecek şekilde Şekil 4.31.A ve 4.31.B’de sunulmuştur. Ayrıca, Image J kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi ve buna bağlı grafikler Şekil 4.31.C ve 4.31.D’de verilmiş olup, bu veriler biyosensörün geniş dinamik aralıkta güvenilir, tekrarlanabilir ve kantitatif ölçümler yapabildiğini doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, elektrokimyasal yöntemin özellikle düşük konsantrasyonlarda insan IgG tespiti için daha uygun ve hassas bir yaklaşım olduğunu ortaya koymaktadır. Teşhis limiti $(3 \times SS) / m$ formülü ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.31. A) 5–1000 ng/mL aralığındaki İnsan IgG derişimlerine ait voltamogramlar, B) Şekil A’den elde edilen elektrokimyasal yatay akış analizine ilişkin kalibrasyon grafiğı, C) ImageJ ile analiz edilerek elde edilen kalibrasyon eğrisi, D) Şekil C’den türetilen kalibrasyon grafiğı



Şekil 4.32. Geliştirilen elektrokimyasal yatay akış test şeritlerinin görüntüsü



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, eksozomların tayini için yenilikçi biyosensör platformları geliştirilmiş ve performansı sistematik olarak incelenmiştir. Geliştirilen sistem, YZRS nanoetiketler ile minyatürize edilmiş bir yakalama platformunu birleştiren hibrit bir yaklaşım sunmaktadır. Bu sayede, eksozomların kantitatif ve hassas bir şekilde belirlenebilmesi sağlanmıştır. YZRS ve immünolojik yöntemlerin entegrasyonu, biyosensörün düşük konsantrasyonlarda dahi güvenilir sinyal elde etmesini mümkün kılmıştır ve bu yaklaşım, tanı, biyobelirteç keşfi ve terapötik araştırmalar için güçlü bir araç olarak öne çıkmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, çevre dostu ve yüksek duyarlılığa sahip bir kağıt tabanlı YZRS platformu geliştirilmiştir. Kağıt platform olarak nitroselüloz (NC) membran özellikli kağıt elektrot kullanılarak üretilmiş olup literatürde bildirilen ilk eksozom tayini amaçlı kağıt tabanlı YZRS yöntemi olma özelliğini taşımaktadır. Platform yüzeyi, nanostar şeklinde altın nanopartiküller (AuNP) ile modifiye edilmiş ve ardından anti-CD9 antikoru ile konjuge edilmiştir. Bu morfoloji sayesinde eksozomlar platform yüzeyinde etkin şekilde yakalanmıştır. Daha sonra, YZRS etiket olarak görev yapan AuNC@DTNB@anti-CD9 kullanılarak sandviç yapısında immünolojik bir test oluşturulmuştur. Kullanılan anti-CD9 antikoru, eksozom üzerindeki CD9 bölgelerine özgü olarak bağlanmakta ve bu sayede yüksek seçicilik sağlanmaktadır. Geliştirilen biyosensör sistemi, tek damla immüno analiz modeli kullanılarak yalnızca 2 μ L örnek ile analiz yapılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, sistemin belirli konsantrasyonlarda eksozom eklenmiş yapay idrar örneklerinde uygulanabilirliği araştırılmış ve yüksek geri kazanım oranları elde edilmiştir. Bu bulgular, geliştirilen biyosensörün prostat kanseri gibi kompleks hastalıkların erken tanısında eksozom sayısının güvenilir bir şekilde izlenmesine olanak sağlayabileceğini ve tanıyı destekleyici yardımcı bir analiz yöntemi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Geliştirilen tek damla kağıt tabanlı YZRS immüno analiz çalışması, $1,0 \times 10^3$ ile $1,0 \times 10^9$ eksozom partikül/mL arasında doğrusal bir aralık göstermiş ve korelasyon katsayısı (R^2) 0,9903 olarak bulunmuştur. Tespit limiti $9,9 \times 10^1$ eksozom partikül/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, yapay idrar örneklerine eklenen ve konsantrasyonu bilinen eksozomların ortalama %95,1 geri kazanım değeri ile başarılı bir şekilde değerlendirildiğini göstermektedir.

Aynı zamanda YZRS tabanlı pasif mikroçip sensör platformunun analitik performansı ayrıntılı olarak değerlendirilmiş ve optimize edilmiştir. Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNP}$, plazmonik etkinin artırılmasını sağlayan yüzey özellikleri ile güçlü YZRS sinyalleri üretmiştir. Optimum antikor konsantrasyonu, mikroskop objektif büyütmesi ve entegrasyon süresi gibi parametrelerin doğru şekilde belirlenmesi, tekrarlanabilir ve güvenilir ölçümler elde edilmesinde kritik rol oynamıştır.

Geliştirilen sensör, $1,0 \times 10^2$ ile $1,0 \times 10^{10}$ partikül/mL arasında geniş bir doğrusal aralık ve $0,46 \times 10^1$ partikül/mL seviyesinde düşük bir teşhis limit değeri sergileyerek üstün analitik performans göstermiştir. Farklı eksozom konsantrasyonları arasında elde edilen korelasyon katsayısı ($R^2 = 0.997$), ölçümlerin güvenilirliğini desteklemektedir. Geliştirilen biyosensör sistemi, konsantrasyonu bilinen eksozomların yapay idrar örneklerine eklenmesiyle gerçekleştirilen gerçek örnek çalışmaları kapsamında değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yapay idrar matriksi üzerine eklenen eksozomların ortalama %103,5 geri kazanım değeri ile doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edilebildiğini göstermektedir. Ayrıca, manyetik nanopartiküllerin kullanımı eksozom izolasyonunu kolaylaştırmış ve sensör platformunun gerçek biyolojik matrikslerde etkin çalışabileceğini göstermiştir.

Geliştirilen üçüncü biyosensör sisteminde insan IgG tayin performansı da detaylı olarak incelenmiştir. 5,0 ng/mL ile 1000,0 ng/mL konsantrasyon aralığında yapılan sistematik çalışmalarda, biyosensörün duyarlılığı, ölçüm doğruluğu ve tekrarlanabilirliği farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Yatay akış testi ile gerçekleştirilen analizlerde, sinyal yoğunlukları Image J programı kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiş ve teşhis limit değeri 1,5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Elektrokimyasal yatay akış testi ile yapılan ölçümlerde ise daha yüksek duyarlılık gözlenmiş ve teşhis limit değeri 0,8 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümlere ait grafikler, sinyal yanıtlarının konsantrasyon ile ilişkisini ve ölçümlerin doğrusal aralığını gösterecek şekilde Şekil 4.31.A ve 4.31.B’de sunulmuştur. Image J kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi ve grafikleri ise Şekil 4.31.C ve 4.31.D’de verilmiştir. Bu veriler, biyosensörün geniş dinamik aralıkta güvenilir, tekrarlanabilir ve kantitatif ölçümler yapabildiğini göstermektedir. Elektrokimyasal yöntem, insan IgG tayini için daha uygun ve hassas bir yaklaşım sunmaktadır.

Yatay akış test şeridine numune yüklendikten sonra immünolojik reaksiyonun tamamlanması için belirlenen süre boyunca beklenmiş ve ardından wax yazıcı ile desenlenen

elektrot ısıtılarak, waxın alt katmanlara penetre olması sağlanmıştır. Bu işlem, test şeridi üzerinde elektrokimyasal hücre yapısı oluşturulmasına olanak tanımıştır. Daha sonra, elektrotun çalışma bölgesine 1 M HCl çözeltisi eklenmiş, bu sayede test çizgisinde biriken AuNP'ler çözünerek Au(III) iyonları serbest kalmıştır. Ölçülen akım tepesi, Au(III)'ün Au(0)'a elektrokimyasal indirgenmesine karşılık gelmekte ve numunedeki IgG konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Böylece elektrokimyasal yatay akış testi, kolorimetrik sinyali oluşturan altın nanopartiküllerden kantitatif bir sonuç elde edilmesini sağlamıştır.

Bu sonuçlar, geliştirilen optik ve elektrokimyasal tabanlı biyosensör sistemlerinin birkaç açıdan önemli avantajlar sunduğunu ortaya koymaktadır. Öncelikle, sensör düşük örnek hacmi ile yüksek hassasiyet sağlamaktadır. İkincisi, elektrokimyasal ve optik tabanlı ölçümler sayesinde hem kantitatif hem de görselleştirilebilir sinyal elde edilebilmekte, böylece farklı uygulamalara uygun esnek bir platform sağlanmaktadır. Üçüncüsü, manyetik nanopartiküller ve kağıt tabanlı platformlar gibi yenilikçi malzemelerin kullanımı, hem maliyeti düşürmekte hem de çevre dostu bir yaklaşım sunmaktadır.

Özetle, bu çalışma hem optik hem de elektrokimyasal tabanlı yaklaşımları birleştiren yenilikçi bir biyosensör platformu sunmuş, geniş dinamik aralık, düşük teşhis limiti ve yüksek doğruluk gibi üstün analitik özellikler elde edilmiştir. Sistem, konsantrasyonu bilinen eksozom eklenmiş yapay idrar örneklerinde güvenilir bir şekilde uygulanabilirliği kanıtlanmış, düşük maliyetli ve çevre dostu platform kullanımı ile sürdürülebilirliği desteklemiştir. Bu bulgular, biyosensörün gelecekte erken tanı, biyobelirteç araştırmaları ve terapötik geliştirme alanlarında önemli yardımcı araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Abarintos, V., Piper, A. and Merkoci, A. (2025). Electrochemical lateral flow assays: A new frontier for rapid and quantitative biosensing. *Current Opinion in Electrochemistry*, 101750.
- Aheget, H., Mazini, L., Martin, F., Belqat, B., Marchal, J. A. and Benabdellah, K. (2020). Exosomes: Their role in pathogenesis, diagnosis and treatment of diseases. *Cancers*, 13, 84.
- Ahi, E. E., Torul, H., Zengin, A., Sucularlı, F., Yıldırım, E., Selbes, Y., Suludere, Z. and Tamer, U. (2022). A capillary driven microfluidic chip for SERS-based hCG detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 195, 113660.
- Al Mannai, A., Haik, Y., Elmel, A., Qadri, S. and Saud, K. M. (2022). 3D SERS-based biosensor for the selective detection of circulating cancer-derived exosomes. *Emergent Materials*, 5, 1579–1591.
- Albrecht, M. G. and Creighton, J. A. (1977). Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 5215–5217.
- Ali, H. I. and Mutlak, B. H. (2024). Synthesis and characterization of gold nanoparticles and gold nanoparticles loaded with bromelain. *Iraqi Journal of Physics*, 22, 37–49.
- Allelein, S., Aerschlimann, K., Roesch, G., Khajehamiri, R., Koelsch, A., Freese, C. and Kuhlmeier, D. (2022). Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-positive extracellular vesicles in urine—A potential liquid biopsy strategy for prostate cancer diagnosis? *Cancers*, 14, 2987.
- Arslan Çağlayan, Z. (2025). *Development of a MEMS-based microfluidic electrochemical biosensor for the detection of circulating tumor DNA*. Doctoral Thesis, Middle East Technical University, Ankara, 78-85.
- Arunkumar, K. A. and Bradley, E. B. (1983). Theory of surface enhanced Raman scattering. *Journal of Chemical Physics*, 78, 2882–2888.
- Azizian, P., Casals-Terré, J., Ricart, J. and Cabot, J. M. (2023). Capillary-driven microfluidics: Impacts of 3D manufacturing on bioanalytical devices. *Analyst*, 148, 2657–2675.
- Baryeh, K., Takalkar, S., Lund, M. and Liu, G. (2017). Introduction to medical biosensors for point of care applications. In *Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications*. New York: Elsevier, 3–25.
- Borghesi, L. and Milcarek, C. (2006). From B cell to plasma cell: Regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunologic Research*, 36, 27–32.
- Brzozowski, J. S., Bond, D. R., Jankowski, H., Goldie, B. J., Burchell, R., Naudin, C., Smith, N. D., Scarlett, C. J., Larsen, M. R. and Dun, M. D. (2018). Extracellular vesicles with altered tetraspanin CD9 and CD151 levels confer increased prostate cell motility and invasion. *Scientific Reports*, 8, 8822.

- Butow, P. N., Fardell, J. E. and Smith, A. (2015). Fear of cancer recurrence: An overview and Australian perspective. *Cancer Forum*, 1, 95–100.
- Campion, A. and Kambhampati, P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 27(4), 241–250.
- Cao, J., Galbraith, E. K., Sun, T. and Grattan, K. T. (2012). Effective surface modification of gold nanorods for localized surface plasmon resonance-based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 169(2012), 360–367.
- Chiriaco, M. S., Bianco, M., Nigro, A., Primiceri, E., Ferrara, F., Romano, A., Quattrini, A., Furlan, R., Arima, V. and Maruccio, G. (2018). Lab-on-chip for exosomes and microvesicles detection and characterization. *Sensors*, 18(10), 3175.
- Clark, W. H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *British Journal of Cancer*, 64(4), 631–644.
- Commisso, C., Davidson, S. M., Soydaner-Azeloglu, R. G., Parker, S. J., Kamphorst, J. J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J. A. and Thompson, C. B. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 497(7451), 633–637.
- Cross, S. S. (Ed). (2019). *Underwood's pathology: A clinical approach* (7th ed). New York: Elsevier, 85-95.
- Cui, F., Zhou, Z. and Zhou, H. S. (2019). Measurement and analysis of cancer biomarkers based on electrochemical biosensors. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037525.
- da Fonseca Alves, R., Pallarès-Rusiñol, A., Rossi, R., Martí, M., Vaz, E. R., de Araújo, T. G., Sotomayor, M. D. P. T. and Pividori, M. I. (2024). Peptide-based biosensing approaches for targeting breast cancer-derived exosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, 255, 116211.
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J.-F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y. and Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12048–12053.
- Derebasi, M., Liman, G., Hukum, K. O., Yildiz, E., Ada Demirel, P. and Demirel, G. (2025). Light-induced foldable materials with 3D-gold nanorod assemblies enable large area plasmonic hot-spot generations. *RSC Applied Polymers*, 3, 1553–1563. <https://doi.org/10.1039/D5LP00229J>
- Dinç, G. G. (2025). *SARS-CoV-2 virüs antijeni belirlenmesi için yatay akış immün testinin geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 22-45.

- Ding, Z., Wei, Y., Liu, X., Han, F. and Xu, Z. (2023). Substantial dimerized G-quadruplex signal units engineered by cutting-mediated exponential rolling circle amplification for ultrasensitive and label-free detection of exosomes. *Analytica Chimica Acta*, 1253, 341098.
- Dogan, Ü., Sucularlı, F., Yildirim, E., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I. H. and Tamer, U. (2022). Escherichia coli enumeration in a capillary-driven microfluidic chip with SERS. *Biosensors*, 12, 765. <https://doi.org/10.3390/bios12090765>
- Duan, G., Cai, W., Luo, Y. and Li, Y. (2006). Electrochemically induced flowerlike gold nanoarchitectures and their strong surface-enhanced Raman scattering effect. *Applied Physics Letters*, 89(21), 96-102.
- Eryilmaz, M., Ilbasimis-Tamer, S., Panhwar, S., Tayyarcı, E. K., Boyaci, İ. H., Suludere, Z., Çetin, D., Zengin, A., Yıldırım, E. and Tamer, U. (2025). Rapid bacterial detection through microfluidic integration with a glucometer. *Bioelectrochemistry*, 164, 108936.
- Erzurumlu, Y. (2021). Prostat kanseri: Androjen reseptörü sinyal mekanizması. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 28, 187–198.
- Farha, A. H., Alshoaibi, A., Saber, O. and Mansour, S. A. (2024). Novel magnetite (Fe₃O₄)-methylcellulose nanocomposites synthesized using the reverse co-precipitation approach. *Journal of Composites Science*, 8, 282.
- Fenzl, C., Hirsch, T. and Wolfbeis, O. S. (2014). Photonic crystals for chemical sensing and biosensing. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 3318–3335. <https://doi.org/10.1002/anie.201307828>
- Fleischmann, M., Hendra, P. J. and McQuillan, A. J. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26, 163–166.
- Free, A. H., Adams, E. C., Kercher, M. L., Free, H. M. and Cook, M. H. (1957). Simple specific test for urine glucose. *Clinical Chemistry*, 3, 163–168.
- Germain, V., Brioude, A., Ingert, D. and Pileni, M. P. (2005). Silver nanodisks: Size selection via centrifugation and optical properties. *Journal of Chemical Physics*, 122.
- Ginini, L., Billan, S., Fridman, E. and Gil, Z. (2022). Insight into extracellular vesicle–cell communication: From cell recognition to intracellular fate. *Cells*, 11, 1375.
- Giovannelli, P., Di Donato, M., Galasso, G., Monaco, A., Licitra, F., Perillo, B., Migliaccio, A. and Castoria, G. (2021). Communication between cells: Exosomes as a delivery system in prostate cancer. *Cell Communication and Signaling*, 19, 110. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00792-1>
- Gjergjizi, B., Çoğun, F., Yıldırım, E., Eryılmaz, M., Selbes, Y., Sağlam, N. and Tamer, U. (2018). SERS-based ultrafast and sensitive detection of luteinizing hormone in human serum using a passive microchip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 269, 314–321.
- Gomes, E. C., Ribeiro, C. L., Santos Jr, V. O. and Paterno, L. G. (2023). Differential pulse voltammetric detection of acetaminophen using nickel phthalocyanine/CeO₂-modified ITO electrodes. *Chemosensors*, 11, 154.

- Goumas, G., Vlachothanasi, E. N., Fradelos, E. C. and Mouliou, D. S. (2025). Biosensors, artificial intelligence biosensors, false results and novel future perspectives. *Diagnostics*, 15, 1037. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15081037>
- Gregory, C. D. and Rimmer, M. P. (2023). Extracellular vesicles arising from apoptosis: Forms, functions, and applications. *Journal of Pathology*, 260, 592–608. <https://doi.org/10.1002/path.6138>
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. and Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors: Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8, 1400–1458.
- Guerrini, L., Garcia-Rico, E., O’Loghlen, A., Giannini, V. and Alvarez-Puebla, R. A. (2021a). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy for sensing and characterization of exosomes in cancer diagnosis. *Cancers*, 13, 2179.
- Gumustas, A., Caglayan, M. G., Eryilmaz, M., Suludere, Z., Soykut, E. A., Uslu, B., Boyaci, I. H. and Tamer, U. (2018). Paper-based lateral flow immunoassay for the enumeration of *Escherichia coli* in urine. *Analytical Methods*, 10, 1213–1218.
- Guo, Y., Zhang, R., You, H. and Fang, J. (2024). Effective enrichment of trace exosomes for the label-free SERS detection via low-cost thermophoretic profiling. *Biosensors and Bioelectronics*, 253, 116164.
- Gültekin, M., Boztaş, G. and Utku, E. (2014). Türkiye kanser istatistikleri. *Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Yayını*, 43, 12–32.
- Han, Z., Peng, X., Yang, Y., Yi, J., Zhao, D., Bao, Q., Long, S., Yu, S.-X., Xu, X.-X. and Liu, B. (2022). Integrated microfluidic–SERS for exosome biomarker profiling and osteosarcoma diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 217, 114709.
- Hassan, S., Tariq, A., Noreen, Z., Donia, A., Zaidi, S. Z., Bokhari, H. and Zhang, X. (2020). Capillary-driven flow microfluidics combined with smartphone detection: An emerging tool for point-of-care diagnostics. *Diagnostics*, 10, 509.
- Ho, K. H. W., Lai, H., Zhang, R., Chen, H., Yin, W., Yan, X., Xiao, S., Lam, C. Y. K., Gu, Y., Yan, J., Hu, K., Shi, J. and Yang, M. (2024). SERS-based droplet microfluidic platform for sensitive and high-throughput detection of cancer exosomes. *ACS Sensors*, 9, 4860–4869. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c01357>
- İnanır, C. and Ekici, L. (2020). Eksozomlar: Kompozisyonları, biyolojik fonksiyonları ve biyoaktif bileşiklerin taşınmasındaki potansiyelleri. *Akademik Gıda*, 18, 421–432.
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A. (2007). Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*, 2, 107–118.
- Jan, A. T., Rahman, S., Badierah, R., Lee, E. J., Mattar, E. H., Redwan, E. M. and Choi, I. (2021). Expedition into exosome biology: A perspective of progress from discovery to therapeutic development. *Cancers*, 13, 1157.

- Jeanmaire, D. L. and Van Duyne, R. P. (1977). Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 84, 1–20.
- Jefferis, R. and Lefranc, M.-P. (2009). Human immunoglobulin allotypes: Possible implications for immunogenicity. *mAbs*, 1, 332–338. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.4.9122>
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q. and Evans, R. (2019). Reassessment of exosome composition. *Cell*, 177, 428–445.
- Jia, H., Meng, W., Gao, R., Wang, Y., Zhan, C., Yu, Y., Cong, H. and Yu, L. (2024). Integrated SERS-microfluidic sensor based on nano-micro hierarchical cactus-like array substrates for the early diagnosis of prostate cancer. *Biosensors*, 14, 579.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation: Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262, 9412–9420.
- Kahn, C. R. and Roth, J. (2004). Berson, Yalow, and the JCI: The agony and the ecstasy. *Journal of Clinical Investigation*, 114, 1051–1054.
- Kalita, N., Gogoi, S., Minter, S. D. and Goswami, P. (2023). Advances in bioelectrode design for developing electrochemical biosensors. *ACS Measurement Science Au*, 3, 404–433. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.3c00034>
- Kastelowitz, N. and Yin, H. (2014). Exosomes and microvesicles: Identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. *ChemBioChem*, 15, 923–928. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400043>
- Kayış, E. Ç., Çalimci, M., Yildirim, E., Sezer, B., Boyacı, I. H. and Tamer, U. (2024). SERS applications for bacterial determination in food matrices. In *Raman Spectroscopy in the Food Industry*. New York: CRC Press, 107–145.
- Kayış, E. Ç., Torul, H., Sazaklıoğlu, S. A., Çelikkan, H., Ensarioğlu, H. K., Gumus, B. H., Vatansever, H. S. and Tamer, U. (2025). Electrochemically generated paper SERS substrate for detection of exosome in urine samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 426, 137103.
- Kim, E. R., Joe, C., Mitchell, R. J. and Gu, M. B. (2023). Biosensors for healthcare: Current and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 41, 374–395.
- Koczula, K. M. and Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, 60, 111–120.
- Kolosovas-Machuca, E. S., Cuadrado, A., Ojeda-Galván, H. J., Ortiz-Dosal, L. C., Hernández-Arteaga, A. C., Rodríguez-Aranda, M. del C., Navarro-Contreras, H. R. and Alda, J., González, F. J. (2019). Detection of histamine dihydrochloride at low concentrations using Raman spectroscopy enhanced by gold nanostars colloids. *Nanomaterials*, 9, 211.

- Kowalczyk, A., Gajda-Walczak, A., Ruzycka-Ayoush, M., Targonska, A., Mosieniak, G., Glogowski, M., Szumera-Cieckiewicz, A., Prochorec-Sobieszek, M., Bamburowicz-Klimkowska, M., Nowicka, A. M. and Grudzinski, I. P. (2023). Parallel SPR and QCM-D quantitative analysis of CD9, CD63, and CD81 tetraspanins: A simple and sensitive way to determine the concentration of extracellular vesicles isolated from human lung cancer cells. *Analytical Chemistry*, 95, 9520–9530. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00772>
- Lambert, M. A., & Finlay, W. J. (2014). Soliris (eculizumab): Discovery and development. *Drug Discovery Today*, 19(12), 2026–2033.
- Laserna, J. J. (Ed). (1996). *Modern Techniques in Raman Spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 65-78.
- Lee, H., Kang, S. J., Lee, J., Park, K. H. and Rhee, W. J. (2022). Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles from healthy donors and patients with castration-resistant prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7134.
- Levinson, W. (2016). *Review of Medical Microbiology and Immunology* (14th ed). New York: McGraw-Hill Education, 45-52.
- Li, J., Li, Y., Li, P., Zhang, Y., Du, L., Wang, Y., Zhang, C. and Wang, C. (2022). Exosome detection via surface-enhanced Raman spectroscopy for cancer diagnosis. *Acta Biomaterialia*, 144, 1–14.
- Lin, C., Huang, X., Xue, Y., Jiang, S., Chen, C., Liu, Y. and Chen, K. (2025). Advances in medical devices using nanomaterials and nanotechnology: Innovation and regulatory science. *Bioactive Materials*, 48, 353–369.
- Liu, C., Qie, Y., Qin, W., Zhao, K., Zhu, J., Zhao, L., Li, M. and Guo, L.-H. (2021). Emerging immunoassay technologies for the rapid detection of exosomes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 345, 130336.
- Liu, J., Srivastava, S., Li, T., Moujane, F., Lee, J. Y., Chen, Y., Liu, H., Deng, S. X. and Xie, Y.-H. (2025). On the feasibility of SERS-based monitoring of drug loading efficiency in exosomes for targeted delivery. *Biosensors*, 15, 141.
- Lu, Z., Ruan, W., Yang, J., Xu, W., Zhao, C. and Zhao, B. (2009). Deposition of Ag nanoparticles on porous anodic alumina for surface-enhanced Raman scattering substrate. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40, 112–116. <https://doi.org/10.1002/jrs.2111>
- Ludwig, M., Rajvansh, R. and Drake, J. M. (2021). Emerging role of extracellular vesicles in prostate cancer. *Endocrinology*, 162, bqab139.
- Lyons, A. C., Mehta, S. and Zhang, J. (2023). Fluorescent biosensors illuminate the spatial regulation of cell signaling across scales. *Biochemical Journal*, 480, 1693–1717.
- Ma, T., Dong, X., Liang, I., Chen, J., Tao, Y., Chen, J., Xu, D. and Liang, F. (2025). A cellulose paper decorated with gold–silver nanoparticles for SERS-based immunoassays. *Talanta*, 294, 128170.

- Malhotra, S., Amin, Z. M., Dobhal, G., Cottam, S., Nann, T. and Goreham, R. V. (2021). Novel devices for isolation and detection of bacterial and mammalian extracellular vesicles. *Microchimica Acta*, 188, 139.
- Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73, 1907–1920.
- Mazzaracchio, V. and Arduini, F. (2025). Smart microfluidic devices integrated in electrochemical point-of-care platforms for biomarker detection in biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-025-06127-0>
- McCreery, R. L. (2005). *Raman spectroscopy for chemical analysis*. New York: John Wiley & Sons, 12-22.
- Meldolesi, J. (2021). Extracellular vesicles (exosomes and ectosomes) play key roles in the pathology of brain diseases. *Molecular Biomedicine*, 2, 18. <https://doi.org/10.1186/s43556-021-00040-5>
- Mello, L. D. and Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77, 237–256.
- Meng, X., Dyer, J., Huo, Y. and Jiang, C. (2020). Greater SERS activity of ligand-stabilized gold nanostars with sharp branches. *Langmuir*, 36, 3558–3564. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00079>
- Miglione, A., Di Nardo, F., Cavallera, S., Serra, T., Baggiani, C., Cinti, S. and Anfossi, L. (2025). Toward real-world application of eLFIA: Analytical tuning and serum application for PSA detection. *Talanta*, 129110.
- Mohankumar, P., Ajayan, J., Mohanraj, T. and Yasodharan, R. (2021). Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. *Measurement*, 167, 108293.
- Nawaz, M. A. H., Majdinasab, M., Latif, U., Nasir, M., Gokce, G., Anwar, M. W. and Hayat, A. (2018). Development of a disposable electrochemical sensor for detection of cholesterol using differential pulse voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 398–405.
- Ngom, B., Guo, Y., Wang, X. and Bi, D. (2010). Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1113–1135.
- Noviana, E., Ozer, T., Carrell, C. S., Link, J. S., McMahon, C., Jang, I. and Henry, C. S. (2021). Microfluidic paper-based analytical devices: From design to applications. *Chemical Reviews*, 121, 11835–11885. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01335>
- O'Farrell, B. (2009). Evolution in lateral flow-based immunoassay systems. In R. Wong and H. Tse (Eds.), *Lateral flow immunoassay*. New York: Humana Press, 1–33.
- Oliveira, A. E. F., Pereira, A. C., Resende, M. A. and Ferreira, L. F. (2023). Gold nanoparticles: A didactic step-by-step of the synthesis using the Turkevich method, mechanisms, and characterizations. *Analytica*, 4, 250–263.

- Ondrušek, R., Kvokačková, B., Kryštofová, K., Brychtová, S., Souček, K. and Bouchal, J. (2023). Prognostic value and multifaceted roles of tetraspanin CD9 in cancer. *Frontiers in Oncology*, 13, 1140738.
- Orendorff, C. J., Gearheart, L., Jana, N. R. and Murphy, C. J. (2006). Aspect ratio dependence on surface-enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8, 165–170.
- Özütemiz Tutanç, S. (2025). *Sağlıklı erişkinlerde IgG–IgA–IgM düzeylerinin yaşa göre referans aralıklarının belirlenmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 65-72.
- Park, H. K., Yoon, J. K. and Kim, K. (2006). Novel fabrication of Ag thin film on glass for efficient surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir*, 22, 1626–1629. <https://doi.org/10.1021/la052559o>
- Parolo, C., de la Escosura-Muñiz, A. and Merkoçi, A. (2013). Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 412–416.
- Parolo, C., Sena-Torralba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P. and Cinti, S. (2020). Tutorial: Design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols*, 15, 3788–3816.
- Pauli, G. E. N., De La Escosura-Muñiz, A., Parolo, C., Bechtold, I. H. and Merkoçi, A. (2015). Lab-in-a-syringe using gold nanoparticles for rapid immunosensing of protein biomarkers. *Lab on a Chip*, 15, 399–405.
- Perumal, V. and Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12, 1–15.
- Phan-Quang, G. C., Lee, H. K., Phang, I. Y. and Ling, X. Y. (2015). Plasmonic colloidosomes as three-dimensional SERS platforms with enhanced surface area for multiphase sub-microliter toxin sensing. *Angewandte Chemie*, 127, 9827–9831. <https://doi.org/10.1002/ange.201504027>
- Raman, C. V. and Krishnan, K. S. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, 121, 501–502.
- Ritchie, R. H. (1957). Plasma losses by fast electrons in thin films. *Physical Review*, 106, 874–881. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.874>
- Sancı, R. and Volkan, M. (2009). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies on silver nanorod substrates. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139, 150–155.
- Schroeder Jr, H. W. and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S41–S52.
- Serebrennikova, K. V., Berlina, A. N., Sotnikov, D. V., Zherdev, A. V. and Dzantiev, B. B. (2021). Raman scattering-based biosensing: New prospects and opportunities. *Biosensors*, 11, 512.

- Shafiee, A., Ghadiri, E., Kassis, J., Pourhabibi Zarandi, N. and Atala, A. (2018). Biosensing technologies for medical applications, manufacturing, and regenerative medicine. *Current Stem Cell Reports*, 4, 105–115.
- Shi, L. and Esfandiari, L. (2020). An electrokinetically driven microchip for rapid entrapment and detection of nanovesicles. *Micromachines*, 12, 11.
- Shin, H., Jeong, E. and Lee, S. (2025). Development of automated exosome isolation method using epigallocatechin gallate-modified magnetic beads: Standardized protocols for diverse biofluids. *Applied Sciences*, 15, 6170.
- Siemes, C., Bruckbauer, A., Goussev, A., Otto, A., Sinther, M. and Pucci, A. (2001). SERS-active sites on various copper substrates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 32, 231–239. <https://doi.org/10.1002/jrs.692>
- Smekal, A. (1923). Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*, 11, 873–875. <https://doi.org/10.1007/BF01576902>
- Smith, E. and Dent, G. (2019). *Modern Raman spectroscopy: A practical approach*. New York: John Wiley & Sons, 65-72.
- Srisrattakarn, A., Tippayawat, P., Chanawong, A., Tavichakorntrakool, R., Daduang, J., Wonglakorn, L. and Lulitanond, A. (2020). Development of a prototype lateral flow immunoassay for rapid detection of staphylococcal protein A in positive blood culture samples. *Diagnostics*, 10, 794.
- Szwedowicz, U., Łapińska, Z., Gajewska-Naryniecka, A. and Choromańska, A. (2022). Exosomes and other extracellular vesicles with high therapeutic potential: Their applications in oncology, neurology, and dermatology. *Molecules*, 27, 1303.
- Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I. H., Temiz, H. T., Yegenoglu, H., Daniel, P., Dinçer, İ. and Elerman, Y. (2013). Gold-coated iron composite nanospheres targeted the detection of *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6223–6240.
- Temur, E., Boyacı, İ. H., Tamer, U., Unsal, H. and Aydogan, N. (2010). A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for *Escherichia coli* enumeration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1595–1604.
- Temur, E., Zengin, A., Boyacı, İ. H., Dudak, F. C., Torul, H. and Tamer, U. (2012). Attomole sensitivity of staphylococcal enterotoxin B detection using an aptamer-modified surface-enhanced Raman scattering probe. *Analytical Chemistry*, 84, 10600–10606. <https://doi.org/10.1021/ac301924f>
- Tezcan, T. and Hsu, C.-H. (2020). High-sensitivity SERS-based sensing on the labeling side of glass slides using low-branched gold nanoparticles prepared with surfactant-free synthesis. *RSC Advances*, 10, 34290–34298.
- Théry, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2, 569–579.

- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34, 635–659. <https://doi.org/10.1081/AL-100103209>
- Tian, F., Bonnier, F., Casey, A., Shanahan, A. E. and Byrne, H. J. (2014). Surface-enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: Effect of particle shape. *Analytical Methods*, 6, 9116–9123.
- Tian, Y.-F., Ning, C.-F., He, F., Yin, B.-C. and Ye, B.-C. (2018). Highly sensitive detection of exosomes by SERS using gold nanostar@Raman reporter@nanoshell structures modified with a bivalent cholesterol-labeled DNA anchor. *Analyst*, 143, 4915–4922.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N. and Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57, 724–803. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.08.003>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. and Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55–75.
- Ullah, M. S., Zhivonitko, V. V., Samoylenko, A., Zhyvolozhnyi, A., Viitala, S., Kankaanpää, S., Komulainen, S., Schröder, L., Vainio, S. J. and Telkki, V.-V. (2021). Identification of extracellular nanoparticle subsets by nuclear magnetic resonance. *Chemical Science*, 12, 8311–8319.
- Van Amerongen, A., Veen, J., Arends, H. A. and Koets, M. (2018). Lateral flow immunoassays. In *Handbook of Immunoassay Technologies*. New York: Elsevier, 157–182.
- Van der Koog, L., Gandek, T. B. and Nagelkerke, A. (2022). Liposomes and extracellular vesicles as drug delivery systems: A comparison of composition, pharmacokinetics, and functionalization. *Advanced Healthcare Materials*, 11, 2100639. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100639>
- Vidarsson, G., Dekkers, G. and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5, 520.
- Vongsvivut, J., Robertson, E. G. and McNaughton, D. (2010). Surface-enhanced Raman spectroscopic analysis of fonofos pesticide adsorbed on silver and gold nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 1137–1148. <https://doi.org/10.1002/jrs.2579>
- Wöhner, M. and Nimmerjahn, F. (2025). Cytotoxic IgG: Mechanisms, functions, and applications. *Immunity*, 58, 1378–1395.
- Wu, E. H. and De Cicco, F. L. (2020). *Anatomy, abdomen and pelvis, male genitourinary tract*.
- Xiong, H., Huang, Z., Lin, Q., Yang, B., Yan, F., Liu, B., Chen, H. and Kong, J. (2022). Surface plasmon coupling electrochemiluminescence immunosensor based on polymer dots and AuNPs for ultrasensitive detection of pancreatic cancer exosomes. *Analytical Chemistry*, 94, 837–846. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03535>

- Yang, L., Jia, J. and Li, S. (2022). Advances in the application of exosomes identification using surface-enhanced Raman spectroscopy for the early detection of cancers. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 808933.
- Yilmaz, M., Babur, E., Ozdemir, M., Giesecking, R. L., Dede, Y., Tamer, U., Schatz, G. C., Facchetti, A., Usta, H. and Demirel, G. (2017). Nanostructured organic semiconductor films for molecular detection with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nature Materials*, 16, 918–924.
- Zadka, Ł., Piotrowska, A., Opalińska, A., Haczekiewicz-Leśniak, K., Grybowski, D., Ceremuga, I., Chabowski, M. and Dzięgiel, P. (2020). Comparative analysis of exosome markers and extracellular vesicles between colorectal cancer and cancer-associated normal colonic mucosa. *Polish Archives of Internal Medicine*, 130, 640.
- Zhang, M., Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F. and Zhang, L. (2018a). Methods and technologies for exosome isolation and characterization. *Small Methods*, 2, 1800021. <https://doi.org/10.1002/smt.201800021>
- Zhang, Y., Hu, Y., Guo, H., Zhao, M., Liu, S., Liu, J., Huang, Y. and Wang, Z. (2025). Prostate cancer cell-derived exosomes inhibit macrophage phagocytosis through EIF3B-mediated exosomal sorting of miR-100-5p. *Scientific Reports*, 15, 26138.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. and Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*, 9, 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhao, V. X. T., Wong, T. I., Zheng, X. T., Tan, Y. N. and Zhou, X. (2020). Colorimetric biosensors for point-of-care virus detections. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 237–249.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇALIK KAYIŞ, Elif
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :
 Medeni hali :
 Telefon : -
 E-posta :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/ Analitik Kimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Fen Fakültesi/ Analitik Kimya Ana Bilim Dalı	2017
Lisans	Gazi Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/Kimya Bölümü	2014
Lise	Davutpaşa Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-2016	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	Kısmi zamanlı laboratuvar asistanı
2017-2019	Neutec İnhaler Ar&Ge	Uzman Yardımcısı

Yabancı Dil

İngilizce

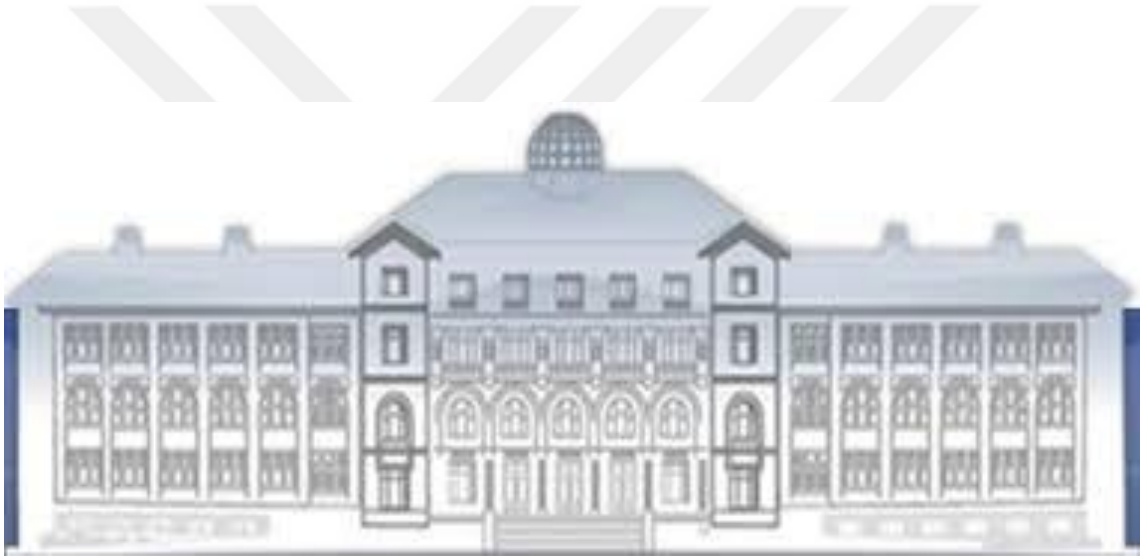
Yayınlar

Chandio, T. A., Yalçinkaya, Ö., Khan, M. N., Çalık Kayis, E., Hassan, A. and Kayis, A. F. (2021). Electrochemical determination of furosemide drug at tranexamic acid gold nanoparticles modified glassy carbon electrode. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 22(1), 172–179.

- Guven, K., Kayış, E. Ç., Orhan, I. E., Aslan, M., Boyacı, I. H. and Tamer, U. (2025). A novel approach for rapid quantification of food supplement components using NIR spectroscopy and spectral data transfer. *Analyst*, 18, 1-15.
- Kayış, E. Ç., Çalimci, M., Yildirim, E., Sezer, B., Boyacı, I. H. and Tamer, U. (2025). SERS applications for bacterial determination in food matrices. In *Raman spectroscopy in the food industry*. New York: CRC Press, 107–145.
- Kayış, E. Ç., Torul, H., Sazaklıoğlu, S. A., Çelikkan, H., Ensarioğlu, H. K., Gumus, B. H. and Tamer, U. (2025). Electrochemically generated paper SERS substrate for detection of exosome in urine samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 426, 137103.
- Tamer, U., Torul, H., Tezcan, T., Kayis, E. C. and Çalimci, M. (2024). Determination of pesticide residues in environmental samples with electrochemical sensors. In *Recent trends and perspectives on electrochemical sensors for environmental monitoring*. New York: Elsevier, 473–501.
- Taşkoparan Yılmaz, Ü., Çalık Kayis, E., Akdulum, B. and Yılmaz, H. (2018). Determination of carnosic acid in *Rosmarinus officinalis* L. using square wave voltammetry and electrochemical behavior. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 300–308.
- Taşkoparan Yılmaz, Ü., Çalık Kayis, E., Uzun, D., Karıpcın, F. and Yılmaz, H. (2016). Selective and sensitive determination of tannic acid using a 1-benzoyl-3-(pyrrolidine) thiourea film modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 776(1), 1–8.
- Torul, H., Çağlayan Arslan, Z., Tezcan, T., Çalık Kayis, E., Çalimci, M., Gümüştas, A., Yıldırım, E., Külah, H. and Tamer, U. (2023). Microfluidic-based blood immunoassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 228, 115313.
- Torul, H., Çalık Kayis, E., Boyacı, I. H. and Tamer, U. (2022). An ECL sensor combined with a paper electrode for the determination of phenylalanine. *Analyst*, 147(21), 4866–4875.

Hobiler

Resim yapmak, Digital bilimsel çizimler yapmak, Yağmurda yürümek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

